



生命科学前沿及应用生物技术

DNA 小分子检测技术 及其应用

刘云国 叶乃好 等 编著



科学出版社

生命科学前沿及应用生物技术大系·典藏版

DNA 小分子检测技术 及其应用

刘云国 叶乃好等 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

应用生物技术大系和现代生命科学前沿系列图书分别被列为“十一五”和“十二五”国家重点图书出版规划项目。本丛书针对生命科学领域前沿重点发展方向以及应用生物技术领域的新成果、新思路、新方法和新技术,全面展示了其最新的发展动态,涵盖了基础理论和主要技术方法,呈现了新的概念与理论、技术,在更深层次上阐明了生命的本质规律,给人们提供了新的认识生命本质的手段,也为生物技术服务于人类开辟了新的途径。涉及领域包括生物医药、干细胞技术、工业微生物学、蛋白质及蛋白质组、系统生物学、合成生物学、生物材料、农业生物技术、环境生物技术、海洋生物技术、生物资源与安全等。

图书在版编目(CIP)数据

生命科学前沿及应用生物技术大系:典藏版/舒红兵等编著.—北京:科学出版社,2016

ISBN 978-7-03-047487-2

I.①现… II.①舒… III.①生命科学—研究②生物工程—研究 IV.①Q1-0②Q819

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043876 号

责任编辑:王 静 李 悦

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年7月第一版 开本:787×1092 1/16

2016年7月第一次印刷 印张:2108

字数:49 985 000

定价:8900.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

目 录

| | |
|---------------------------|----|
| 第一章 荧光定量 PCR 技术及其应用 | 1 |
| 第一节 定量 PCR 技术产生及其发展 | 1 |
| 一、定量 PCR 技术产生背景 | 1 |
| 二、定量 PCR 技术现状及进展 | 2 |
| 三、定量 PCR 技术的展望 | 4 |
| 第二节 荧光定量 PCR 的原理与特点 | 5 |
| 一、荧光定量 PCR 定量的理论模式 | 6 |
| 二、荧光阈值和 Ct 值 | 6 |
| 三、荧光定量 PCR 技术的特点 | 7 |
| 第三节 荧光定量 PCR 的类型 | 9 |
| 一、荧光内参染料法 | 9 |
| 二、序列特异性探针 | 11 |
| 三、绝对定量与相对定量 | 15 |
| 四、标准曲线的制作 | 17 |
| 第四节 防污染的控制策略 | 18 |
| 一、PCR 污染的原因 | 18 |
| 二、污染的监测 | 19 |
| 三、防范污染的方法 | 19 |
| 第五节 荧光定量 PCR 技术的应用 | 20 |
| 一、肿瘤相关基因的检测 | 20 |
| 二、转基因检测 | 22 |
| 三、基因突变检测 | 25 |
| 四、病毒检测 | 27 |
| 五、病原菌检测 | 32 |
| 六、寄生虫检测 | 36 |
| 七、基因表达的相对定量分析 | 37 |
| 第二章 环介导等温扩增技术及其应用 | 43 |
| 第一节 环介导等温扩增法的原理 | 43 |
| 第二节 引物设计及操作步骤 | 45 |
| 一、引物设计 | 45 |
| 二、反应体系 | 45 |
| 三、结果判断 | 46 |

