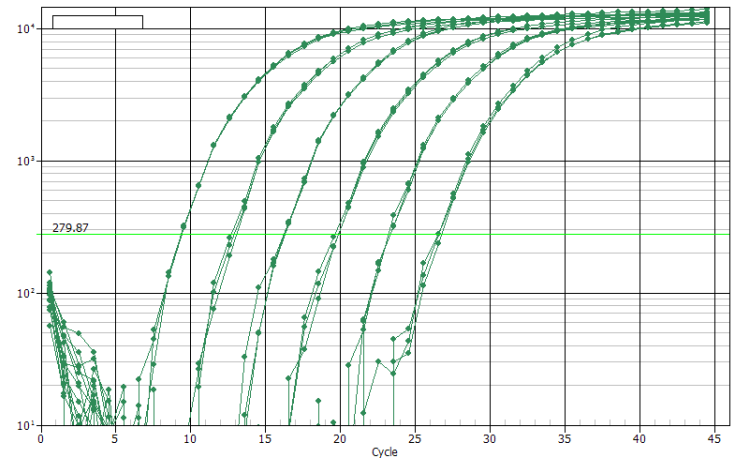


# 实时荧光定量PCR原理与应用



- PCR
- 定量PCR
- 荧光化学监测物质
- 实时荧光定量PCR应用

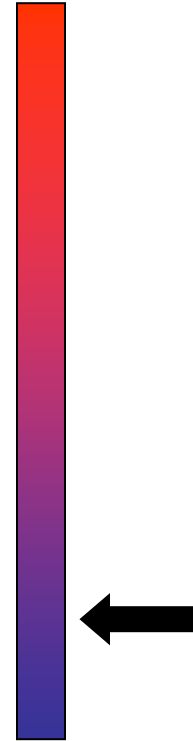
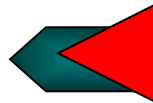
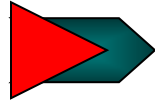




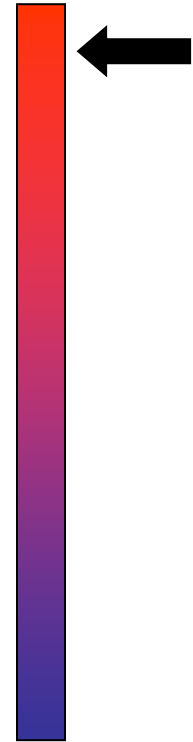
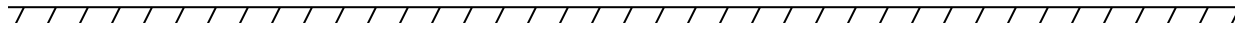
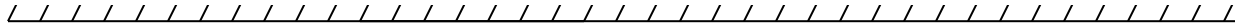
# PCR目的及背景

- 多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction) 简称 P C R 技术，是 8 0 年代中期发展起来的一种体外扩增特异 D N A 片段的技术。此法操作简便，可在短时间内在试管中获得数百万个特异的目的 D N A 序列的拷贝。
- 分子克隆，目的基础检测，遗传病的基因诊断，法医学，考古学等方面得到了广泛的应用。
- P C R 技术实际上是在模板 D N A，引物和 4 种脱氧核苷酸存在的条件下依赖于 D N A 聚合酶的酶促合反应，P C R 技术的特异性取决于引物和模板 D N A 结合的特异性。反应分三步：① 变性 (denaturation)；② 退火 (annealing)；③ 延伸 (ex tension)，反应过程见图。

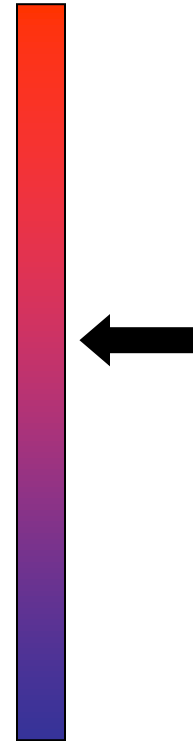
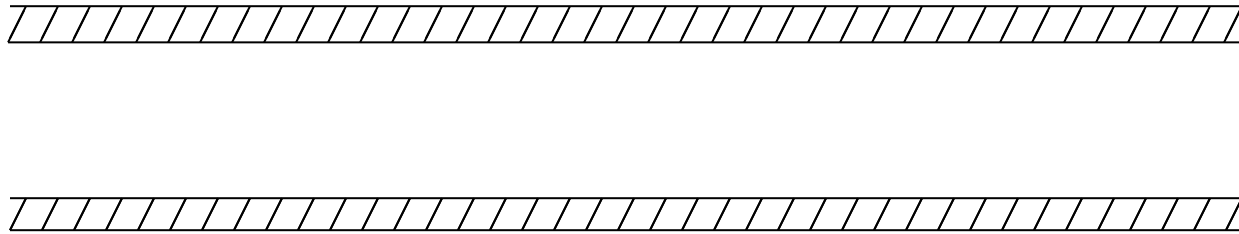
# 传统 PCR



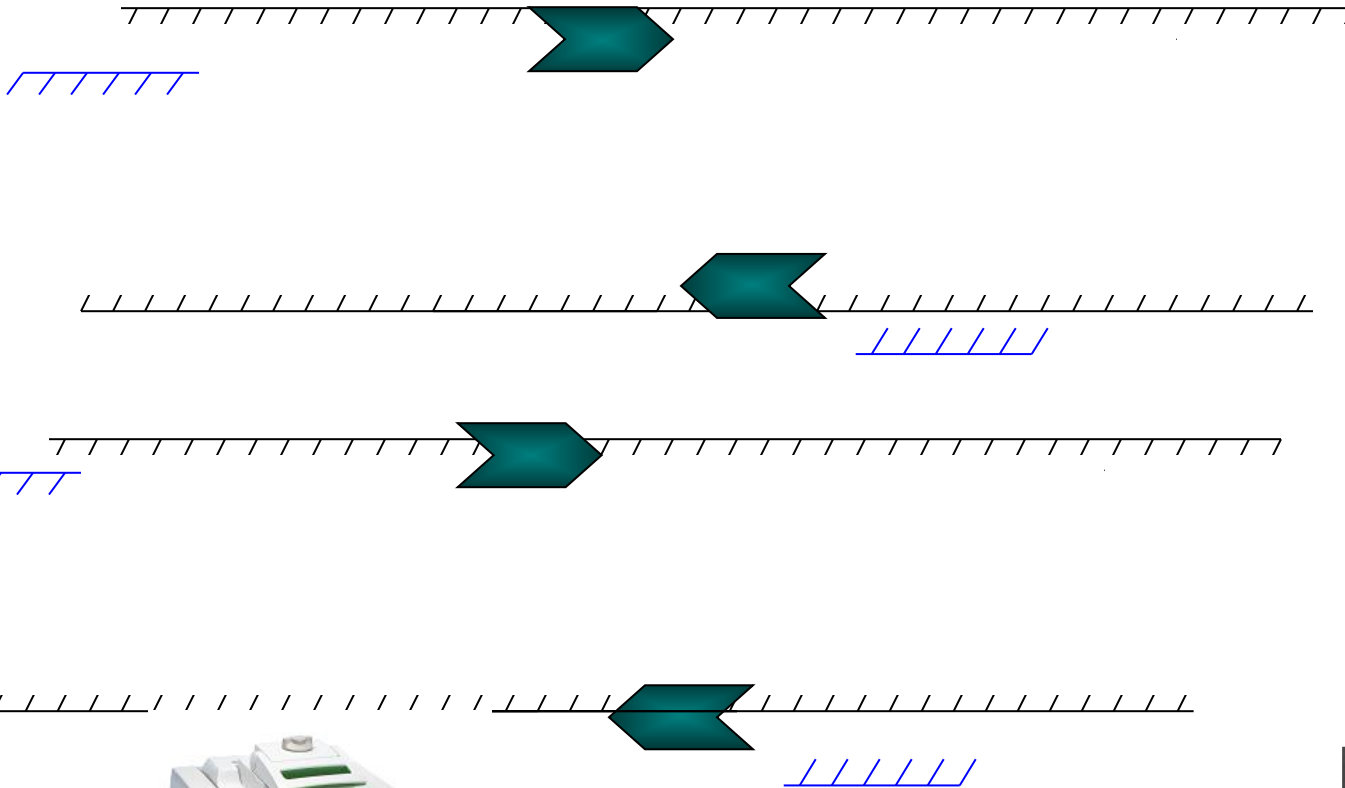
# 传统 PCR



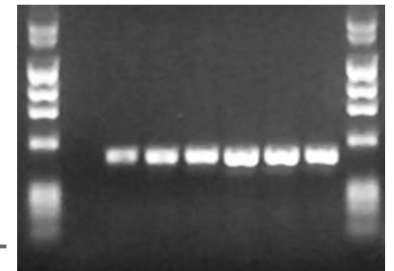
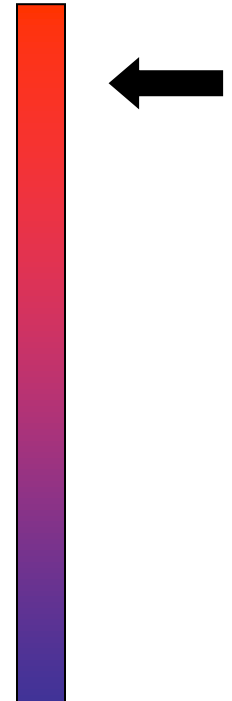
# 传统 PCR



# 传统 PCR

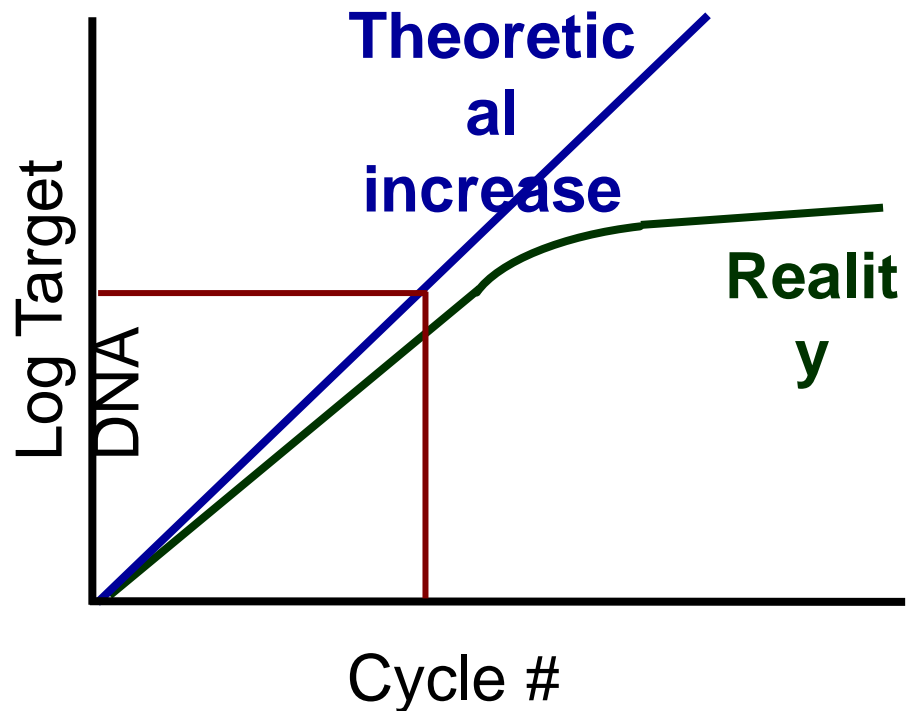


通过凝胶电泳对终产物进行定性分析  
(30 cycles)



