

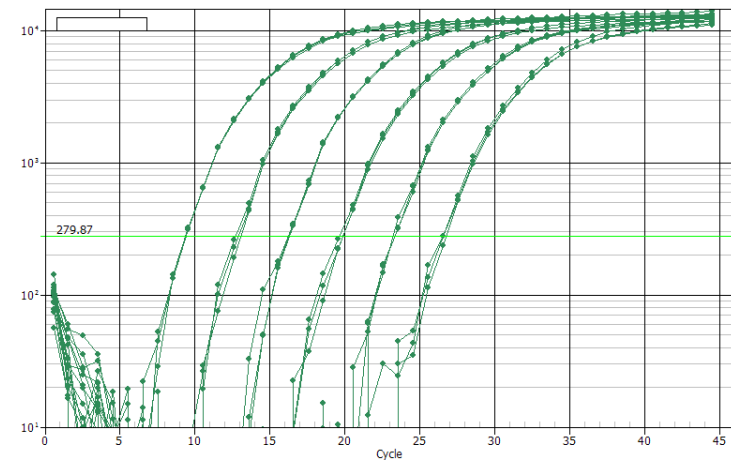
实时荧光定量PCR原理与操作





提纲

- PCR
- 定量PCR
- 荧光定量检测方法—染料法, 探针法



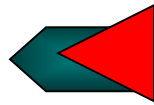
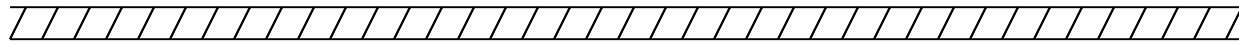
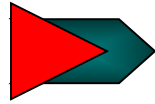


PCR目的及背景

- 多聚酶链式反应(polymerase chain reaction)简称P C R技术，是80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。

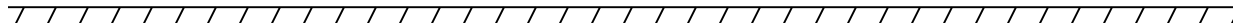
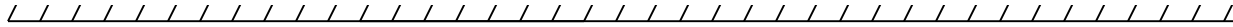


传统
PCR



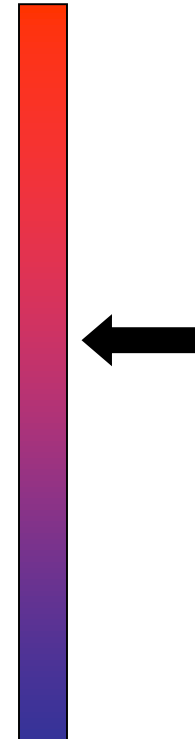
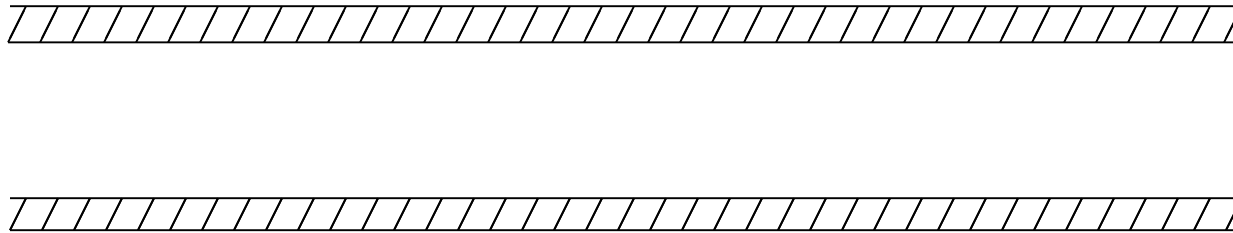