| | |
|---------------------------------|------------|
| 第三节 环介导等温扩增技术的应用 | 46 |
| 一、细菌检测 | 47 |
| 二、病毒检测 | 47 |
| 三、寄生虫检测 | 48 |
| 第三章 焦磷酸测序技术及其应用 | 50 |
| 第一节 焦磷酸测序技术的产生及其发展 | 50 |
| 一、测序技术的发展现状 | 50 |
| 二、测序技术的发展瓶颈 | 52 |
| 三、焦磷酸测序技术的产生及发展 | 53 |
| 四、焦磷酸测序技术的前景 | 60 |
| 第二节 焦磷酸测序技术的原理及流程 | 62 |
| 一、焦磷酸测序技术的一般原理 | 62 |
| 二、焦磷酸测序技术的一般流程 | 63 |
| 三、焦磷酸测序反应过程的具体原理 | 66 |
| 第三节 焦磷酸测序技术引物的设计及结果分析 | 67 |
| 一、利用软件进行引物设计的流程 | 67 |
| 二、焦磷酸测序的结果分析 | 69 |
| 第四节 焦磷酸测序技术的应用 | 72 |
| 一、焦磷酸测序技术在各领域中的应用 | 72 |
| 二、焦磷酸测序技术的深度测序优势 | 74 |
| 第四章 变性高效液相色谱及其应用 | 78 |
| 第一节 变性高效液相色谱的产生及其发展 | 78 |
| 第二节 变性高效液相色谱的分析原理 | 80 |
| 一、长度多态性分析原理 | 80 |
| 二、单核苷酸多态性分析原理 | 80 |
| 三、基因型多态性分析原理 | 81 |
| 四、温度工作原理 | 81 |
| 第三节 变性高效液相色谱实验设计及影响要素 | 83 |
| 一、变性高效液相色谱推荐优化设计 | 83 |
| 二、DHPLC 基本操作流程 | 88 |
| 第四节 变性高效液相色谱的应用 | 91 |
| 一、DHPLC 的应用技术 | 91 |
| 二、DHPLC 的应用领域 | 96 |
| 第五节 变性高效液相色谱的标准化管埋 | 111 |
| 第五章 变性梯度凝胶电泳技术及其应用 | 117 |
| 第一节 变性梯度凝胶电泳技术的原理 | 117 |
| 一、变性梯度凝胶电泳的衍生技术 | 118 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| 二、PCR-DGGE 方法的优点 | 119 |
| 第二节 DGGE 技术的引物设计 | 120 |
| 一、引物设计原则 | 120 |
| 二、Primer Premier 5.0 使用简介 | 121 |
| 三、Oligo 6.22 使用简介 | 124 |
| 四、DGGE/TGGE 引物设计注意事项 | 126 |
| 第三节 DGGE 和 TGGE 技术的应用 | 126 |
| 一、在食品微生物研究中的应用 | 126 |
| 二、在口腔微生物研究中的应用 | 130 |
| 三、在土壤微生物研究中的应用 | 130 |
| 四、在环境微生物研究中的应用 | 132 |
| 五、在其他领域中的应用 | 133 |
| 第六章 肽核酸探针技术及其应用 | 138 |
| 第一节 肽核酸探针技术的产生及发展 | 138 |
| 一、肽核酸探针技术的产生 | 138 |
| 二、肽核酸探针技术的迅速发展历程 | 139 |
| 第二节 肽核酸探针技术的原理 | 141 |
| 第三节 肽核酸相探针技术的引物和探针设计 | 143 |
| 一、PNA 探针的设计原则 | 143 |
| 二、PNA 探针的设计方案和流程 | 144 |
| 第四节 肽核酸探针技术的应用 | 146 |
| 一、PNA 探针技术在微生物检测领域的应用 | 146 |
| 二、PNA 探针技术在疾病诊疗中的应用 | 148 |
| 三、PNA 在分子生物学领域中的应用 | 150 |
| 四、PNA 探针在生物传感器检测中的应用 | 154 |
| 五、PNA 在其他领域的应用 | 155 |
| 六、PNA 探针发展前景 | 156 |
| 第七章 基因芯片 | 159 |
| 第一节 基因芯片技术介绍 | 159 |
| 第二节 基因芯片技术的原理及操作流程 | 161 |
| 一、基本原理 | 161 |
| 二、基本分类 | 162 |
| 三、基因芯片的制作 | 163 |
| 四、基因芯片的检测方法 | 165 |
| 五、扫描阅读 | 166 |
| 第三节 基因芯片技术的应用 | 166 |
| 一、在基础研究中的应用 | 166 |

| | |
|------------------------|-----|
| 二、在疾病诊断中的应用 | 168 |
| 三、基因芯片在药物研究中的应用 | 170 |
| 四、在环境保护和监测方面的应用 | 171 |
| 五、基因芯片技术存在的问题与展望 | 171 |

第一章 荧光定量 PCR 技术及其应用

人类对于核酸的研究已经有 100 多年的历史。20 世纪 60 年代末 70 年代初，人们致力于研究基因的体外分离技术。但是，由于核酸的含量较少，一定程度上限制了 DNA 的体外操作。而聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）技术的出现有效地解决了这个瓶颈问题，使该技术成为遗传与分子生物学分析的根本性基石。

PCR 技术是由美国科学家穆利斯提出的一种体外简化条件下模拟 DNA 体内复制 DNA 快速扩增的方法，此技术获得 1993 年诺贝尔化学奖。在以后的几十年里，PCR 方法被不断改进：它从一种定性的分析方法发展到定量测定；从原先只能扩增几千个碱基对的基因到目前已能扩增长达几万个碱基对的 DNA 片段。到目前为止，PCR 技术已有十几种之多，定量 PCR 是在定性技术基础上发展起来的核酸定量技术。自 1985 年 Saiki 等首次描述定量聚合酶链反应技术以来，因其展现了前所未有的敏感性和特异性，受到了人们的高度重视。如今各种各样以 PCR 为基础的 DNA 序列的扩增和控制方法得到了迅猛发展，几乎已应用于基础研究的各个领域。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 对基因快速、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。目前已广泛应用于基因表达研究、转基因研究、病原体定量检测、药物疗效考核、疾病分类及其发病机制的研究、新药验证等领域。下面，我们将走进这项“革命性”的生物技术。