# PCR: 理论vs. 实际

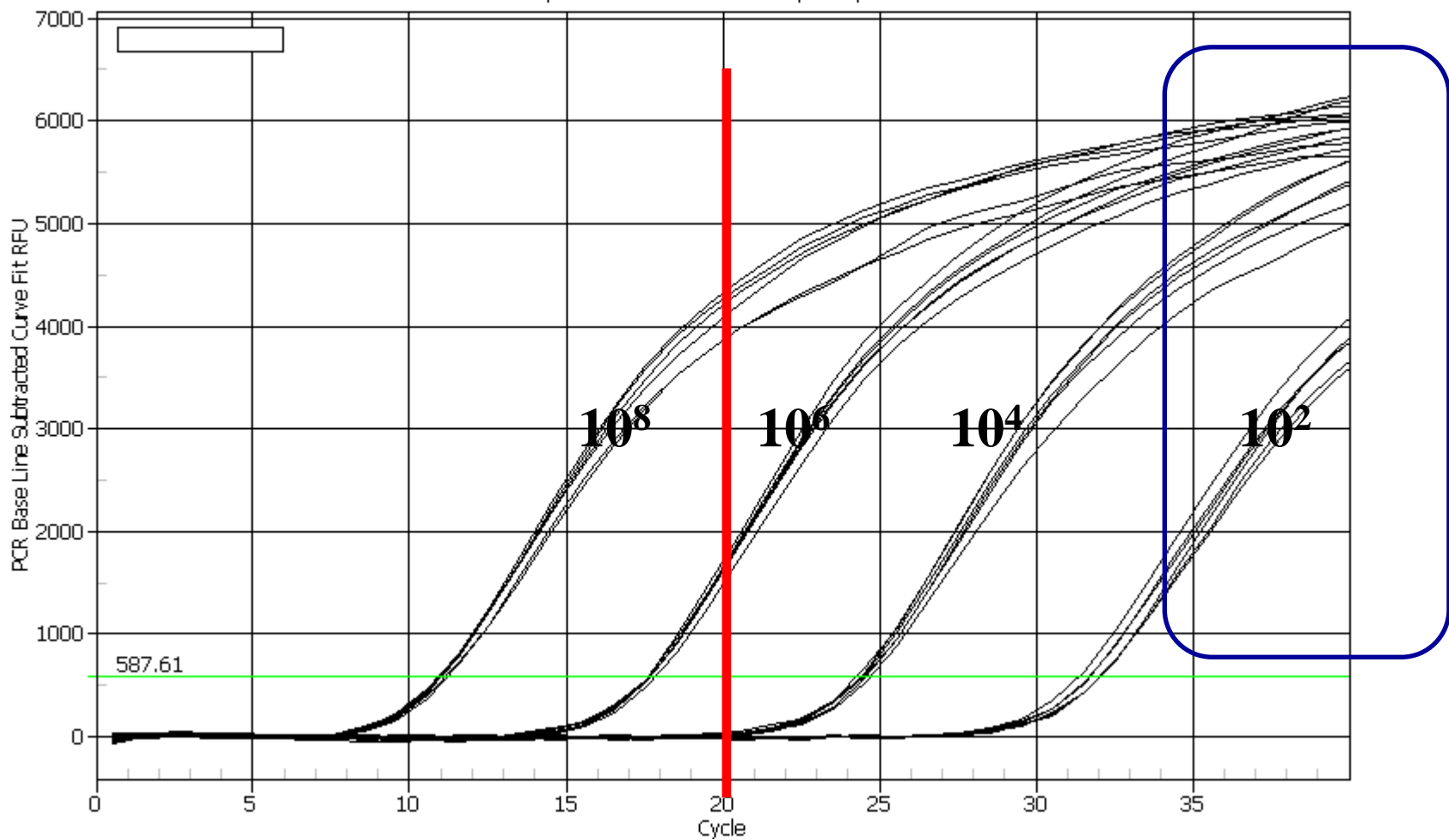
- In theory, PCR reactions amplify exponentially, doubling every cycle and grow forever.
- In reality,



# 普通PCR分析终产物特点

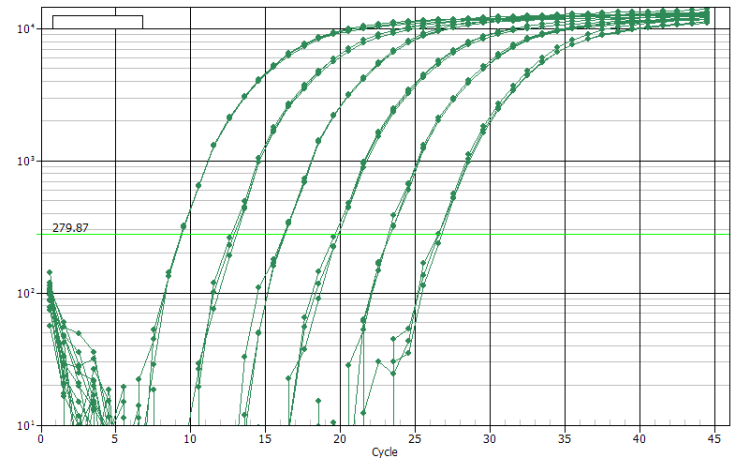


Amplification Chart : SYBR AmpMC.opd

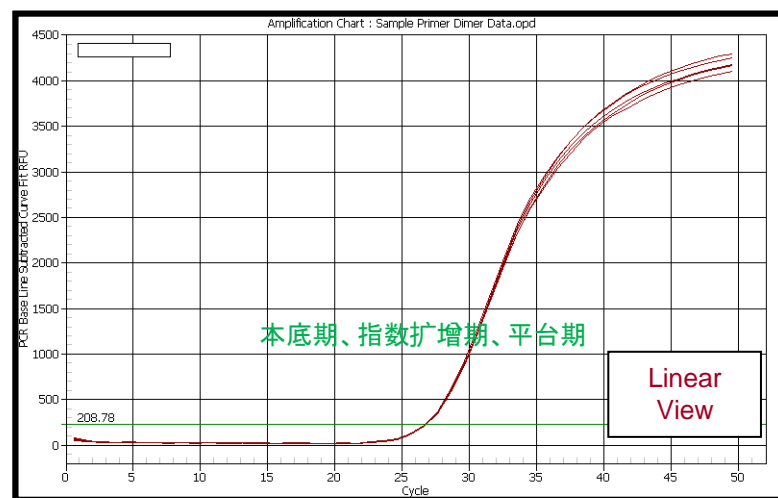
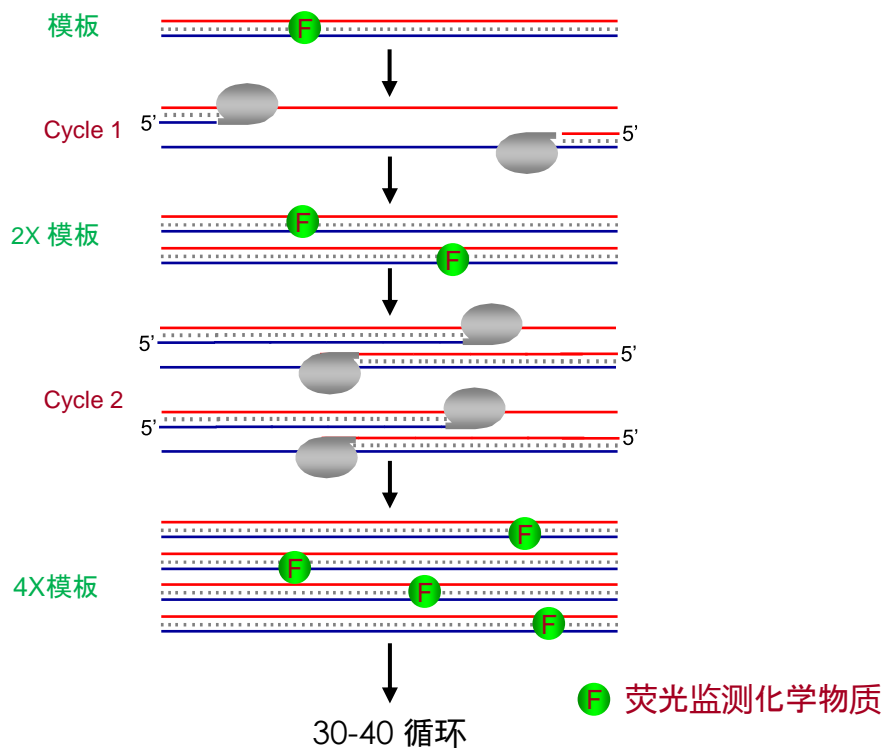