传统
PCR



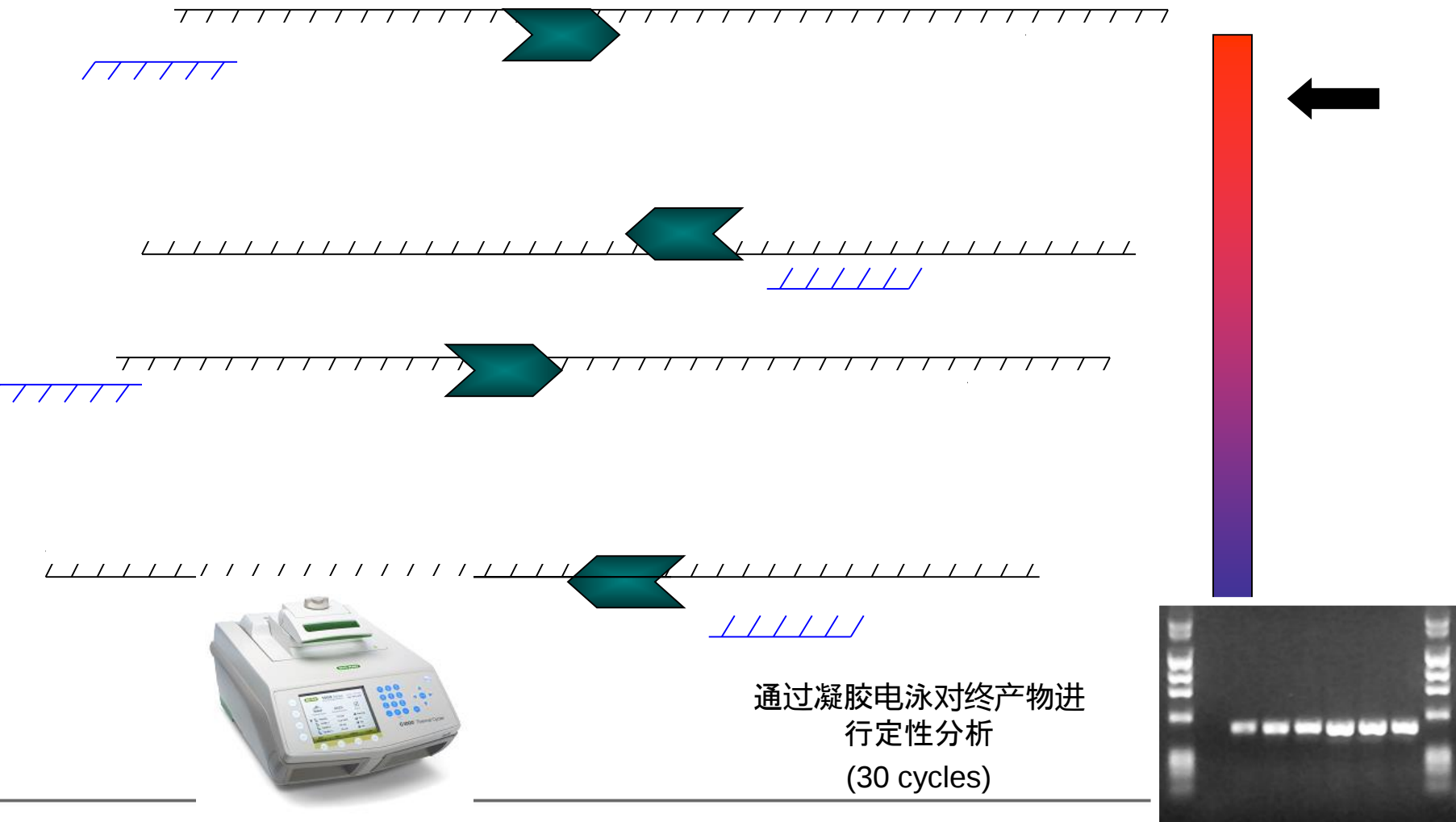


传统
BCD





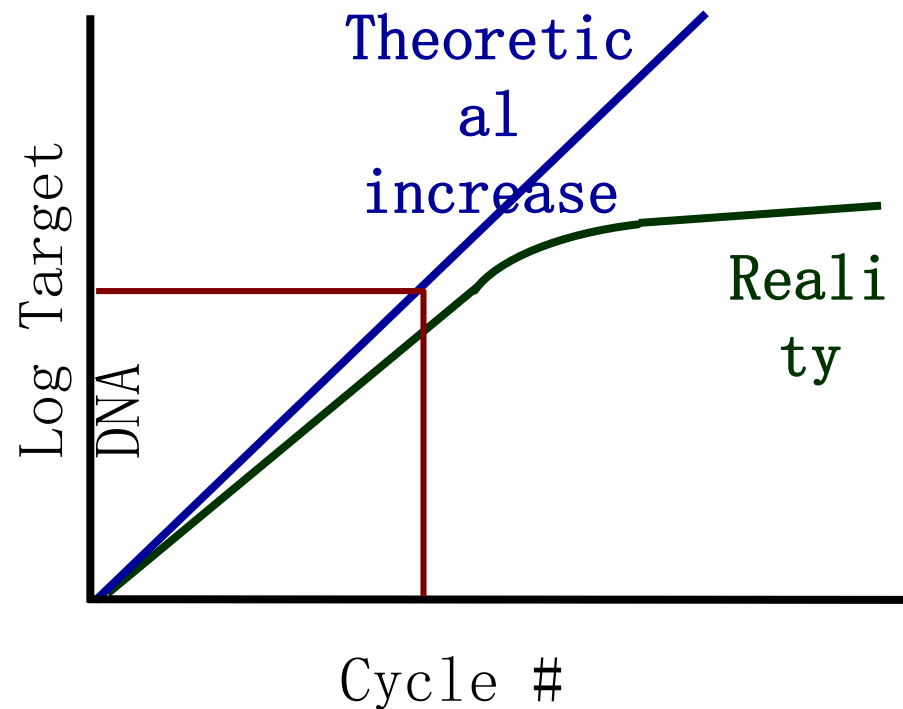
传统
PCR





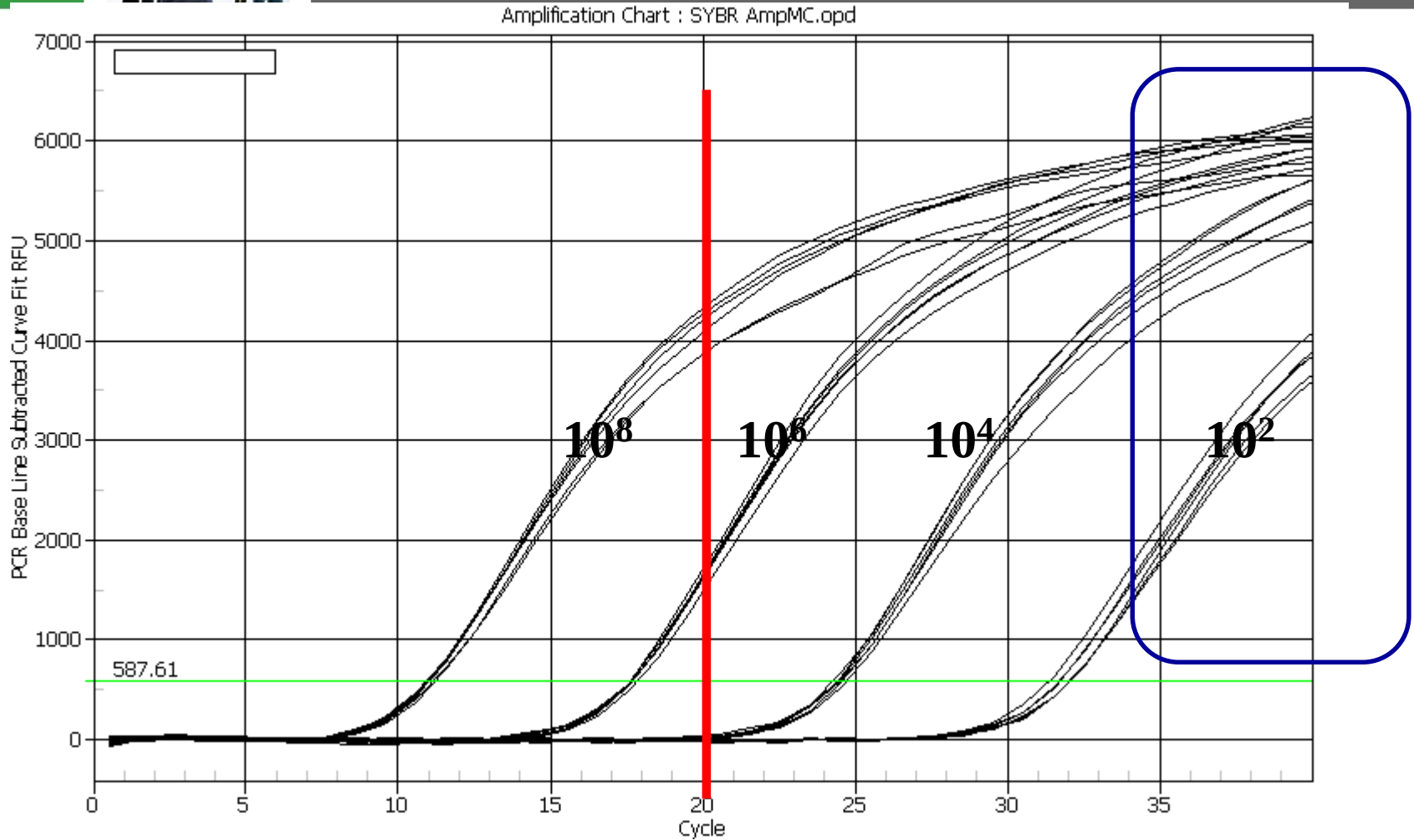
PCR: 理论vs. 实际

- 理论上, PCR产物的量会随着每个循环的增加, 呈现2倍增加的趋势。