第一节 定量 PCR 技术产生及其发展

一、定量 PCR 技术产生背景

随着研究工作的进一步深入，在很多情况下我们需要了解样本中基因的表达模式，这就需要了解标本中的 DNA 原始拷贝数。而传统意义上的 PCR 技术是将样本中微量的 DNA 模板放大以便研究模板特性，理论上 PCR 过程中反应产物是以指数规模增长的，但实际的 PCR 扩增曲线并不是标准的指数曲线，而是 S 形曲线——因为随着 PCR 循环数的增加，扩增规模迅速增大， Taq 酶、dNTP、引物，甚至 DNA 模板等各种 PCR 要素逐渐不敷需求，导致反应的效率降低，产物生成的速度逐渐减缓，最终进入平台期。由于各种环境因素复杂的相互作用，不同的 PCR 反应体系进入平台期的时间和平台期的高低都有很大变化，即使是重复实验，各种条件基本一致，最后得到的 DNA 拷贝数也往往不同。因此经过 PCR 扩增的 DNA 产物量不能反映起始模板量的真实情况。通过传统凝胶电泳 EB 染色或者同位素标记只能定量 PCR 的终产物量，而不能定量起始 DNA 模板的拷贝数。而且 PCR 完毕后，需要对 PCR 产物进行凝胶电泳分

析, 不能对 PCR 的过程进行实时监测, 在处理的过程中容易交叉污染。这就需要有一种 PCR 技术能够定量起始 DNA 模板的拷贝数, 定量 PCR 技术应运而生。

Wang 等首先报道了定量技术用于 mRNA 的定量检测。因为 PCR 反应每个循环的产物均为下一个循环的底物, 并按指数级扩增, 所以可以用方程 $S = S_0 \cdot (1 + E)^n$ 来推算扩增产物, S_0 是初始模板核苷酸量, E 是扩增效率, n 是循环次数。但是 E 只能在有限的循环周期中保持相对恒定, 通常是 20~30 个循环, 随后扩增效应减慢直至 0, 扩增过程到达平台期, 此时, PCR 产物的积累不再依赖于初始模板核苷酸量。Morrisson 等 (1998) 在研究 PCR 扩增平台期时发现, 由于目的基因及引物初始浓度的差异, PCR 的平台期可在 15~25 个循环时出现。因而, 达到平台期的 PCR 循环次数是不能预测的, 必须用实验来确定平台期出现的循环数。在 PCR 扩增的指数增长过程终止前的循环数的多少取决于扩增效率 E 和起始样本的特异核苷酸序列丰度。对于一个给定的扩增片段, 起始样本的含量越大, 则指数扩增过程越短。 E 取决于诸多因素, 如引物和扩增序列的特性、组分的浓度及反应温度等。即使同时使用同样的试剂及操作、同等反应条件, PCR 管与管间的扩增效率也可能有明显差别, 这是因为影响产物量的任何一个因素的微小变化都会显著地改变产物的量。这些因素包括所用仪器反应条件, 如聚合酶、温度、底物浓度、 Mg^{2+} 浓度、循环次数、抑制物的存在、标本处理及模板降解等。

二、定量 PCR 技术现状及进展

定量 PCR 技术的提出不单是 PCR 技术的飞跃, 也是 DNA 定量技术的一次飞跃。经过不断发展完善, 出现了一系列的定量方法, 下面针对常见的一些方法做一些介绍。

PCR 产物的直接定量法: 因为不同样品的 PCR 产量是可以测定的, 由此可推算出每份样品在 PCR 扩增开始时的靶 DNA 的相对量。与设定的外源性标准作对照, 如先对未知量的靶 DNA 作系列稀释, 两者比较, 即可对未知量的靶 DNA 绝对定量。但是由于上述扩增效率差异, 对样品间 PCR 产量作比较会产生很不准确的结果。而且, 对 PCR 产物的定量必须在指数扩增期进行, 因为在平台期扩增产物的累积量并不受初始模板量的影响。必须对单一反应的多个不同时间点的产物量作直线回归分析才能获得可靠的统计学结果。由于此法简单, 故被许多学者用作粗糙的定量分析。

有限稀释法: 有限稀释法起初是用于细胞生物学的定量方法。对检测样本进行梯度稀释后做 PCR, 直至检测结果为阴性为止。这样即可以依据 PCR 检测阳性结果的最大稀释度结合外参照进行定量, 扩增产物的检测多采用凝胶电泳。为了增加这种定量方法的可重复性, 应使 PCR 过程最佳化, 一个或几个靶分子能被稳定检测出。在每个稀释度均应进行多次反应, 结果利用统计学泊松分布原理来计算。必须严格消除污染物, 以免假阳性干扰正常结果。这种方法的优点是定量不依赖扩增效率, 但需要对每份样品的各个稀释点做多次 PCR 反应, 工作繁琐, 系统误差大, 现在已经很少有人使用。

外对照定量 PCR 法: 外对照法是最简单的 PCR 定量方法。外对照通常是质粒, 一

个已知量的标准稀释系列,与待测样品中的靶序列用相同的引物在两管中分别扩增,由这个标准稀释系列 PCR 产物或起始物量获得标准曲线,即可推测出在同一 PCR 扩增循环中的样品靶序列的起始量。但这个定量过程必须在指数扩增期进行。这种方法甚至可以消除管与管之间的差异,但不能消除样本与样本之间的差异。