100 倍稀释

- PCR
- 定量PCR
- 荧光化学监测物质
- 实时荧光定量PCR应用



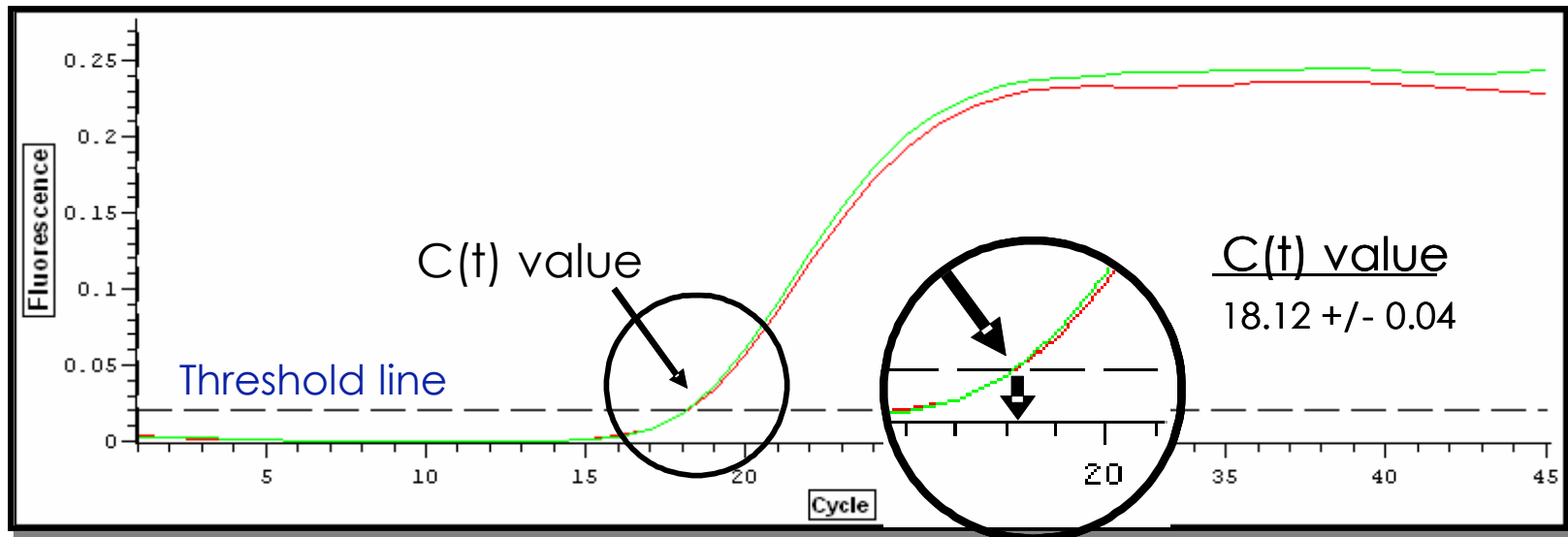
## 通过Ct值和标准曲线实现对起始模板的定量分析



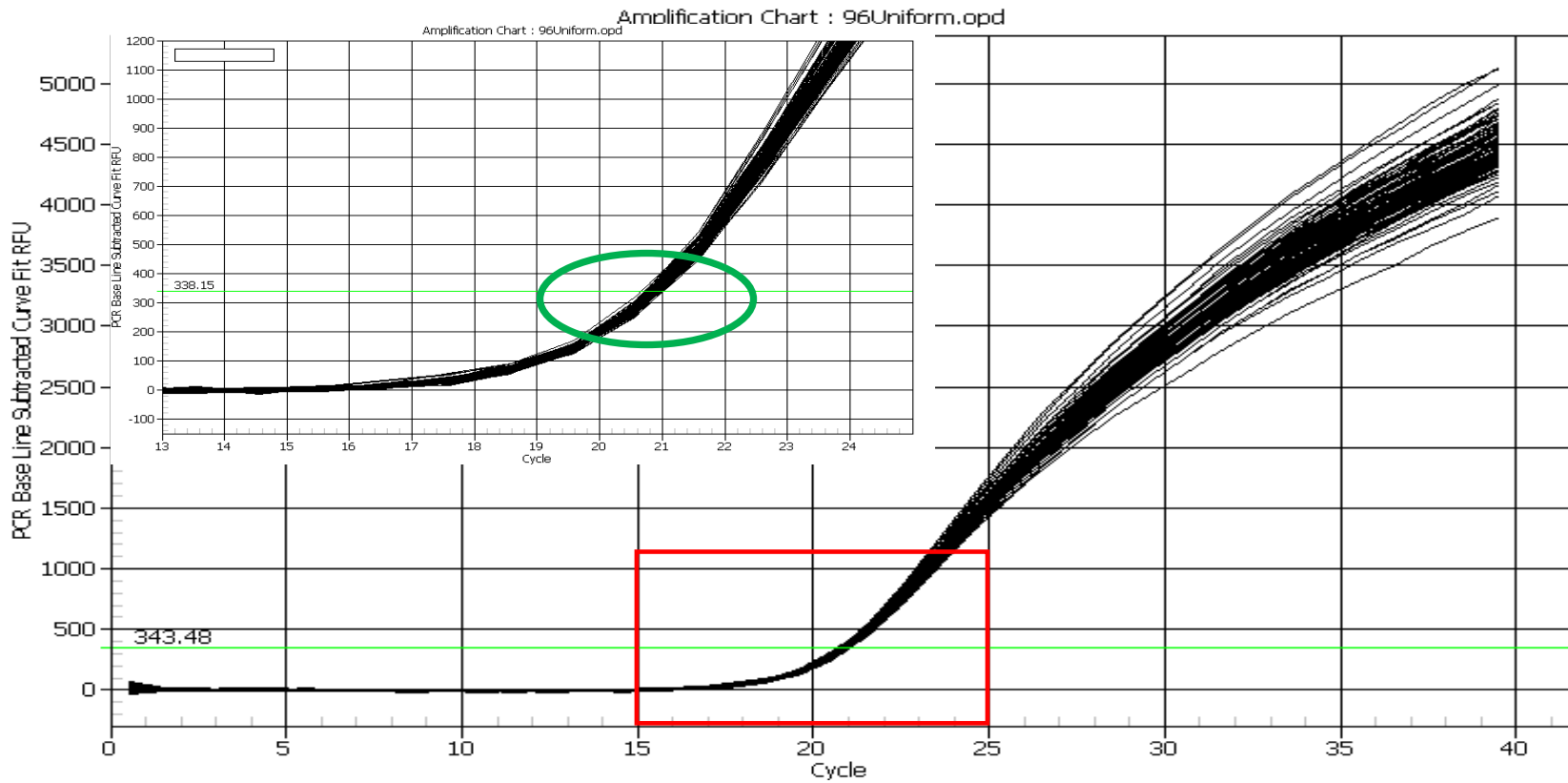
荧光检测

# 荧光阈值与Ct值

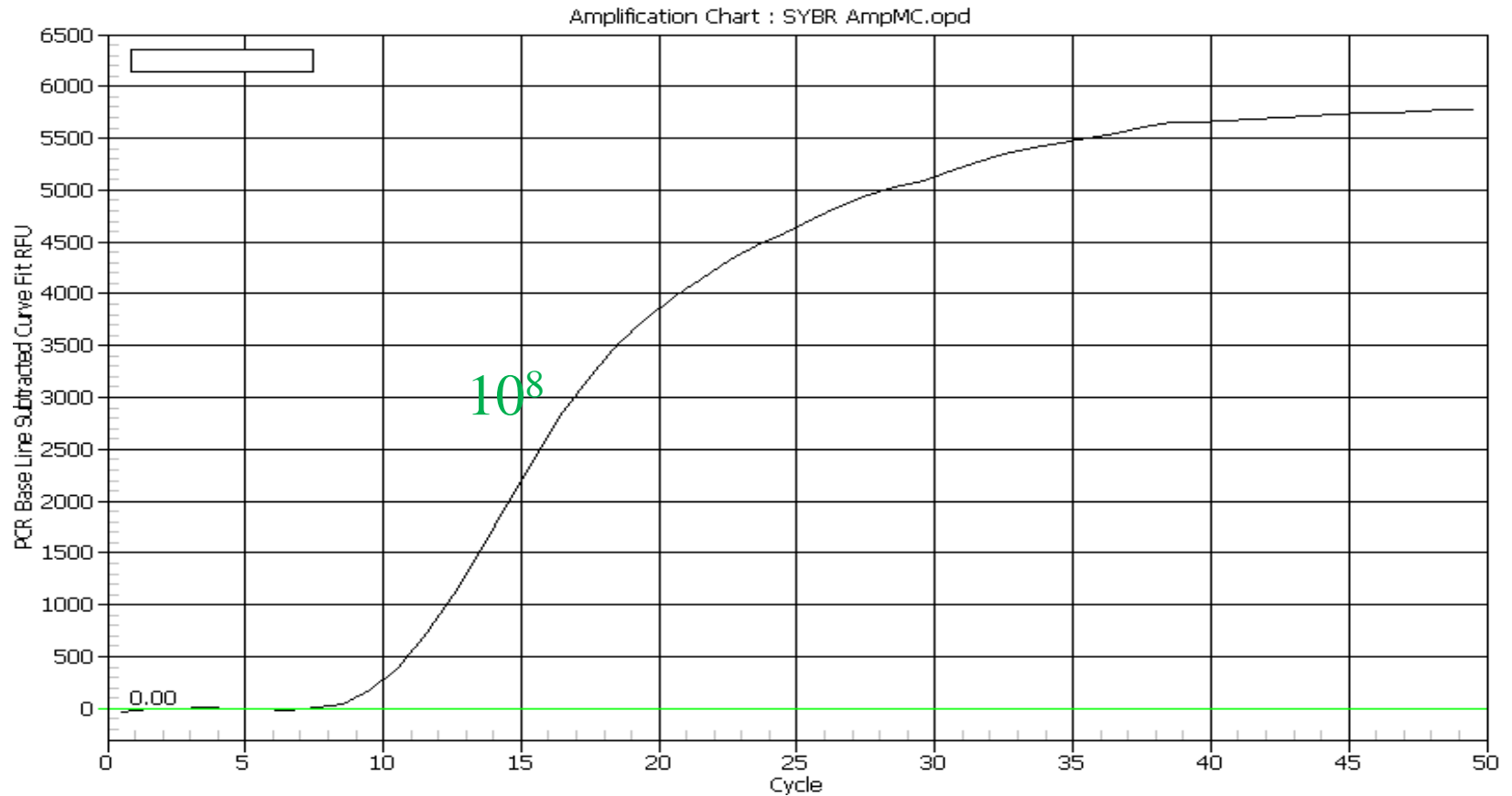
- 荧光阈值: 在荧光扩增曲线指数增长长期设定一个 **荧光强度标准** (即PCR扩增产物量的标准)
- Ct值的定义是PCR扩增过程中, 扩增产物(荧光信号)到达阈值时(进入指数增长长期)所经过的扩增 **循环次数**