- 实际上





普通PCR分析终产物特点

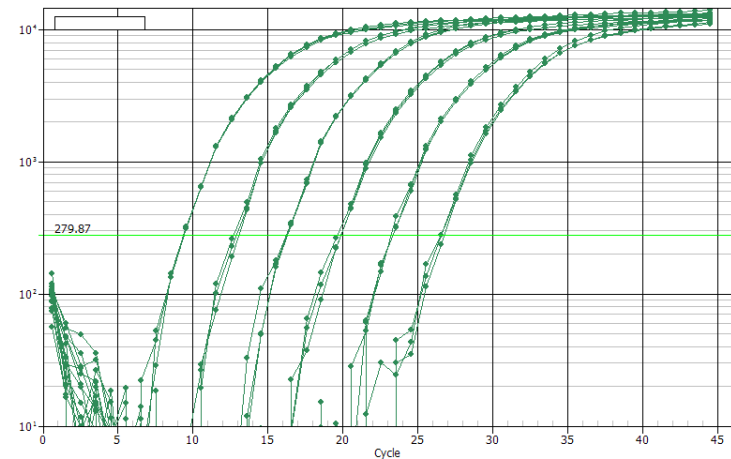


100 倍稀释



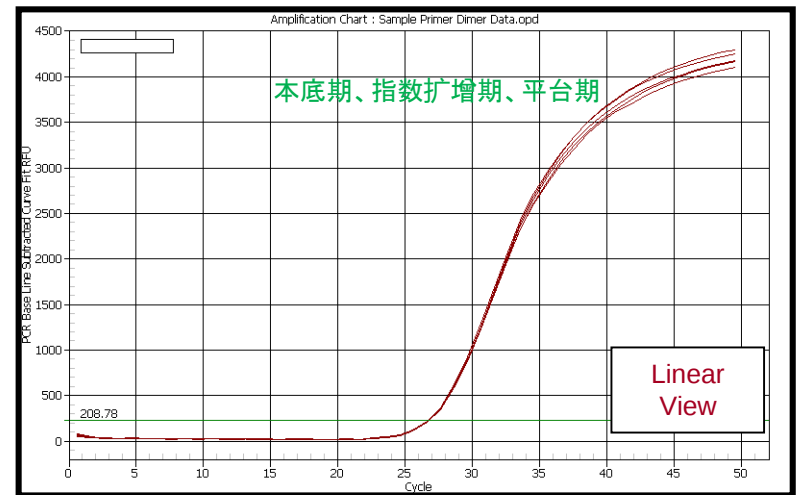
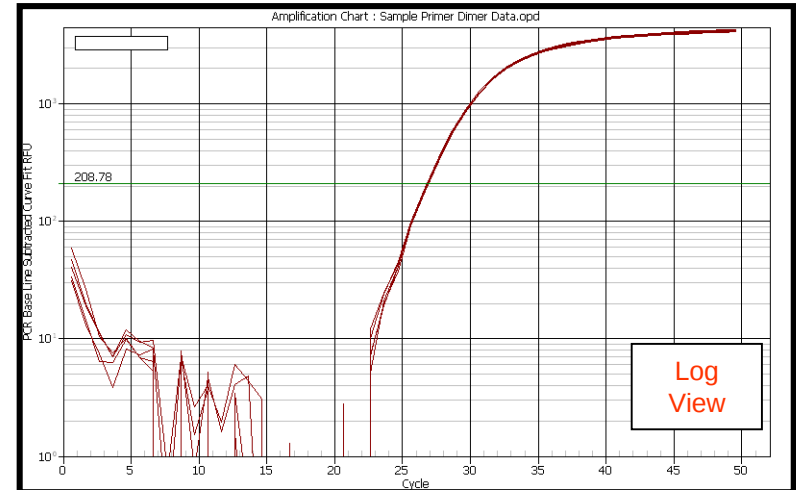
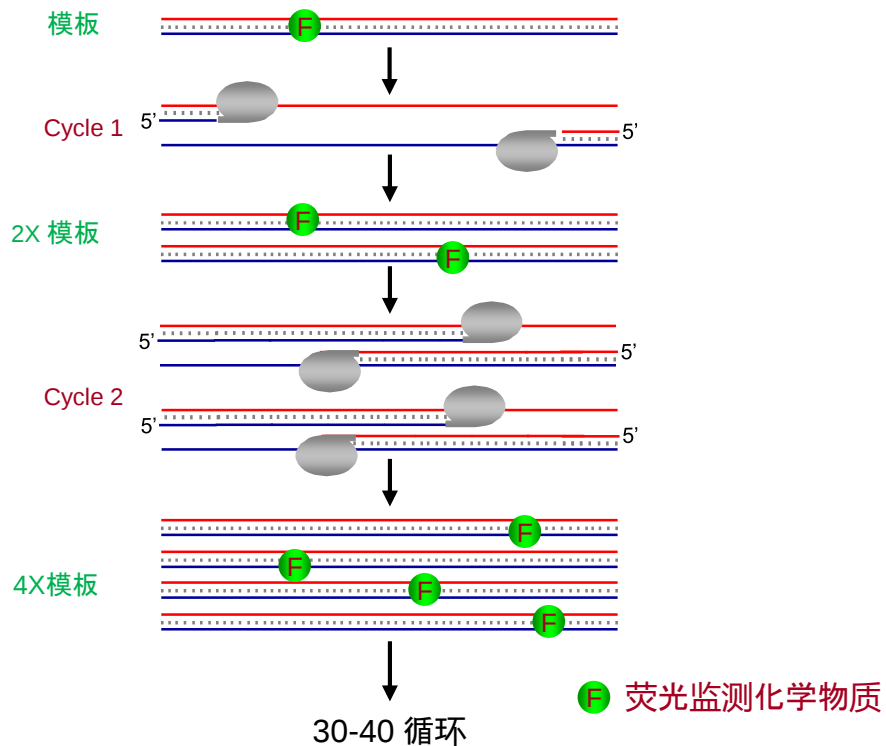
提纲