内对照定量 PCR 法:内对照 PCR 即在同样的反应条件下,在同一个 PCR 管中扩增来自同一 DNA 的一段靶序列和一段内对照序列。通过比较两种序列的扩增产量可对靶基因定量。只有当靶序列与内对照序列的起始量和扩增效率非常相似时,才能精确地对靶序列定量,这取决于选择不同引物最佳配比的经验。这种扩增效率的差异常发生在 PCR 的终末期,故应在指数扩增期对产物进行分析。由此可见,循环次数和初始模板 DNA 的量对结果的影响很大。内对照 PCR 可以消除管与管之间的变异,并在一定程度上消除样本与样本之间的变异。

而荧光定量 PCR 则是其中的佼佼者,所谓荧光定量技术,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监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

荧光定量 PCR 技术最早是在日本人 Higuchi 在 1992 年的一次报告中提出的。他当时的初衷很简单,就是想实时地看到 PCR 反应的整个过程,由于当时 EB (溴化乙啶)的广泛使用,最直接想到的标记染料就是 EB,其插入双链核酸中可受激发光。这样,在普通 PCR 仪的基础上配备一个激发和检测的装置,第一台可实时监测的 PCR 仪就诞生了。在 PCR 反应的复性或延伸时检测掺入到双链核酸中 EB 的含量就能实时监控 PCR 反应的进程,考虑到 PCR 反应的数学函数关系,结合相应的算法,通过加入标准品的方法,就可以定量待测样品中的目标基因。

1996 年当时的 PE 公司 (后来的 ABI) 推出了世界第一台商品化的荧光定量 PCR 仪。Heid 等 (1996) 首先就其原理及方法进行了报道。由于该技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,而且具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点,目前已在动植物基因工程、微生物和医学等领域中得到广泛应用。标记方法也由最初的染料法,逐渐发展到了特异性更高的 TaqMan 探针法,以及 Molecular Beacon、FRET 等不同方法的标记探针。2002 年,美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems) 推出了一种 TaqMan 荧光探针,此种探针分子在 3' 端连接了非荧光猝灭剂及 MGB (minor groove binder),非荧光猝灭剂有效减低了本底,使荧光光谱分辨率得以大大改善;MGB 结合物使得探针的 T_m 值提高,大大增加了探针的杂交稳定性。FRET 复合探针技术很大程度上综合了上述探针的优点。此外,还出现了一种通用模板信号扩增技术 UT-PCR,是在 TaqMan 荧光定量 PCR 基础上建立起来的,主要是使用通用模板与通用荧光探针,实现了快速多基因多位点同时检测,使 PCR 高通量化检测成为可能。UT-PCR 利用了 TaqMan 荧光定量 PCR 的检测原理,特异性强、稳定性好、灵敏度高、污染小而且自动化程度高,同时由于 UT-PCR 使用通用模板与通用探针,较之普通的荧光定量 PCR 假阴性低,准确性高,能实现多基因多位点同时检测。

在荧光定量 PCR 技术的发展中,两个重要的发现起了关键性的作用:首先是在 20

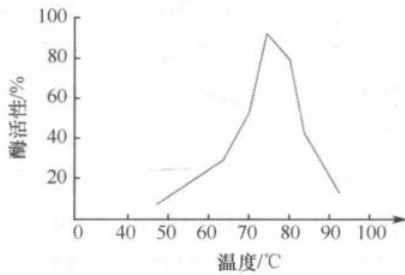


图 1-1 Taq DNA 聚合酶

世纪 90 年代早期, Taq DNA 聚合酶的 5'核酸外切酶活性的发现, 它能降解特异性荧光探针, 因此使得间接的检测 PCR 产物成为可能。此后荧光双标记探针的运用使在一密闭的反应管中能实时地监测反应全过程。这两个发现的结合以及相应的仪器和试剂的商品化发展导致实时定量 PCR (real-time quantitative PCR) 方法在研究工作中的大量运用 (图 1-1)。

在实时定量 PCR 反应体系中, 荧光标记物有两种: 荧光探针标记和荧光染料标记。目前常见的基于 FRET 技术的荧光杂交探针 (引物) 主要有 FRET 探针、TaqMan 探针、分子信标及蝎形引物等; 荧光染料标记中最为常用的是 SYBR Green 荧光染料。可避免常规 PCR 技术中, 在产物扩增后的一系列繁琐操作, 如: 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色、荧光标记、放射性标记等以及溴化乙啶的致癌作用。杂交技术的特异性较高, 理论上 20bp 的序列只有 1/420 的相同概率, 因此使用 TaqMan 探针不仅简便、快捷、准确, 而且具有特异性强的特点。

三、定量 PCR 技术的展望

荧光定量 PCR 技术是目前发展起来的快速、精确定量核酸的最有效的方法之一, 自 1996 年面世以来, 短短的几年就被广泛应用到生物学各个领域, 涉及的范围包括 DNA、mRNA 和病毒荷载量的定量, 核酸多态性分析, 基因突变分析等多个领域。但在实时定量 PCR 技术中, 无论是相对定量还是标准曲线定量方法仍存在一些 PCR 定量方法均有的问题有待解决。在标准曲线定量中, 标准品的制备是一个必不可少的过程。目前由于无一统一标准, 各个实验室所用的生成标准曲线的样品各不相同, 致使实验结果缺乏可比性。此外, 用实时定量 PCR 来研究 mRNA 时, 受到不同 RNA 样本存在不同的反转录 (RT) 效率的限制。在相对定量中, 其前提是假设内源控制物不受实验条件的影响的, 合理地选择合适的不受实验条件影响的内源控制物也是实验结果可靠与否的关键。