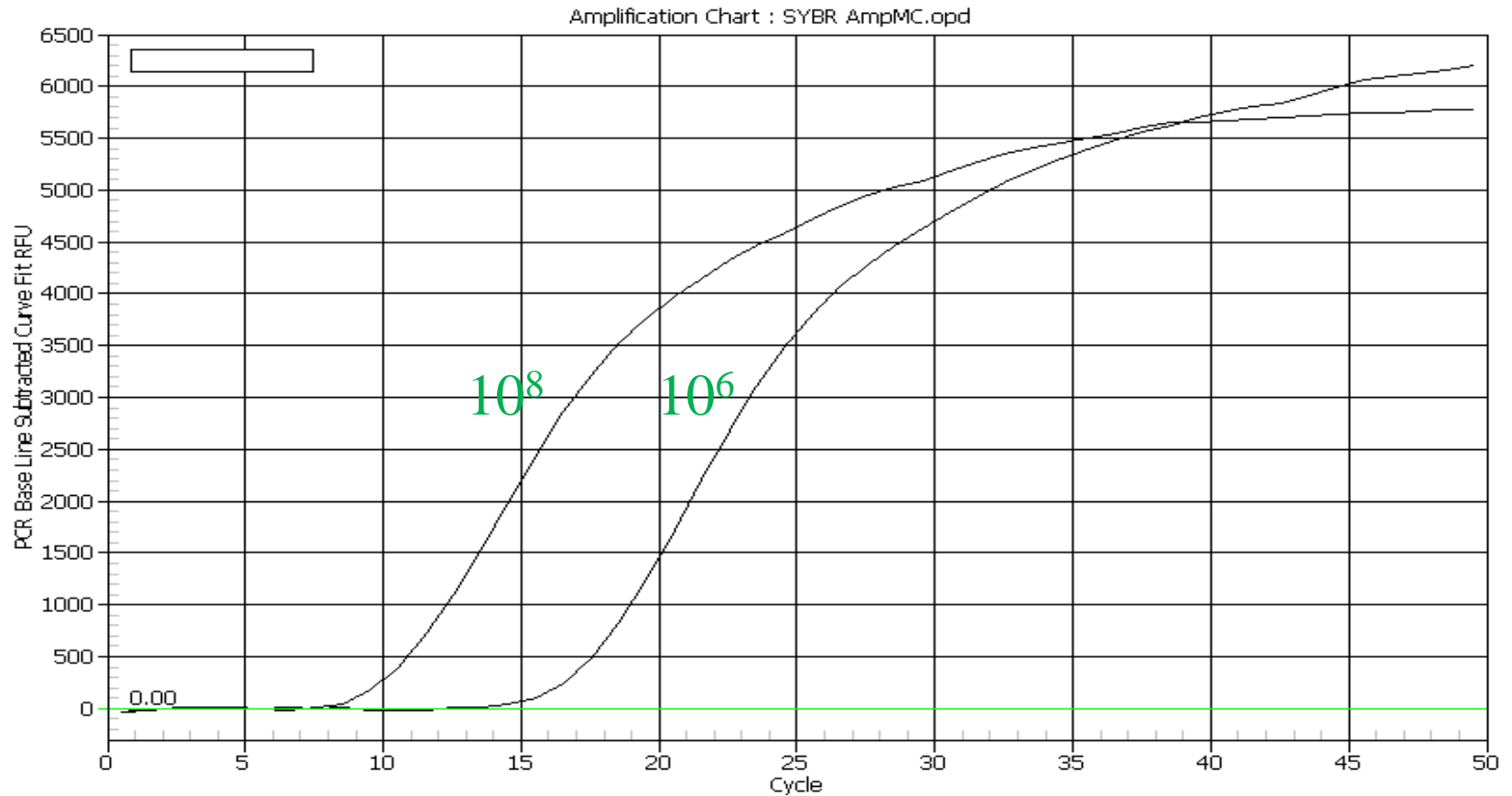
# 定量PCR分析初始模板特点



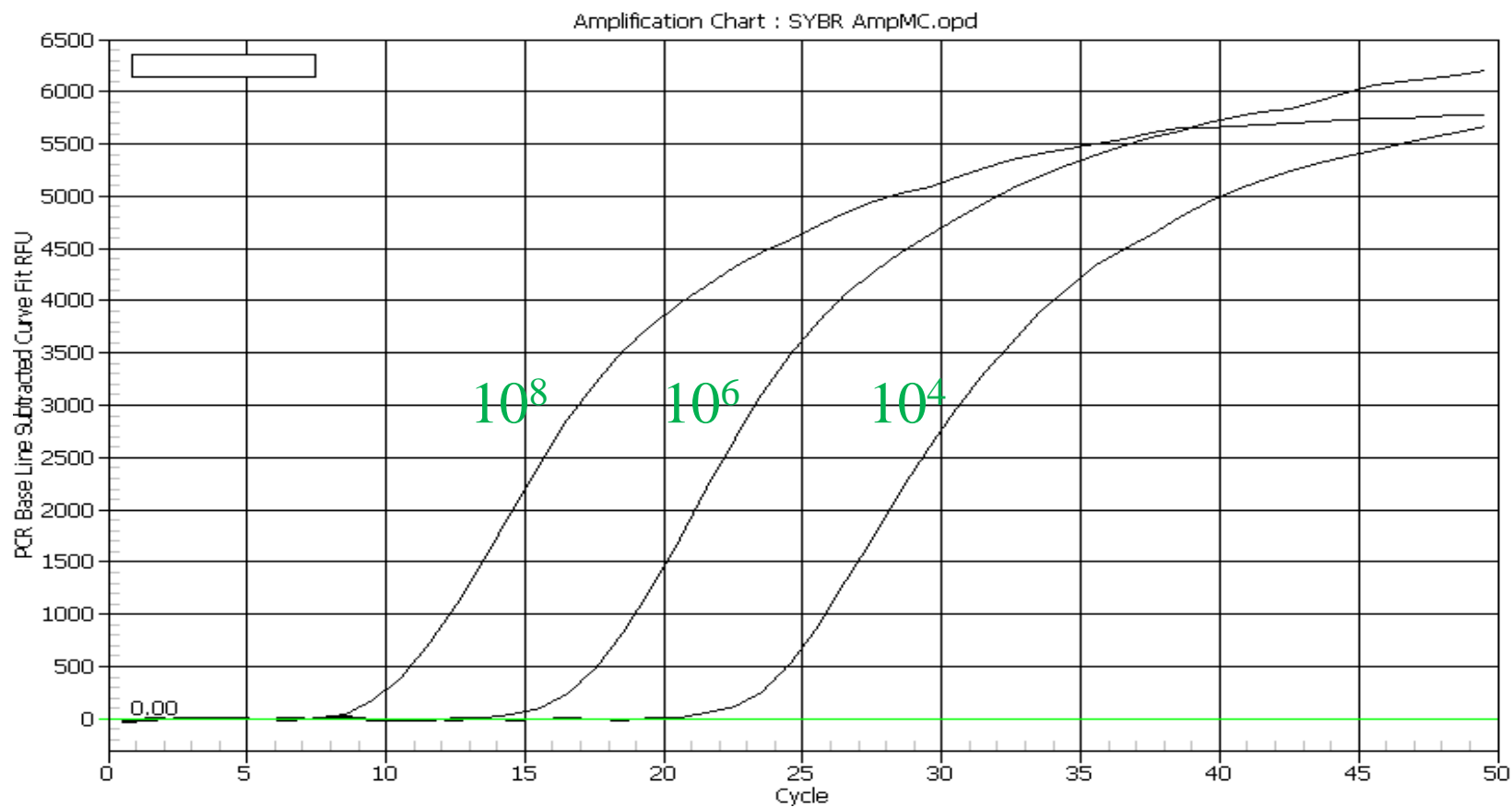
# 标准曲线



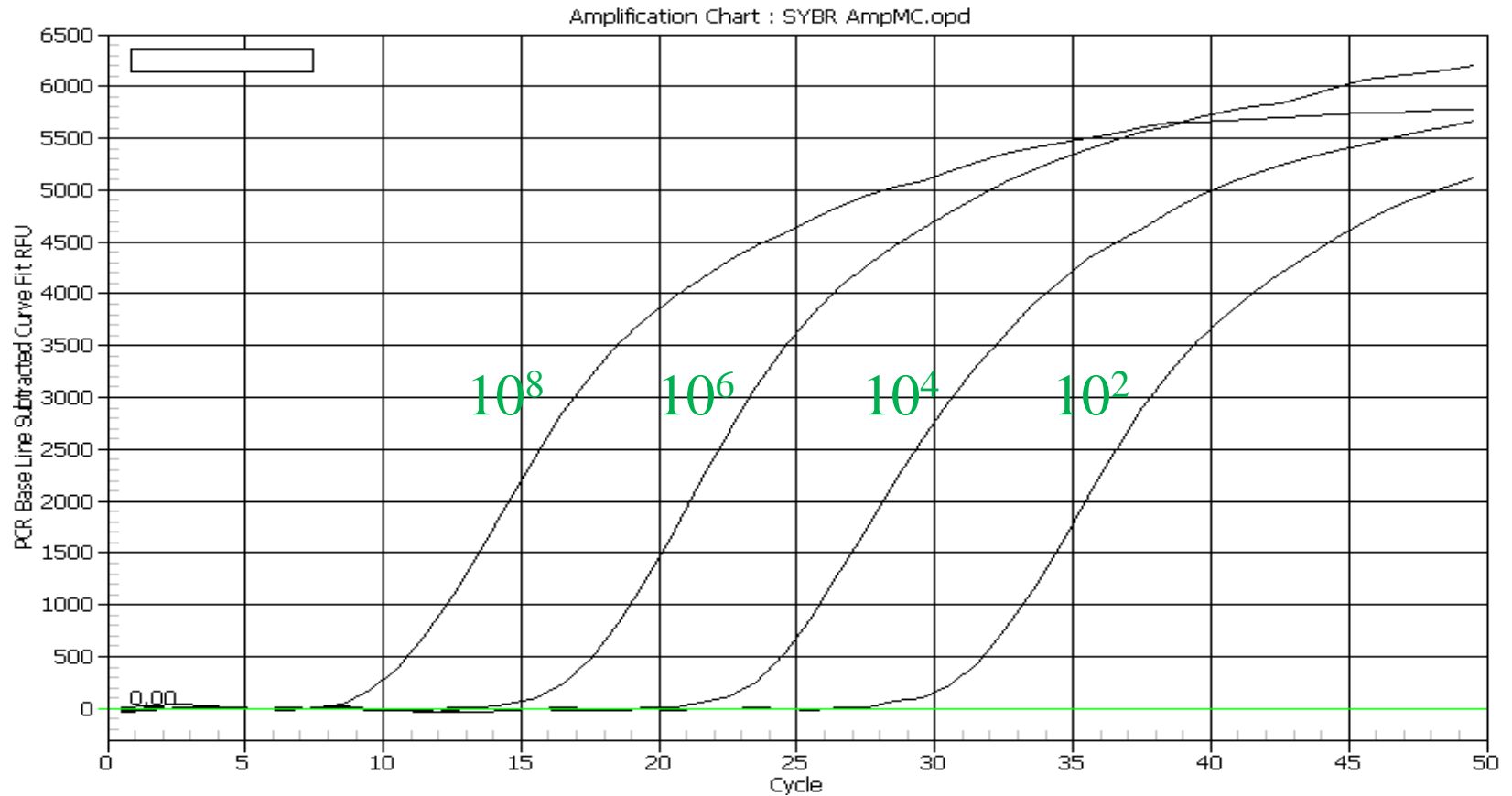
# 标准曲线



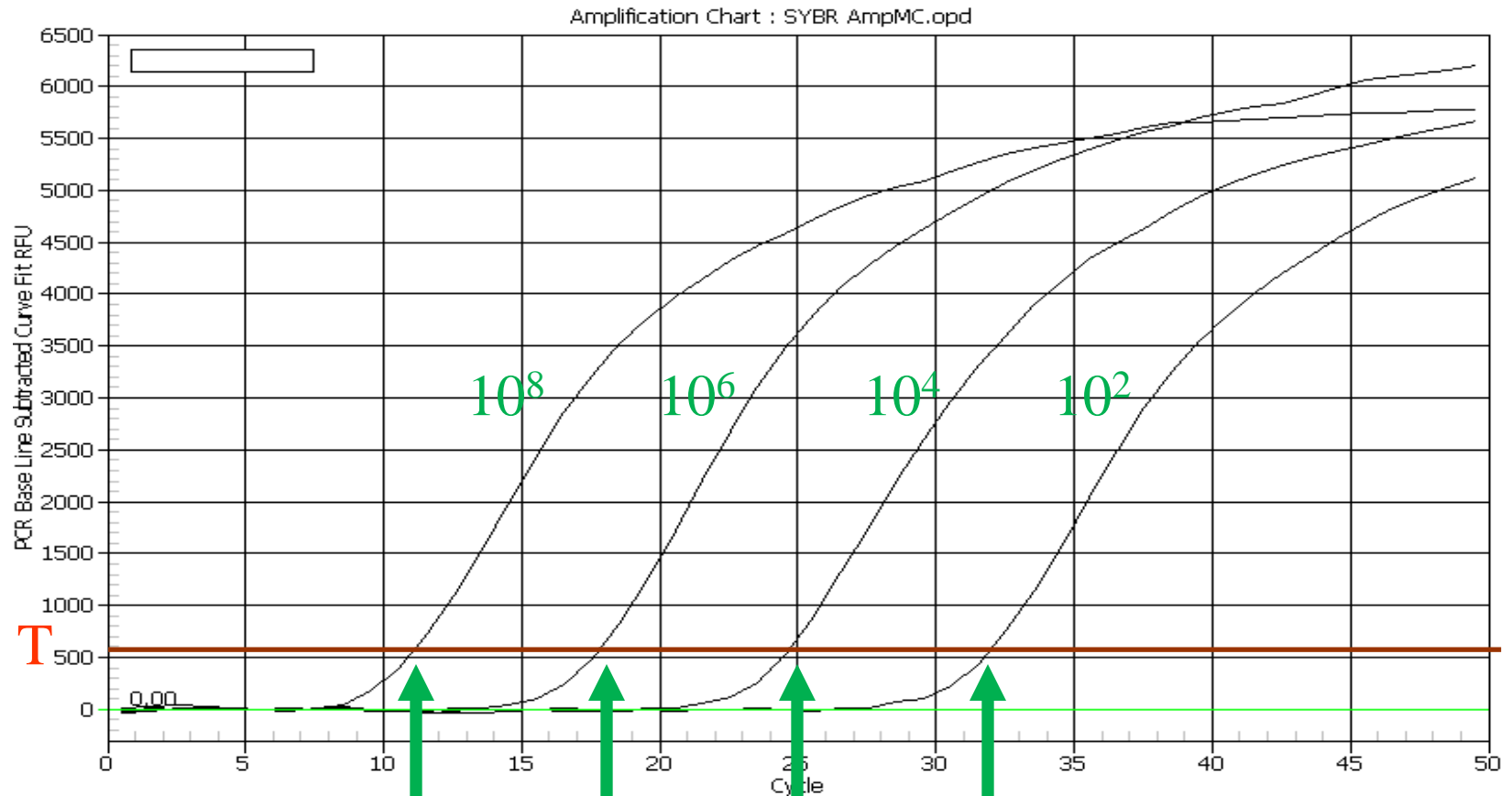
# 标准曲线



# 标准曲线

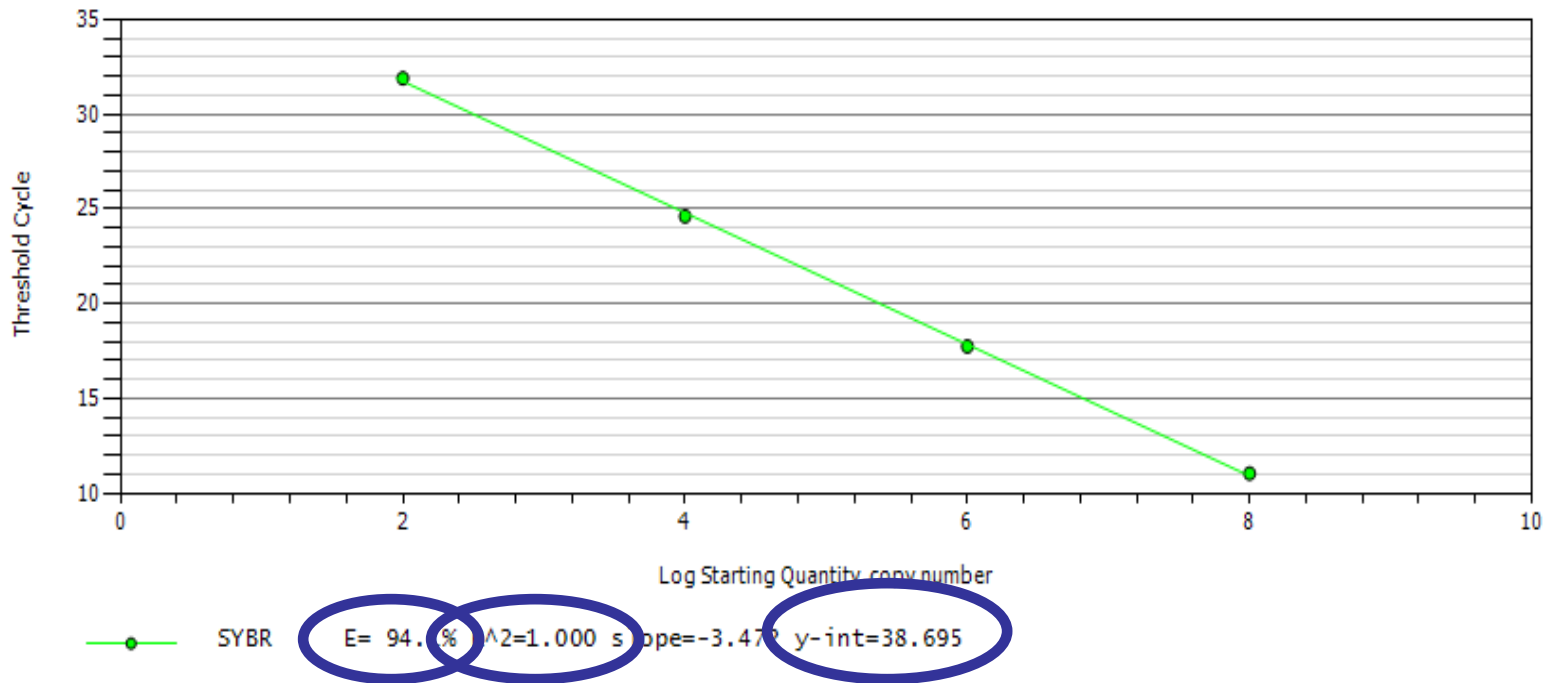


# 标准曲线

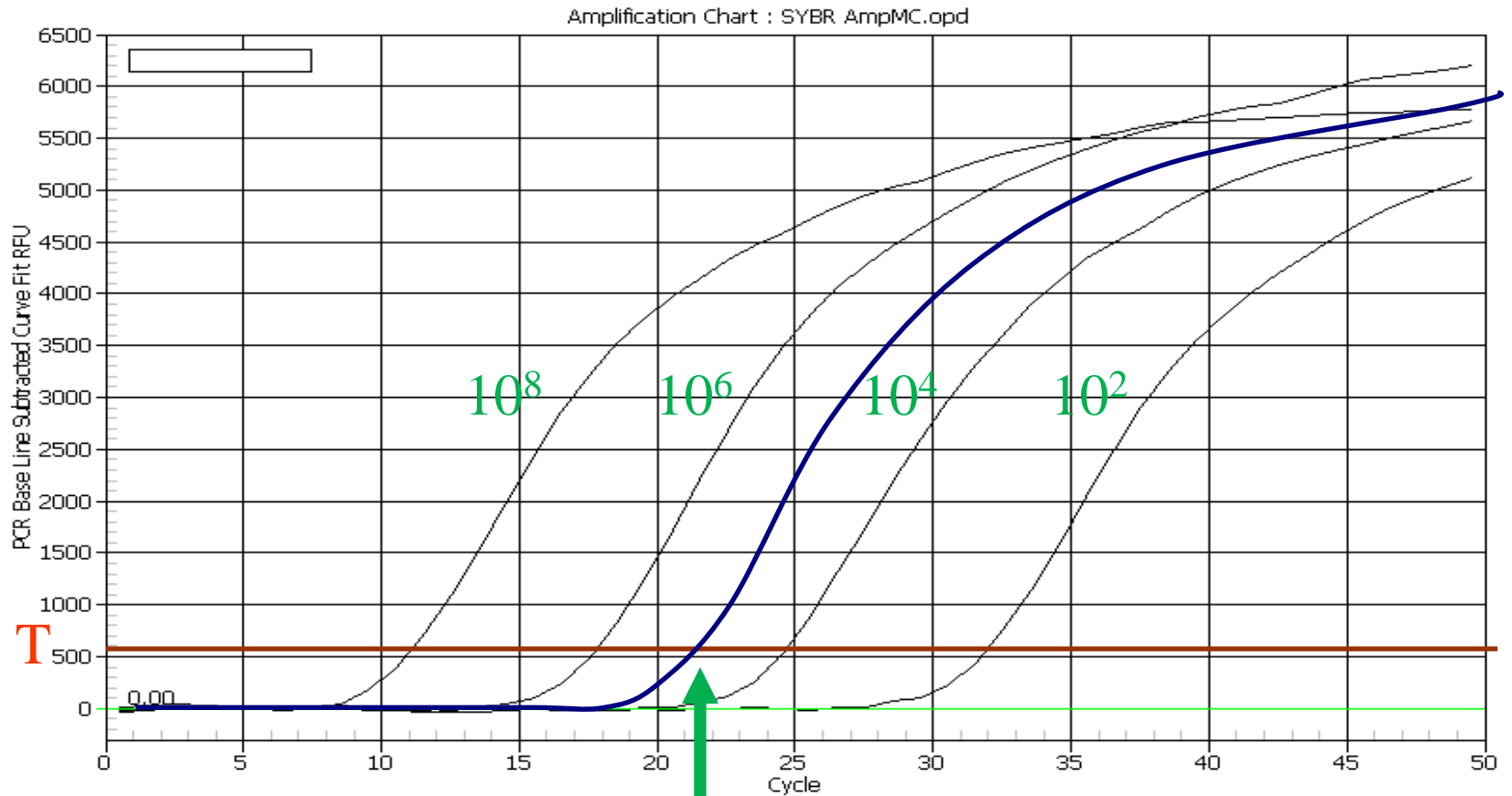


# 标准曲线

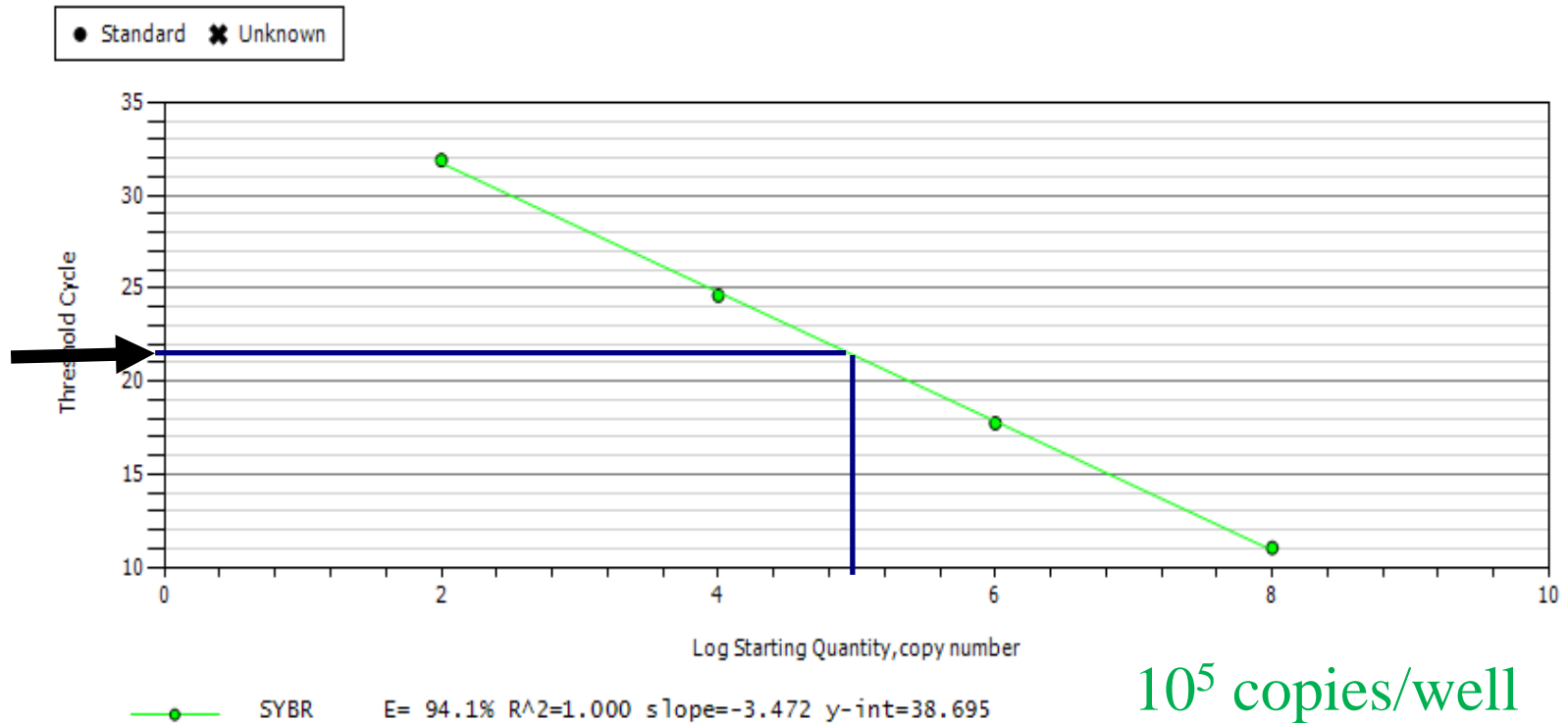