- PCR
- 定量PCR
- 荧光定量检测方法—染料法，探针法



定量PCR

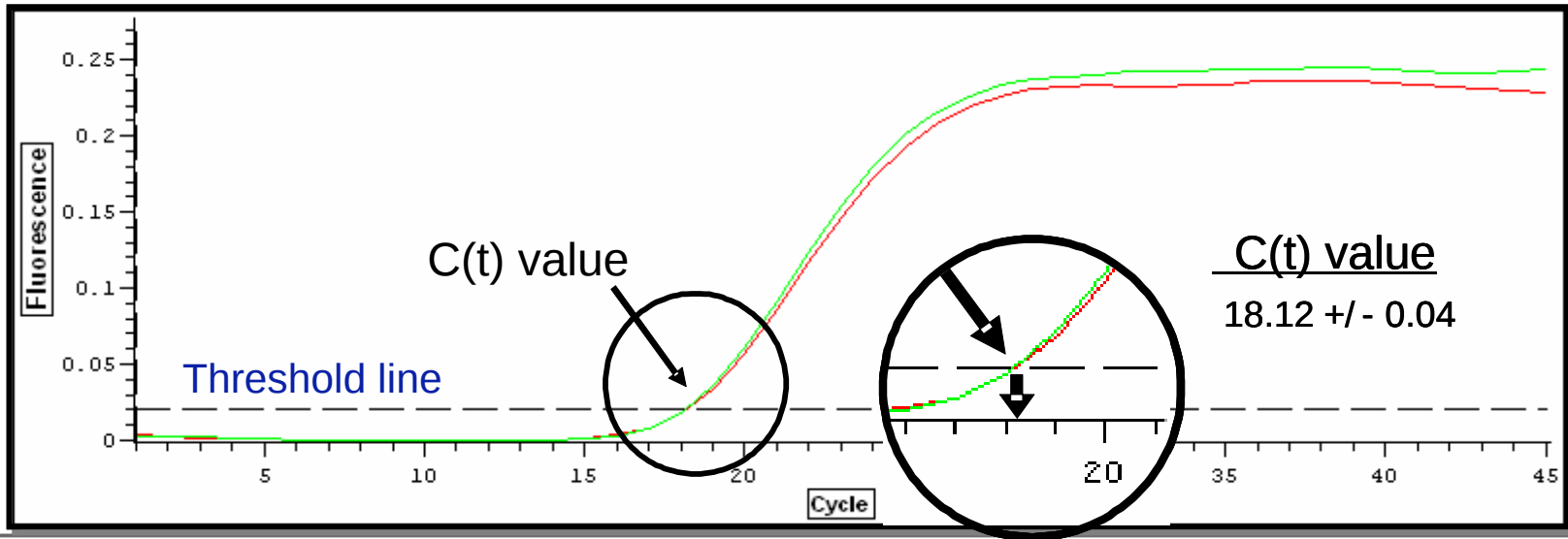
- 通过Ct值和标准曲线实现对起始模板
- 的定量分析





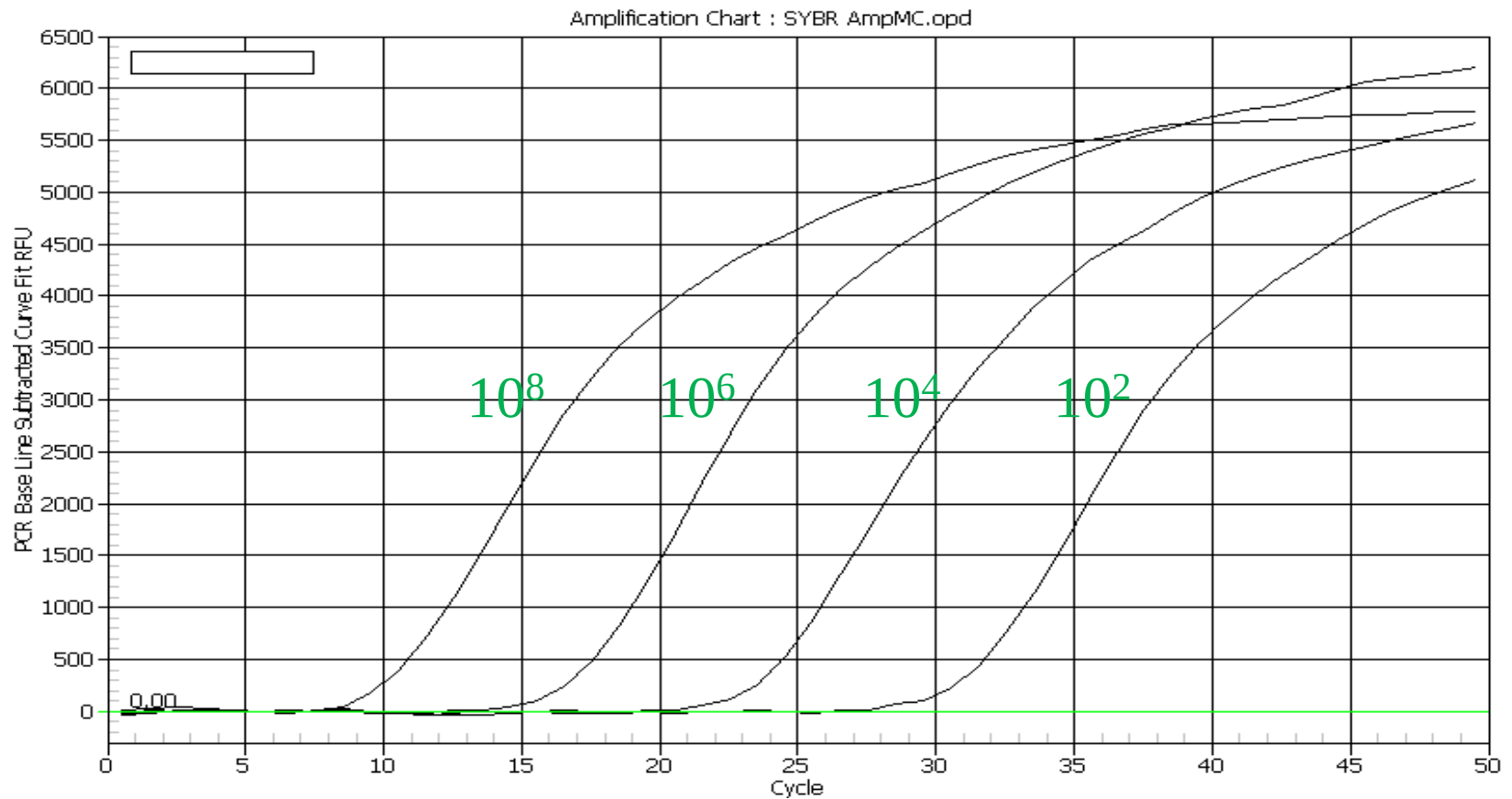
荧光定量相关概念

- 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)
- C_t 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**
- **扩增效率 (E值)**: 每循环PCR产物增加的百分比, 理想状态是100%, $E = (10^{\text{斜率分之一}}) - 1$