但是荧光定量 PCR 与常规 PCR 相比, 具有许多优点, 荧光探针的使用, 可以通过光电传导系统直接探测 PCR 扩增过程中荧光信号的变化以获得定量结果, 所以还具有 DNA 杂交的高特异性和光谱技术的高精确性, 进一步提高目的基因检测的特异性。光谱技术与计算机技术的联合应用提高了灵敏度, 有效地减少了劳动量。TaqMan PCR 使用氩激光来激发荧光的产生, 利用荧光探测仪检测荧光信号的大小, 通过计算机的分析软件进行分析, 大大提高了灵敏度, 可以检测到单拷贝的基因, 这是常规 PCR 难以做到的。有效避免了污染。常规的 PCR 在扩增结束后需要琼脂糖凝胶电泳和溴化乙啶染色紫外光下观察结果或通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测, 除了有污染外, 还对人体产生一定的伤害, 而荧光定量 PCR 是在全封闭状态下实现扩增及产物分析, 有效地减少了污染及对人体的伤害。能精确定量。由于 PCR 的平台效应, 常规的 PCR 不能进

行精确的定量,而荧光定量 PCR 由于利用扩增进入指数增长期的 C_t 值来定量起始模板的量,实现了极为精确的核酸定量检测。不过,Real-time PCR 尚有以下不足之处:①由于运用了封闭的检测,减少了扩增后电泳的检测步骤,因此也就不能监测扩增产物的大小;②因为荧光素种类以及检测光源的局限性,从而相对地限制了实时定量 PCR 的复合式(multiplex)检测的应用能力;③目前实时定量 PCR 实验成本比较高,从而也限制了其广泛的应用。

随着科学技术水平的发展,我们相信定量 PCR 将以其独特的优势在分子生物学、生物学和医学的基础研究和应用研究方面发挥更多更大的作用。另外,基因分析的定量化和均相化是未来基因诊断的发展趋势,目前在该领域的研究刚刚开始,仍有许多问题需要解决,如分析灵敏度及重复性问题、自动化仪器和试剂成本、样品处理及多基因同时分析等问题。生物芯片技术与荧光探针定量技术的结合将有助于上述问题的解决,届时将大大推动该技术在生命科学领域的应用普及,特别是临床诊断领域的推广。

第二节 荧光定量 PCR 的原理与特点

荧光定量 PCR 技术,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

荧光染料能特异性掺入 DNA 双链,发出荧光信号,而不掺入双链中的染料分子不发出荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物增加完全同步。荧光探针是将荧光共振能量传递(FRET)技术应用于常规 PCR 中,在探针的 5' 端标记一个荧光报告基团(R),3' 端标记一个猝灭基团(Q),两者可构成能量传递结构,即 5' 端荧光基团所发出的荧光可被猝灭基团吸收或抑制,当两者距离较远时,抑制作用消失,报告基团荧光信号增强,荧光监测系统可接收到荧光信号。利用以上荧光产生原理,在 PCR 过程中可以连续不断地检测反应体系中荧光信号的变化。

当信号增强到某一阈值(PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,阈值的缺省设置为 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍)时, C_t 值被记录下来,每个模板的 C_t 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多, C_t 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,其中横坐标代表起始拷贝数的对数,纵坐标代表 C_t 值。这样,只要获得未知样品的 C_t 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

一、荧光定量 PCR 定量的理论模式

特定的待扩增基因片段起始含量越大,则指数扩增过程越短,当扩增速率趋于稳定后,则无论原来样品中起始模板含量多少,最终扩增片段的含量通常是一样的。理想的扩增结果: $Y = X \cdot 2^n$ 其中 Y 代表扩增产物量, X 代表 PCR 反应体中的原始模板数, n 为扩增次数;理论上 PCR 扩增效率为 100%, PCR 产物随着循环的进行成指数增长,

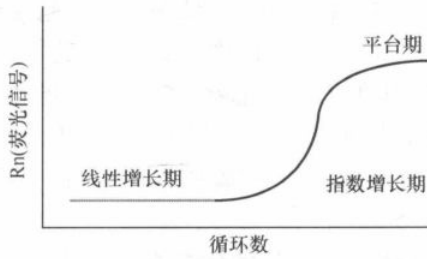


图 1-2 荧光扩增曲线

但随着循环次数 n 的增加 (>30 次), E 值逐渐减少, Y 呈非固定的指数形式增加, 最后进入平台期 (图 1-2)。

但实际上 DNA 的每一次复制都不完全, 即每一次扩增中, 模板都不是呈 2 的倍数增长; 实际应为: $Y = X \cdot (1 + E)^n$, 其中 E 代表扩增效率; $E = \text{参与复制的模板} / \text{总模板}$, 通常 $E \leq 1$, E 在整个 PCR 扩增过程中不是固定不变的。通常 X 在 $1 \sim 10^5$ 拷贝, 循环次数 $n \leq 30$ 时, E 相对稳定, 原始模板以相对固定的指数形式增加, 适合定量分析, 这也就是所谓的指数期; 随着循环次数