● Standard ✖ Unknown



# 标准曲线



# 标准曲线



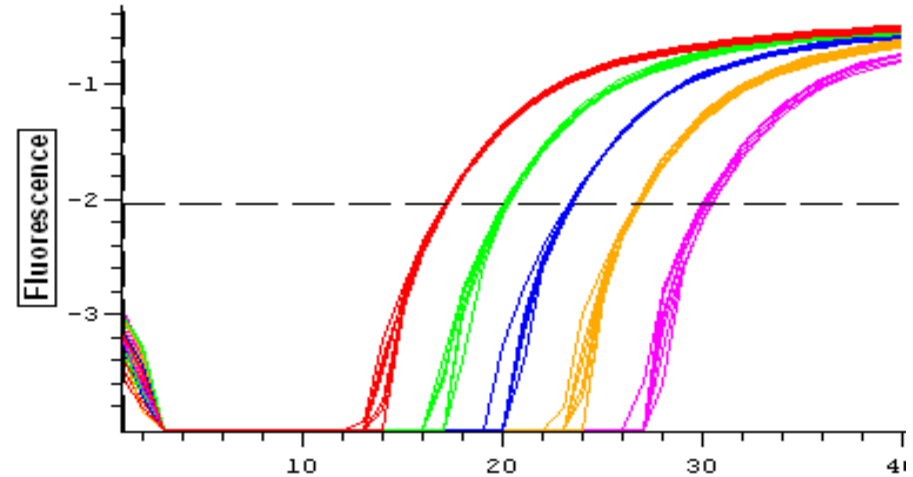
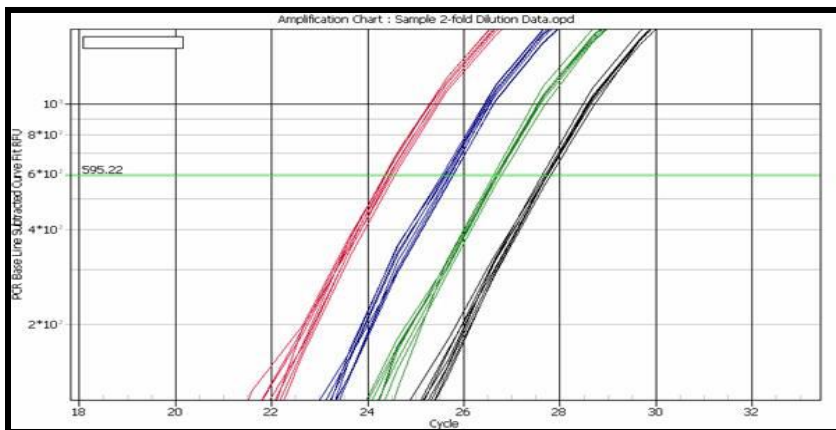
# Ct值特性

$$\text{Product}_T = (\text{Template}_0)2^n$$

(n = # of cycles)

$$\text{Product}_T = (\text{Template}_0)2^{3.32}$$

$$= (\text{Template}_0)10$$



Input                      C(t)