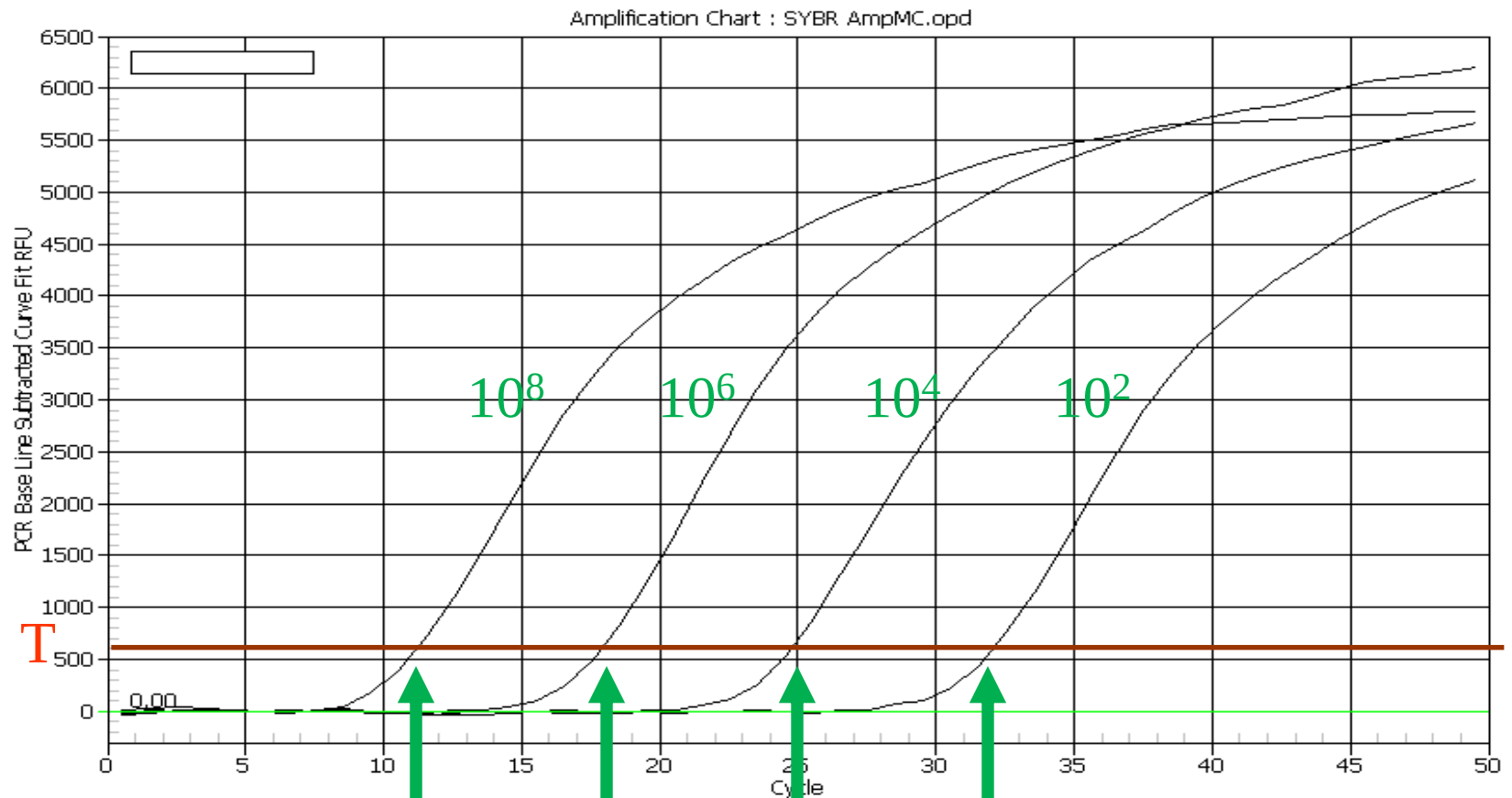




标准曲线

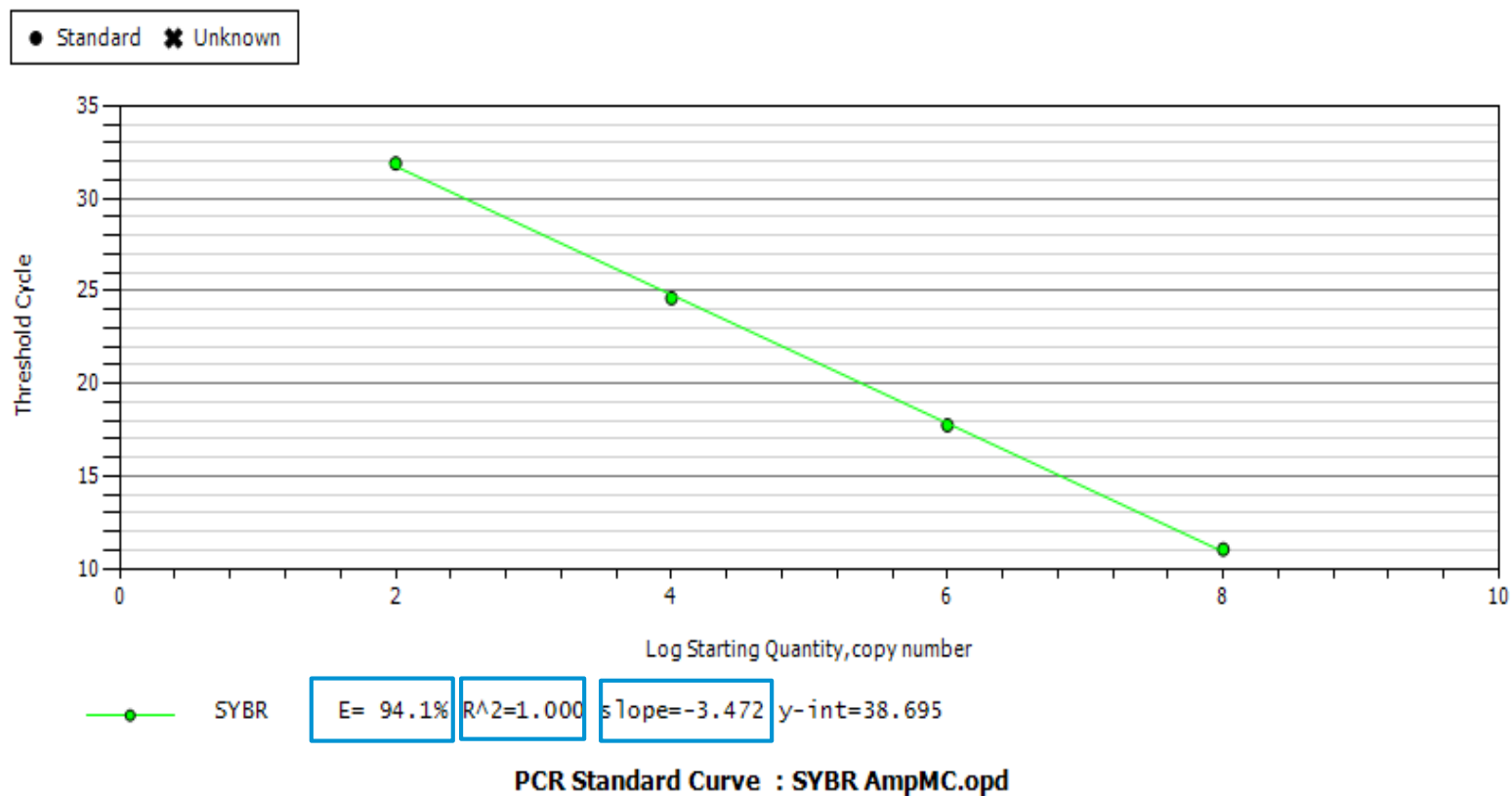


标准曲线

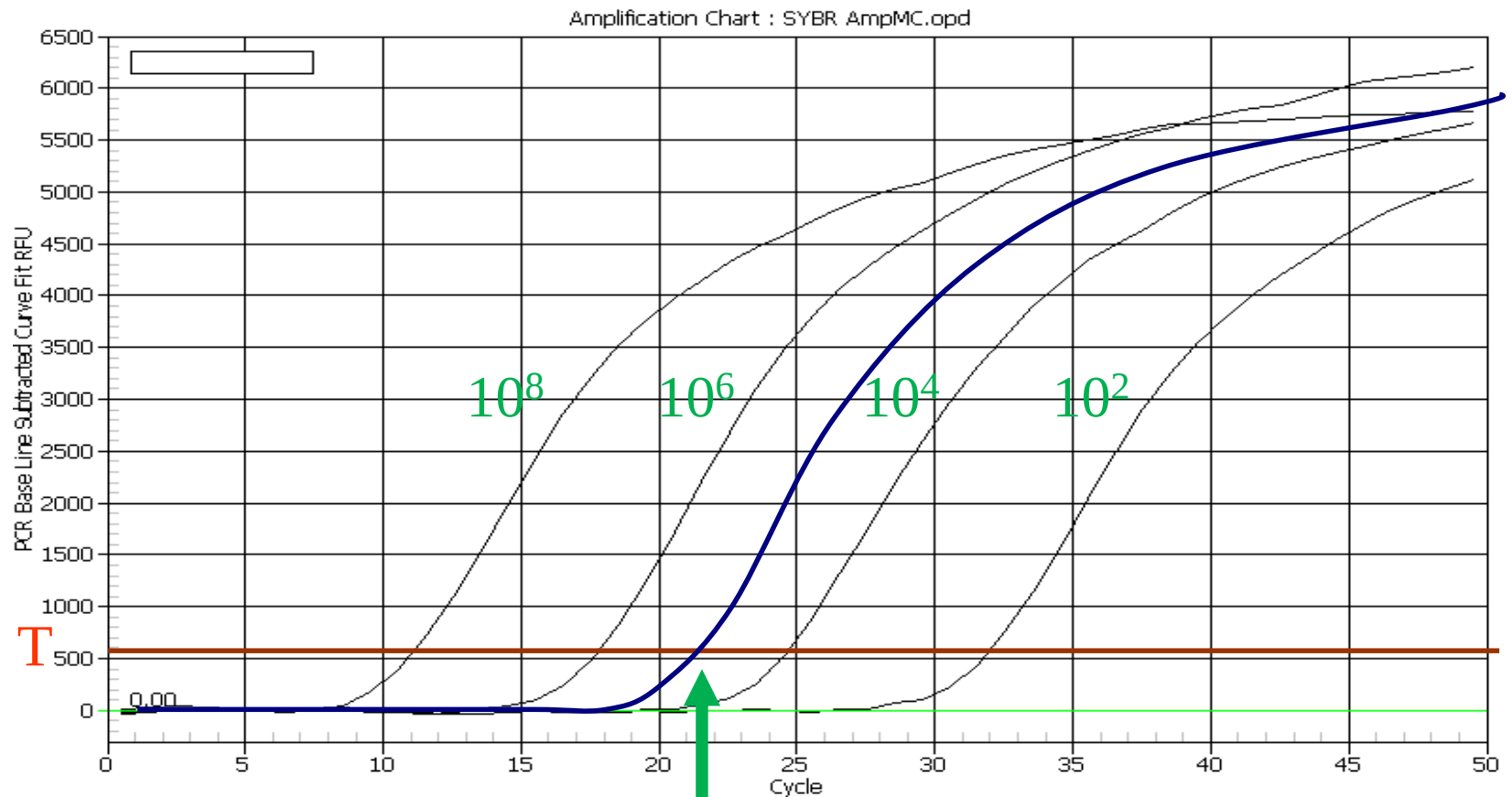