二、荧光阈值和 Ct 值

(一) 荧光阈值的设定

荧光阈值 (threshold) 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, 但一般我们将荧光阈值的缺省设置是 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍 (图 1-3)。

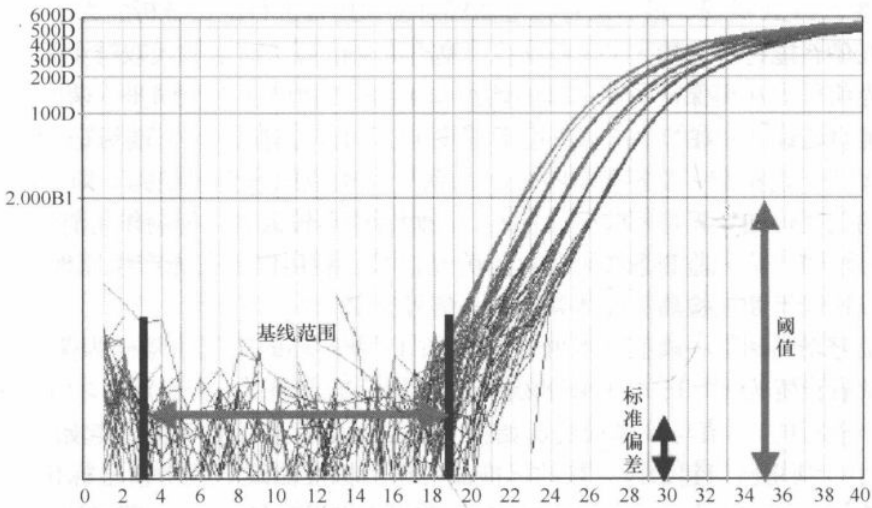


图 1-3 荧光阈值的确定

(二) Ct 值的定义

在荧光定量 PCR 技术中, 还有一个很重要的概念——Ct 值。C 代表 cycle, t 代表 threshold, Ct 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数 (图 1-4)。

Ct 值取决于阈值, 阈值取决于基线, 基线取决于实验的质量, Ct 值是一个完全客观的参数。研究表明, 每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,

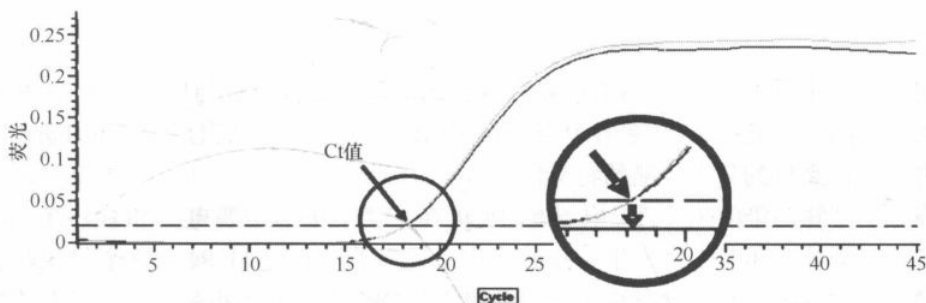


图 1-4 Ct 值的确定

起始拷贝数越多, Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可做出标准曲线。因此, 只要获得未知样品的 Ct 值, 即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。正常的 Ct 值范围在 18~30 之间, 过大和过小都将影响实验数据的精度。

Ct 值与模板 DNA 的起始拷贝数成反比。这一结论可以从数学上严格证明。为使表达式简便, 以下推导忽略 PCR 效率等细节。如果考虑这些因素, 可以在方程上增加修正项。这些修正项的增加并不改变方程的线性性质。

一般地, 我们有 $R_n = RB + X_0(1 + EX)^n R_s$, 也就是说第 n 次 PCR 循环时的荧光信号强度 (R_n) 等于背景信号强度 (RB) 加上每个分子的荧光强度 (即单位荧光强度, R_s) 与分子数目的乘积。当循环次数 $n = Ct$ 时, 则有 $R_T = RB + X_0(1 + EX)^{Ct} R_s$ 。两边取对数, 得 $\log(R_T - RB) = \log X_0 + Ct \log(1 + EX) + \log R_s$ 。整理此式, $Ct \log(1 + EX) = -\log X_0 + \log(R_T - RB) - \log R_s$ 。

$$Ct = -\frac{\log X_0}{\log(1 + EX)} + \frac{\log(R_T - RB) - \log R_s}{\log(1 + EX)}$$