120 ng	24.38 ± 0.09
60 ng	25.64 ± 0.09
30 ng	26.68 ± 0.04
15 ng	27.71 ± 0.04

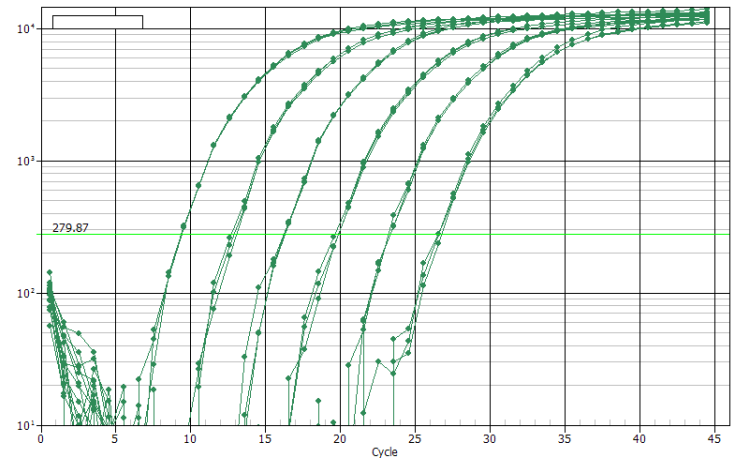
Input                      Cycle                      C(t)

1 X 10 <sup>6</sup>	17.09 ± 0.04
1 X 10 <sup>5</sup>	20.10 ± 0.06
1 X 10 <sup>4</sup>	23.41 ± 0.05
1 X 10 <sup>3</sup>	26.68 ± 0.05
1 X 10 <sup>2</sup>	30.26 ± 0.26

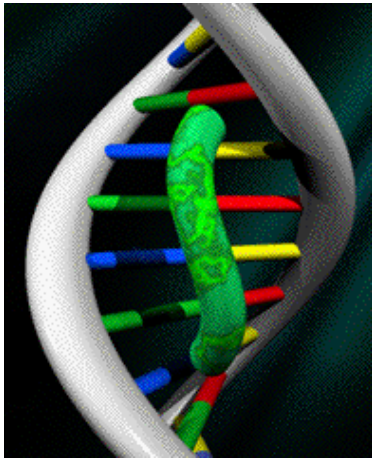
# 定量PCR优点

- 定量：对初始模板的绝对定量
- 优点：更灵敏，宽广的动力学范围
- 污染机会少：闭管化学
- 没有后处理：不用杂交、电泳、拍照
- 操作简单：高度自动化
- 用途广泛：既能定量又能定性
- 灵活：既可多点测定，又可单点测定

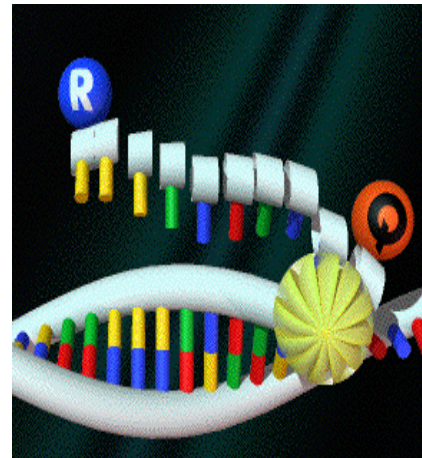
- PCR
- 定量PCR
- 荧光化学监测物质
- 实时荧光定量PCR应用



# 荧光化学物质



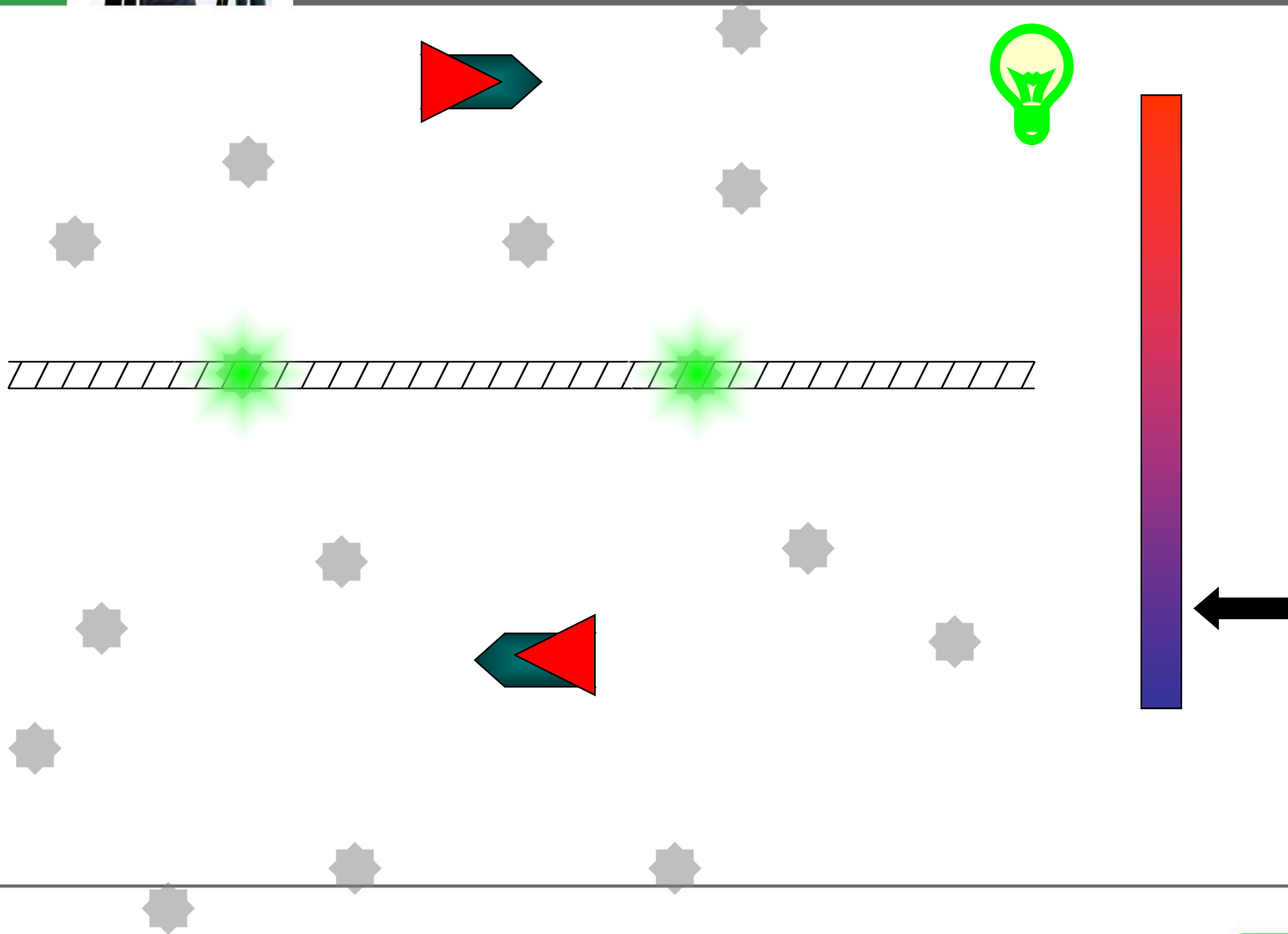
非特异性标记  
SYBR Green I  
Eva Green



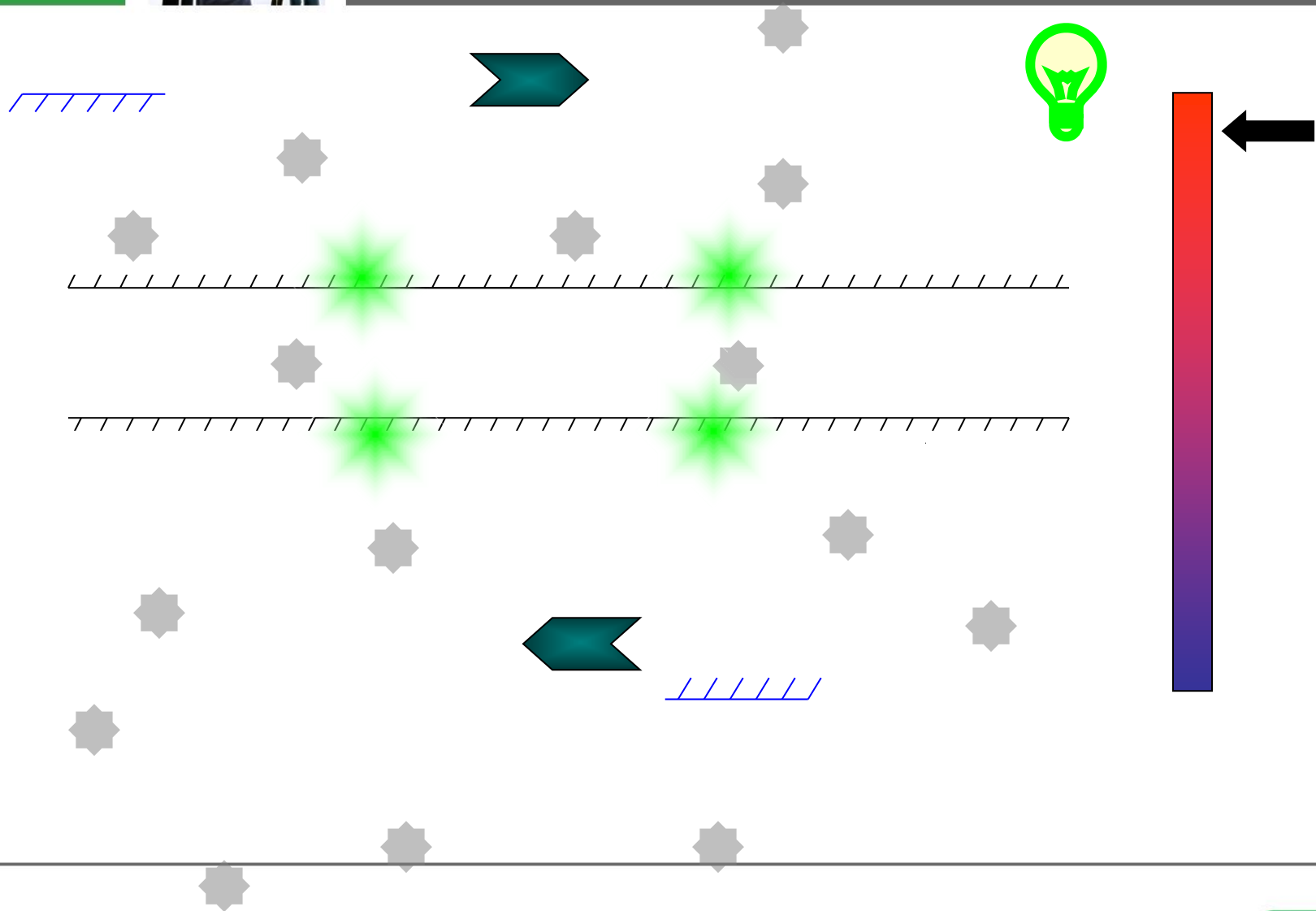
特异性的荧光探针  
TaqMan  
分子信标(Molecular  
beacons)