标准曲线

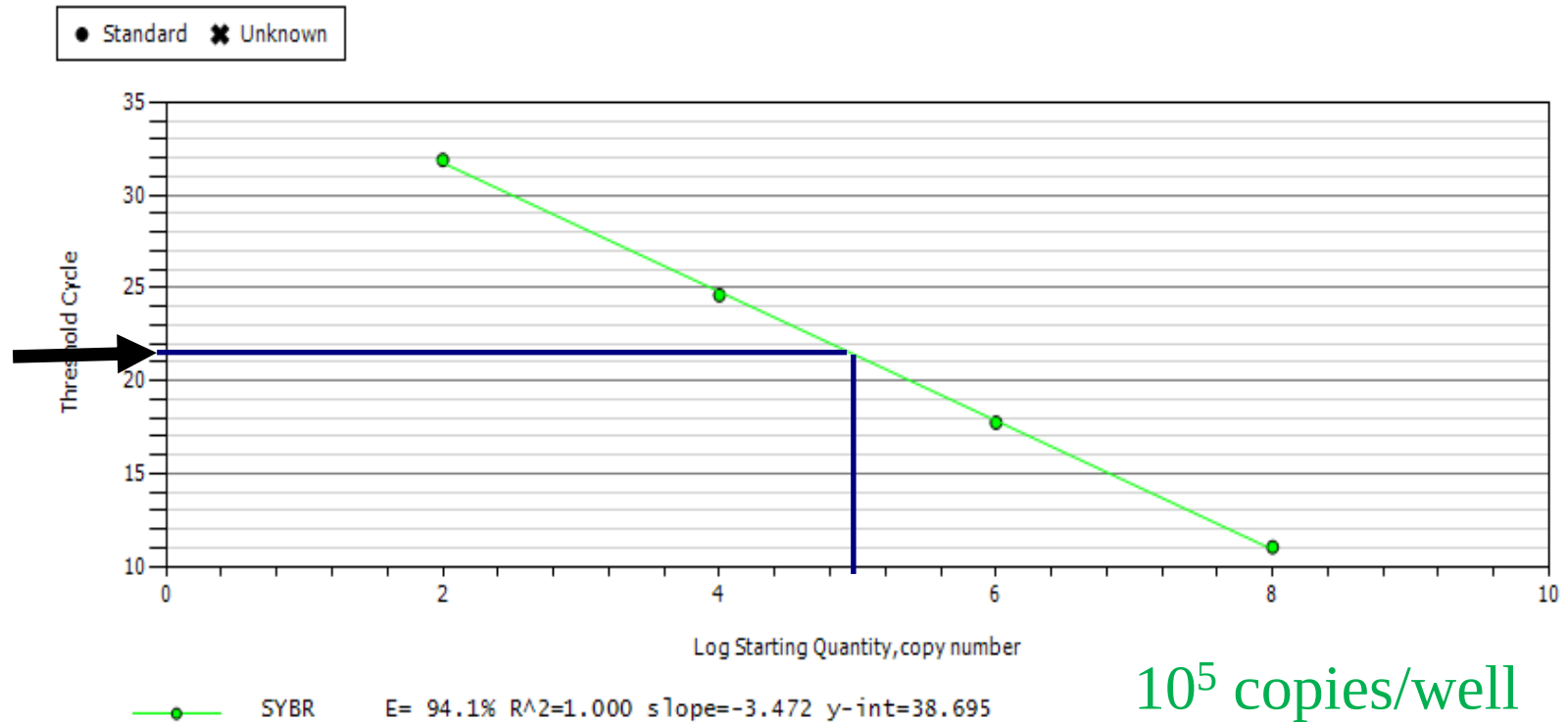


标准曲线





标准曲线



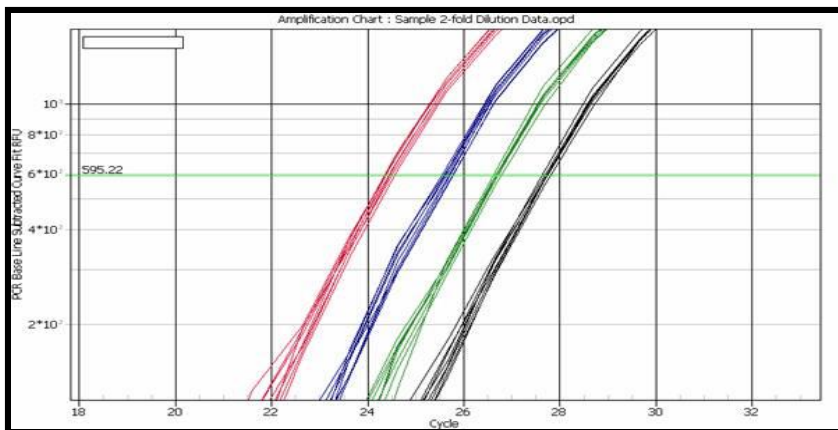
Ct值特性