所以对于每一个特定的 PCR 反应来说, EX 、 R_T 、 RB 和 R_s 都是常数, 所以 Ct 值与 $\log X_0$ 成反比, 也就是说, Ct 值与起始模板拷贝数 (X_0) 的对数成反比, 起始 DNA 浓度每增加 1 倍, Ct 值减小 1 个循环。根据 Ct 值的定量是精确和严格的, 而传统的终点定量则比较粗放。

三、荧光定量 PCR 技术的特点

(一) 敏感性

实时荧光定量 PCR 技术的敏感度通常达 10^2 个/ml, 且线性范围很宽, 为 $0 \sim 10^{11}$ 个/ml。一般来讲临床标本中病原体的数目为 $0 \sim 10^{10}$ 个/ml, 在此范围内 FQ-PCR 定量较为准确, 标本不需稀释。同时实时荧光定量 PCR 应用了光谱技术, 与计算机技术相结合有较多的优点, 有效地减少了劳动量。如 TaqMan PCR 使用氩激光来激发荧光的产生, 利用荧光探测仪检测荧光信号的大小, 通过计算机的分析软件进行分析, 灵敏度达到了极限, 可以检测到单拷贝的基因, 这是传统的 PCR 难以做到的, 敏感性大大提高。

(二) 特异性

实时荧光定量 PCR 技术具有引物和探针的双重特异性,故与传统的 PCR 相比,特异性大为提高。荧光探针的使用相当于在 PCR 的过程中自动完成了 Southern 印迹杂交,进一步提高目的基因检测的特异性。

降低了产物污染的风险性,传统的 PCR 在扩增结束后需要电泳和紫外光下观测结果除了有污染外,还对人体产生一定的伤害,而荧光实时定量 PCR 在全封闭状态下实现扩增及产物分析,有效地减少了污染及对人体的伤害。在大批量的标本检测中能有效地减少劳动量。

(三) 可重复性

实时荧光定量 PCR 技术结果相当稳定,同一标本的 C_t 值相同,但是其产物的荧光量却相差很大。因为阈值设置在指数扩增期,在此阶段,各反应组分浓度相对稳定,没有副作用, C_t 值与荧光信号的对数呈线性关系。而当 PCR 反应进入平台期后,由于反应体系各组分的耗尽,酶活性的降低及产物的反馈抑制等原因导致产物不再增加。与终点法相比 C_t 值能更稳定,更精确地反映起始模板的拷贝数。同时,因 PCR 是对原始待测核酸模板的一个扩增过程,任何干扰 PCR 指数扩增的因素都会影响扩增产物的量,如扩增孔间温度差异、标本中 DNA 聚合酶抑制剂的存在、加样的差异和待测标本中核酸模板的量等。因此,在扩增产物的数量与起始模板数量之间没有一个固定的比例关系,通过检测核酸产物很难对原始模板准确定量。

(四) 其他优点

TaqMan 技术的优点还在于由于全程的闭管操作,没有 PCR 的后处理过程,因此污染率降低,克服了常规 PCR 污染率高造成假阳性的致命弱点。又由于其标准曲线的动力学范围广,为精确定量提供了较大的可信区间。TaqMan 技术采用的是外标准曲线的定量方法,它比内标法和半定量法要准确得多,而且,荧光探针高度重现性的特点保证了定量检测的稳定性。另外,定量过程的全自动化、高效率为其商品化提供了可行办法。

实时荧光定量 PCR 技术使用了“内对照”系统,可校正 PCR 效率获得定量结果。实时荧光定量 PCR 技术使用即时法,有效地解决了传统定量只能终点检测的局限,实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度,并记录在电脑软件中, C_t 值代表样品的浓度,通过对每个样品 C_t 值的计算,常规法须在 PCR 完成后测出全部的 PCR 产物量,再确定原样品浓度。实时荧光定量 PCR 技术无需内标而采用外标准曲线定量,其原理根据 C_t 值的重现性以及 C_t 值与起始模板的线性关系。用实时荧光定量 PCR 技术检测,循环数约 20~24 个,而常规 PCR 法需使用 34 个循环。

第三节 荧光定量 PCR 的类型

实时荧光定量 PCR, 通过荧光染料或荧光标记的特异性的探针, 对 PCR 产物进行标记跟踪, 实时在线监控反应过程, 对样品扩增的整个过程进行实时监控, 实时地观察到产物的增加, 直观地看到反应的对数期, 结合相应的软件可以对结果进行分析, 计算待测样品的初始模板量。

荧光定量 PCR 主要包括荧光内参染料法和序列特异性探针法两大类。

一、荧光内参染料法

SYBR Green I 是一种结合于小沟中的双链 DNA 结合染料, 这一性质使其用于扩增产物的检测非常理想。SYBR Green I 与 dsDNA 结合荧光信号可增强 800~1000 倍。在 PCR 反应体系中, 加入过量 SYBR Green I 荧光染料, SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后, 荧光信号增强, 而不掺入链中的 SYBR Green I 染料分子荧光不变, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。荧光可以在复性阶段或者延伸阶段测定 (图 1-5)。