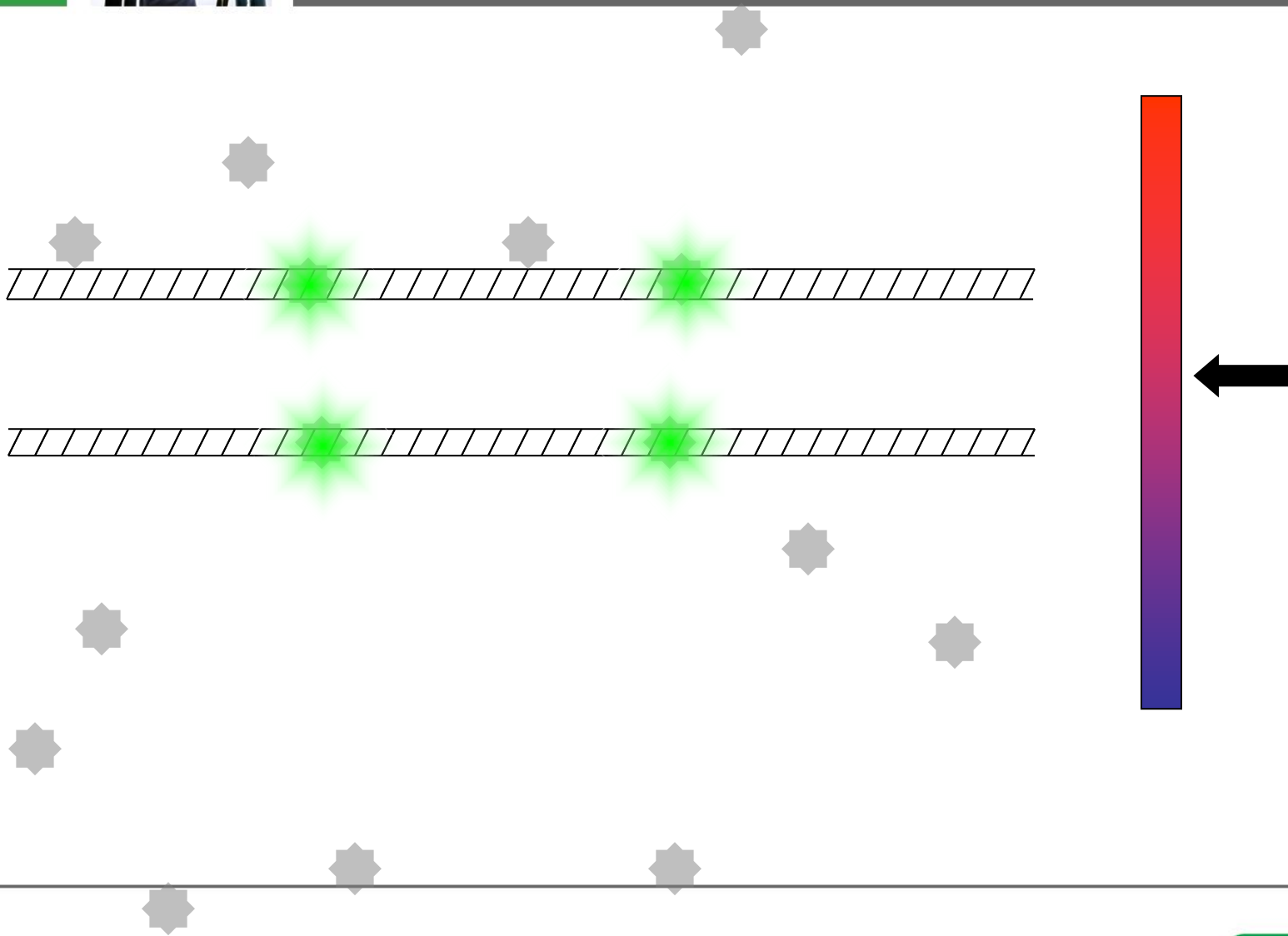
# SYBR Green I



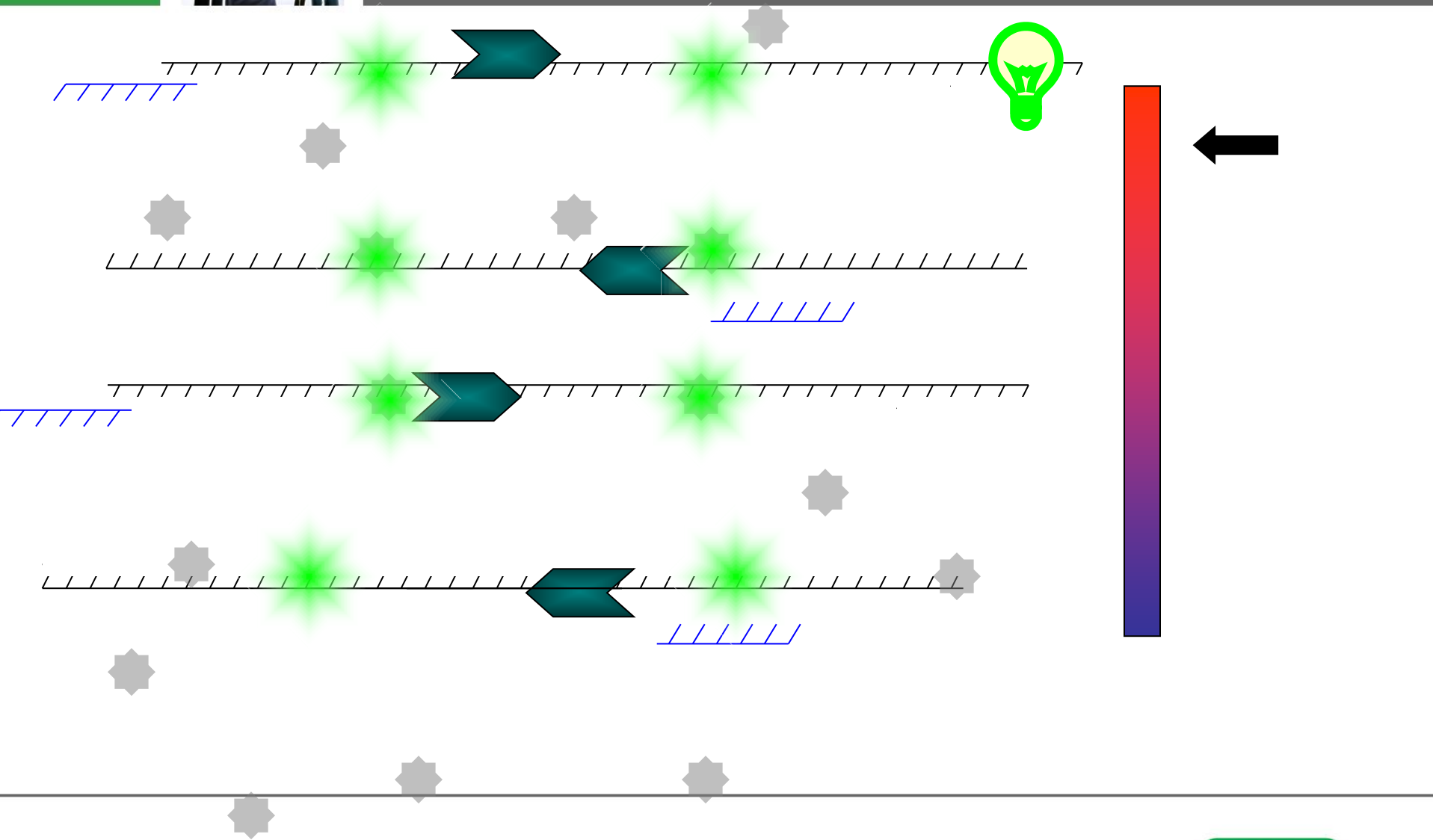
# SYBR Green I



# SYBR Green I

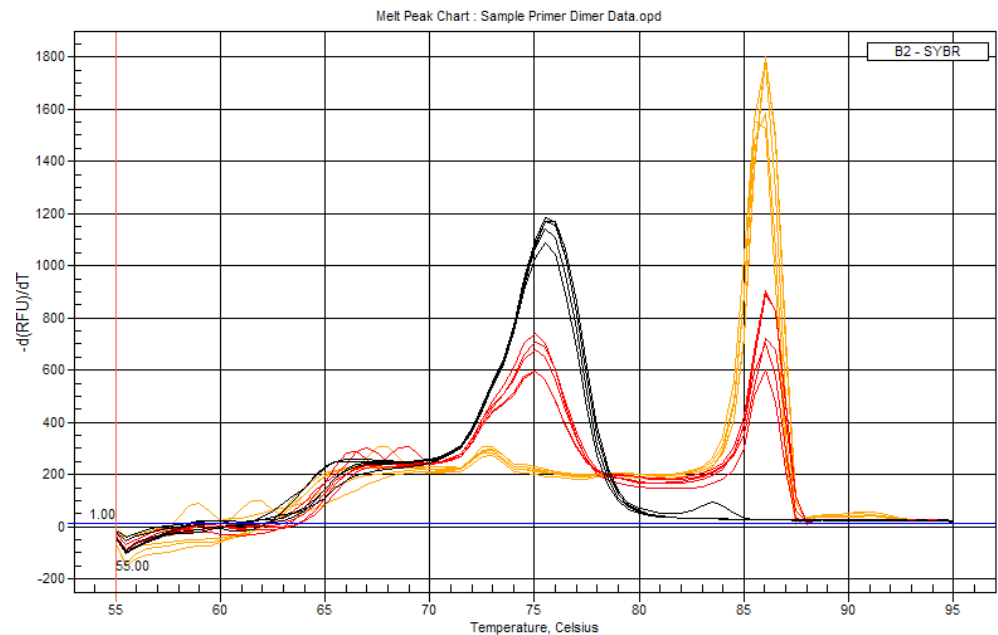


# SYBR Green I





- ❑ 使用方便，只需要一对引物
  - 不必设计复杂的荧光探针
- ❑ 熔解曲线
  - 鉴定PCR有无杂带、引物二聚体
- ❑ 便宜
- ❑ 灵敏
- ❑ 无模板特异性
  - 不能分辨非特异产物
- ❑ 不能做复合PCR扩增





# 融解曲线反应程序

## 1、融解曲线在定量PCR反应完成之后

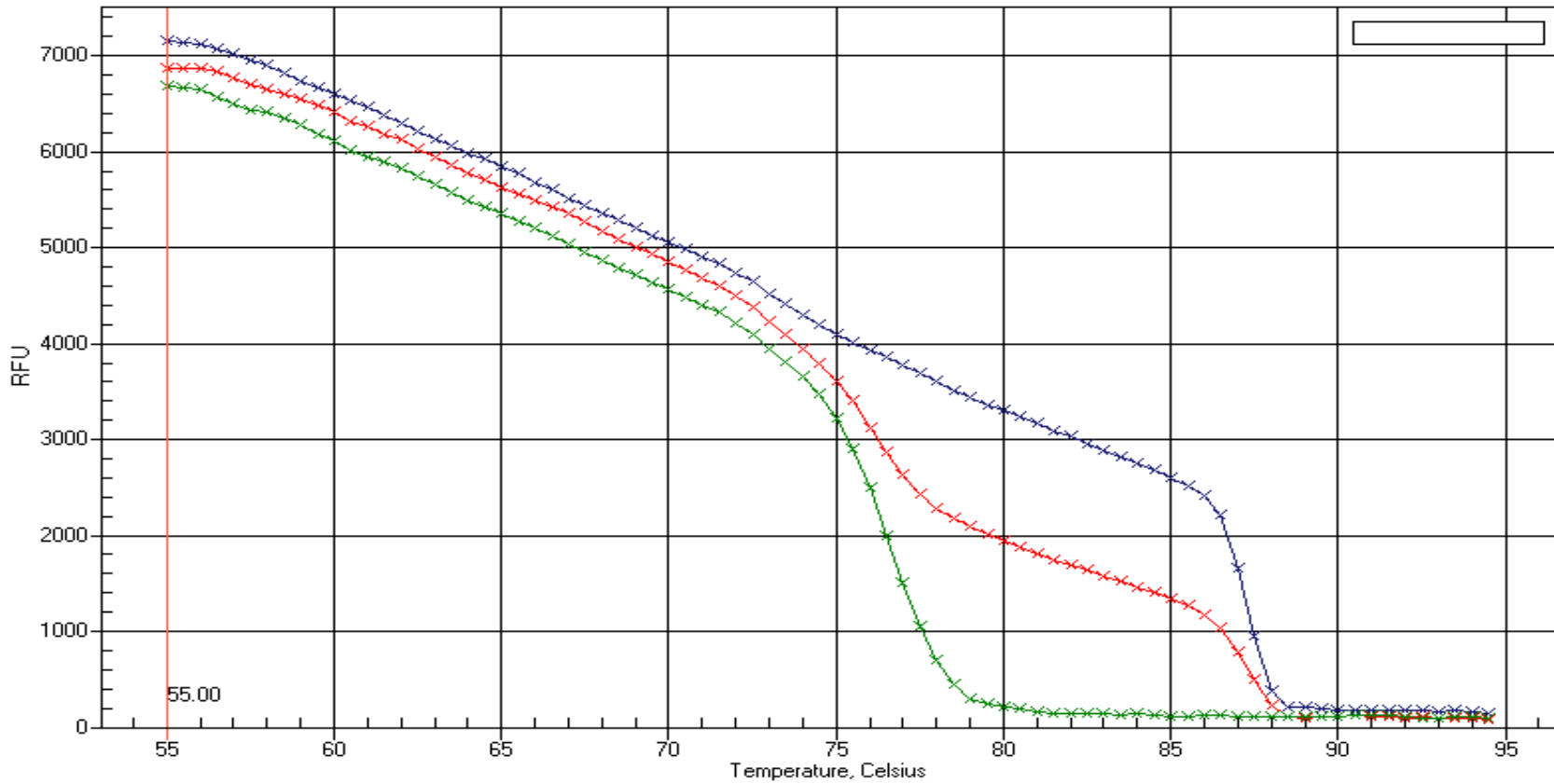
1	95.0	C for 3:00
2	95.0	C for 0:10
3	55.0	C for 0:30 + Plate Read
4	GOTO 2 , 39 more times	
5	95.0	C for 0:10
6	55.0	C for 0:10
7	Melt Curve 65.0 to 95.0 C, increment 0.5 C, for 0:05 + Plate Read	
END		