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

(n = # of cycles)

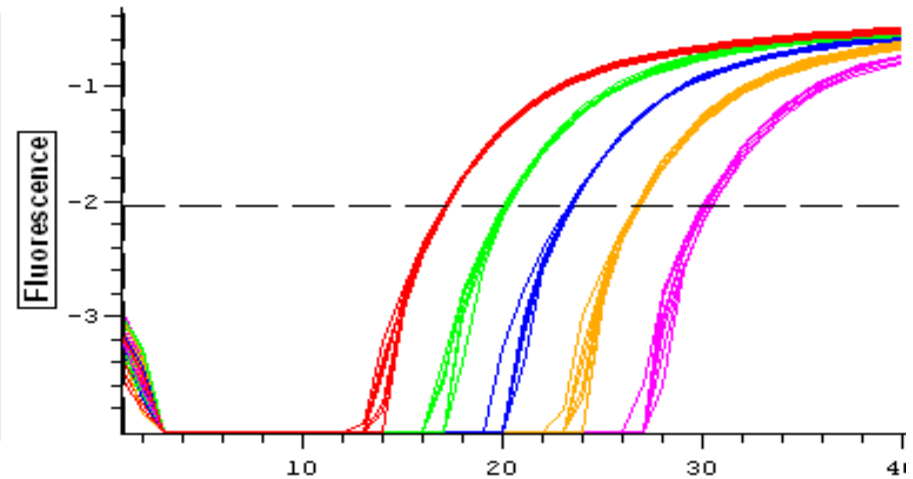
$$\text{Product}_T = (\text{Template}_0)2^{3.32}$$