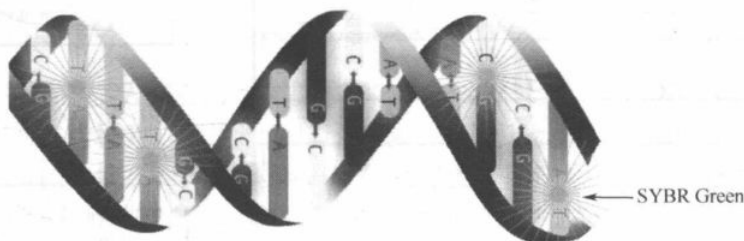


图 1-5 SYBR Green I 能结合到双链 DNA 的小沟部位

SYBR Green I 的最大吸收波长约为 497nm, 发射波长最大约为 520nm。在 PCR 反应体系中, 加入过量 SYBR 荧光染料, SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后, 发射荧光信号, 而不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步 (图 1-6)。

SYBR Green I 在核酸的实时检测方面有很多优点, 由于它与所有的双链 DNA 相结合, 不必因为模板不同而特别定制, 因此设计的程序通用性好, 且价格相对较低。利用荧光染料可以指示双链 DNA 熔点的性质, 通过熔解曲线分析可以识别扩增产物和引物二聚体, 因而可以区分非特异扩增, 进一步地还可以实现单色多重测定。此外, 由于一个 PCR 产物可以与多分子的染料结合, 因此 SYBR Green I 的灵敏度很高。但是, 由于 SYBR Green I 与所有的双链 DNA 相结合, 因此由引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性。通过测量升高温度后荧光的变化可以帮助降低非特异产物的影响。由解链曲线来分析产物的均一性有助于分析由 SYBR

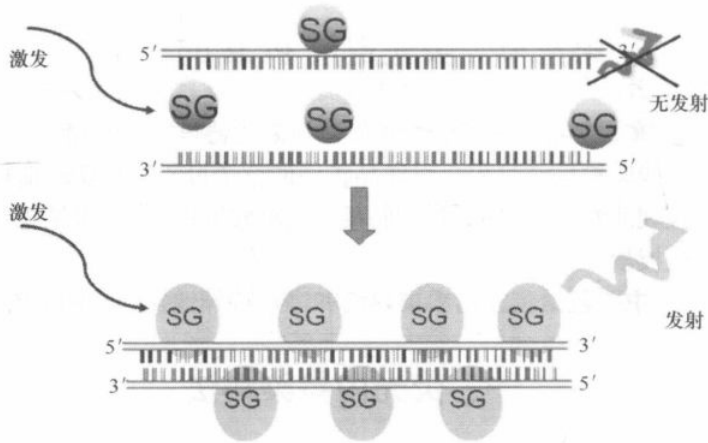


图 1-6 SYBR Green I 工作原理

Green I 得到定量结果 (图 1-7)。

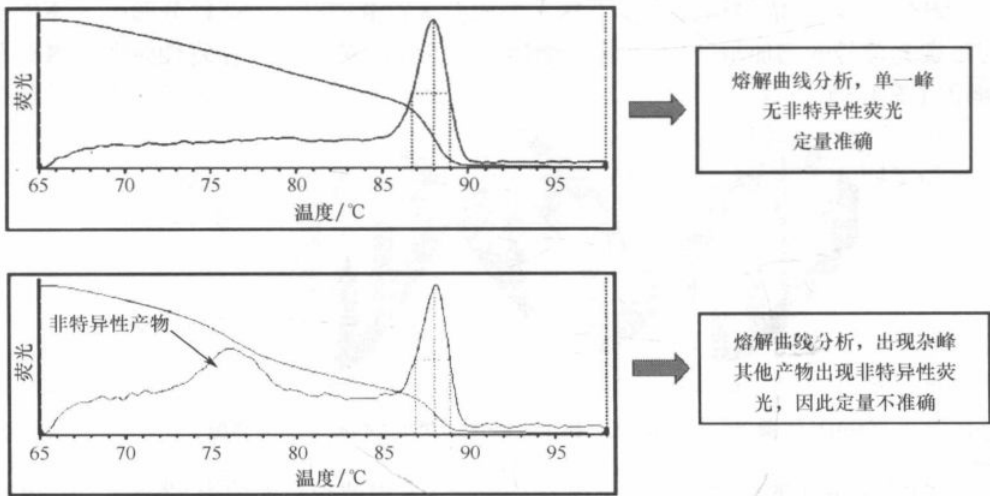


图 1-7 熔解曲线 (melting curve) 分析

SYBR Green I 可能影响到结果准确性的一些因素如下。

(一) 染料使用浓度的影响

SYBR Green I 荧光定量 PCR 的试验成功有很多因素，但是 SYBR Green I 的使用浓度是非常关键的因素，如果 SYBR Green I 的浓度过低会使荧光信号的变化降低。这就意味着低拷贝的样品可能无法检出；而在高浓度时，将会抑制 PCR 反应。降低 PCR 反应效率。所以一般在使用 SYBR Green I 时应根据实际情况优化使用浓度，反应的终浓度为 $1\times$ 到 $0.2\times$ 之间。