## 2、软件自动分析结果，生成融解曲线图谱

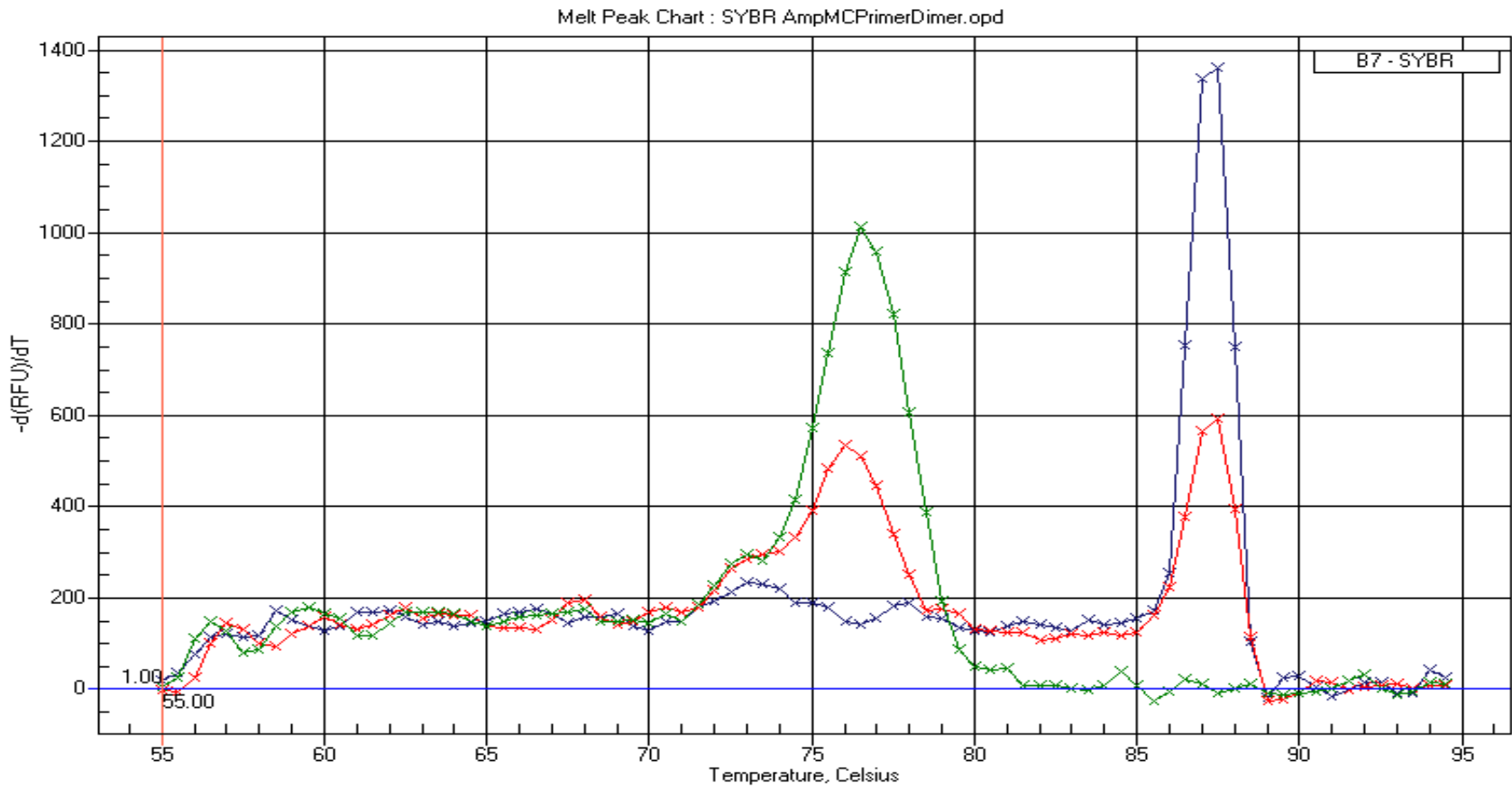
# 融解曲线分析-原始图谱



Melt Curve Chart : SYBR AmpMCPrimerDimer.opd



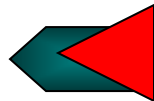
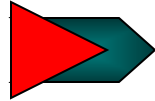
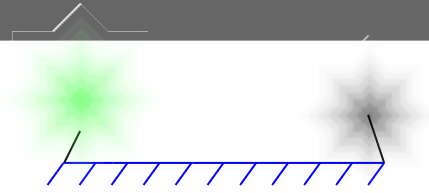
# 融解曲线分析-导数图谱



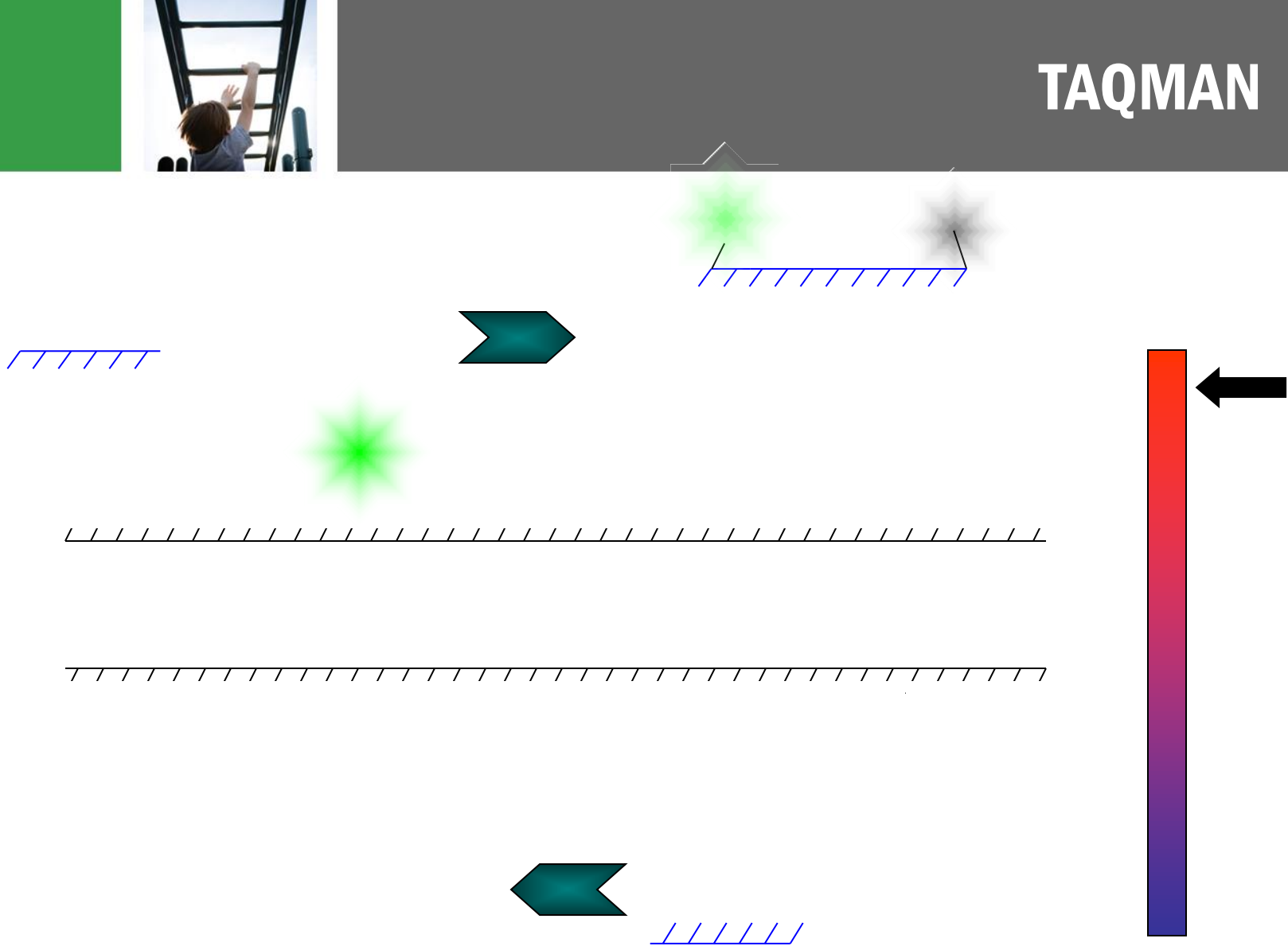
# TAQMAN 探针



# TAQMAN 探针

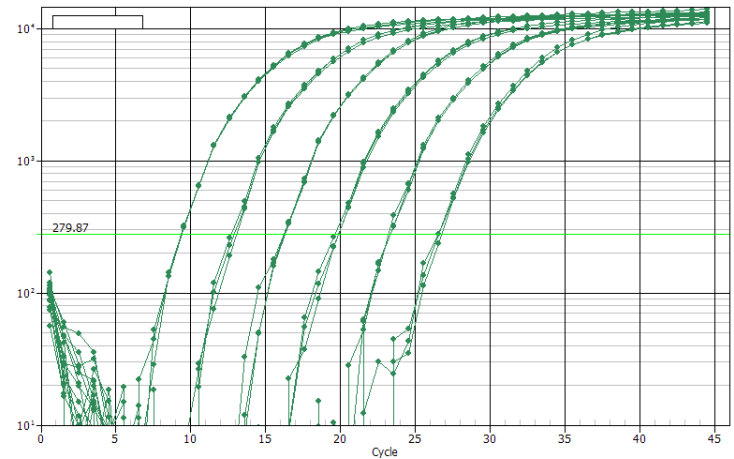


# TAQMAN 探针



- ❑ 对目标序列有很高的特异性
  - 特别适合于SNP检测
- ❑ 可以在一个反应中进行两个基因的定量
- ❑ 荧光强度与反应物成正比
  
- ❑ 反应成本较高
- ❑ 设计复杂

- PCR
- 定量PCR
- 荧光化学监测物质
- 实时荧光定量PCR应用





# 定量PCR应用I—实时定量

## DNA定量—拷贝数研究（替代Southern Blot）

- 病原体定量检测
- 转基因拷贝数的检测

## RNA定量—基因表达差异（替代Northern Blot）

单个或多个基因地表达谱分析

- 不同组织、器官
- 不同时期
- 不同处理





# 定量PCR应用I-实时定量

RNA定量—基因表达差异（替代Northern Blot）

细胞因子表达分析

- 淋巴细胞
- 抗原递承呈
- 单核细胞，内皮细胞和成纤维细胞

肿瘤相关基因表达分析

- 肿瘤标志物
- 微小残留病变
- 肿瘤耐药基因





# 定量PCR应用II：终点读板

- 基因突变分析
  - 单基因遗传病诊断，如血友病、地贫
- SNP扫描
  - 疾病相关基因鉴定，如牛皮癣、哮喘相关基因SNP的鉴定；抗病抗逆相关基因鉴定
  - SNP检测与临床表现的相关性，如抗高血压药物疗效的个体差异
  - 药物副反应的预防，如麻醉意外
- 物种鉴定、菌株鉴定 - 各种病毒，细菌，病毒 - 病原体检测，如炭疽菌，E coli. 0157