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



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



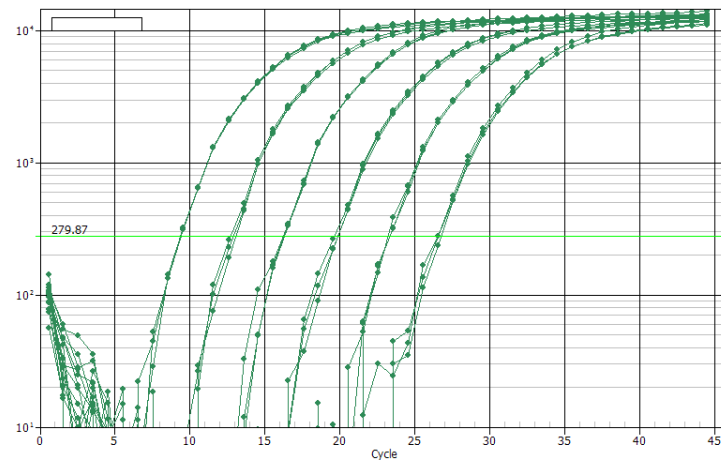
Input Cycle C(t)

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

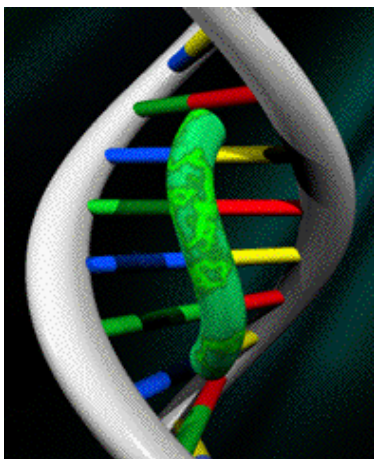


提纲

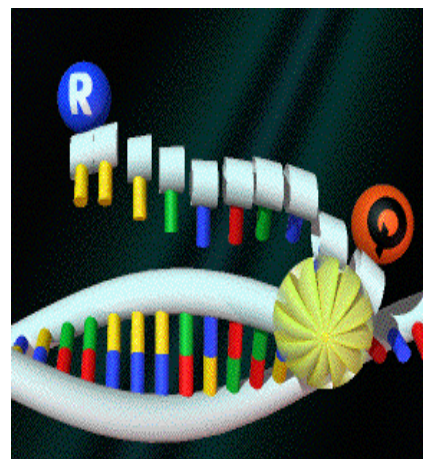
- PCR
- 定量PCR
- 荧光定量检测方法—染料法，探针法



荧光化学物质



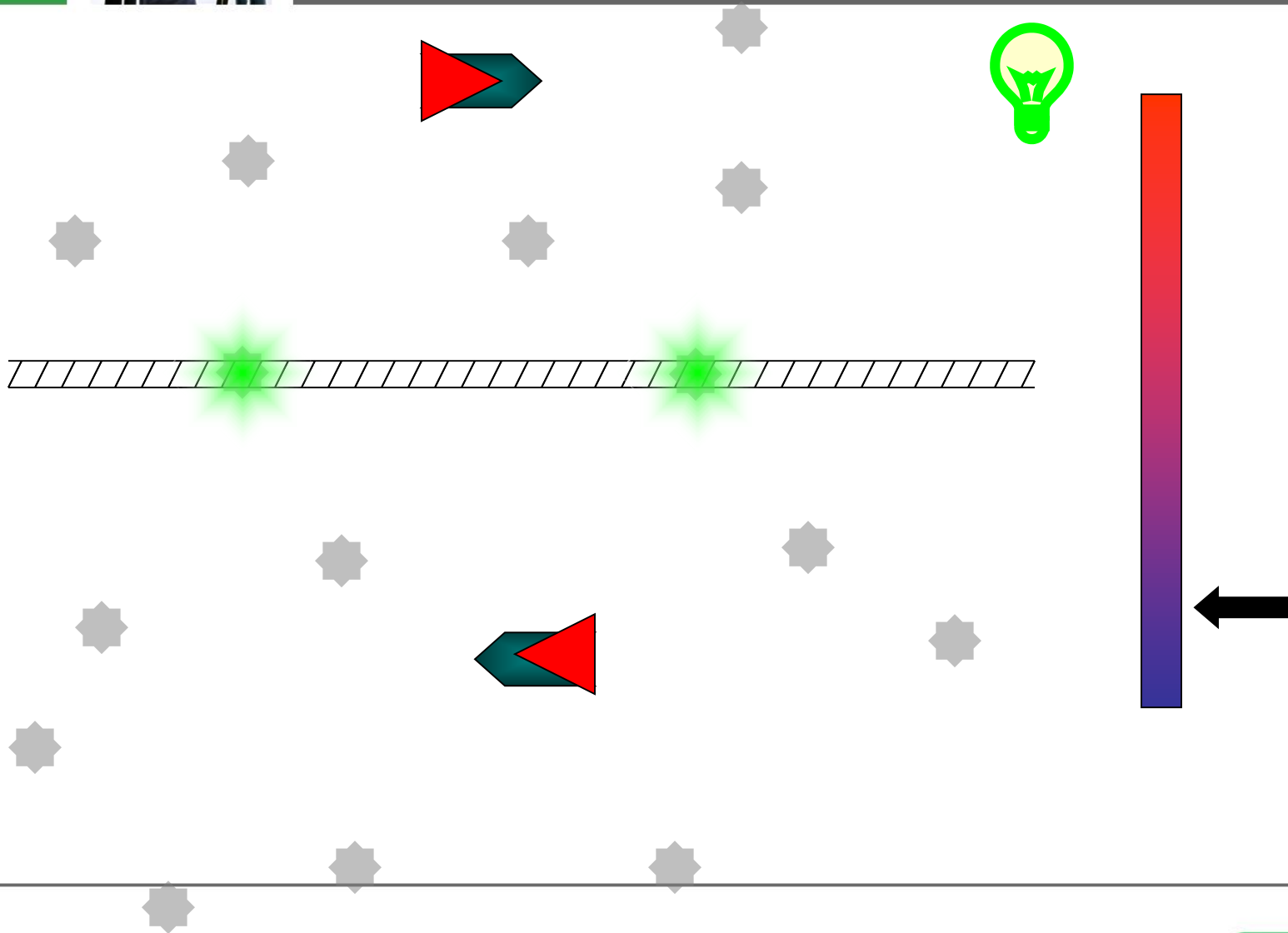
染料法—非特异性标记
SYBR Green I
Eva Green



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

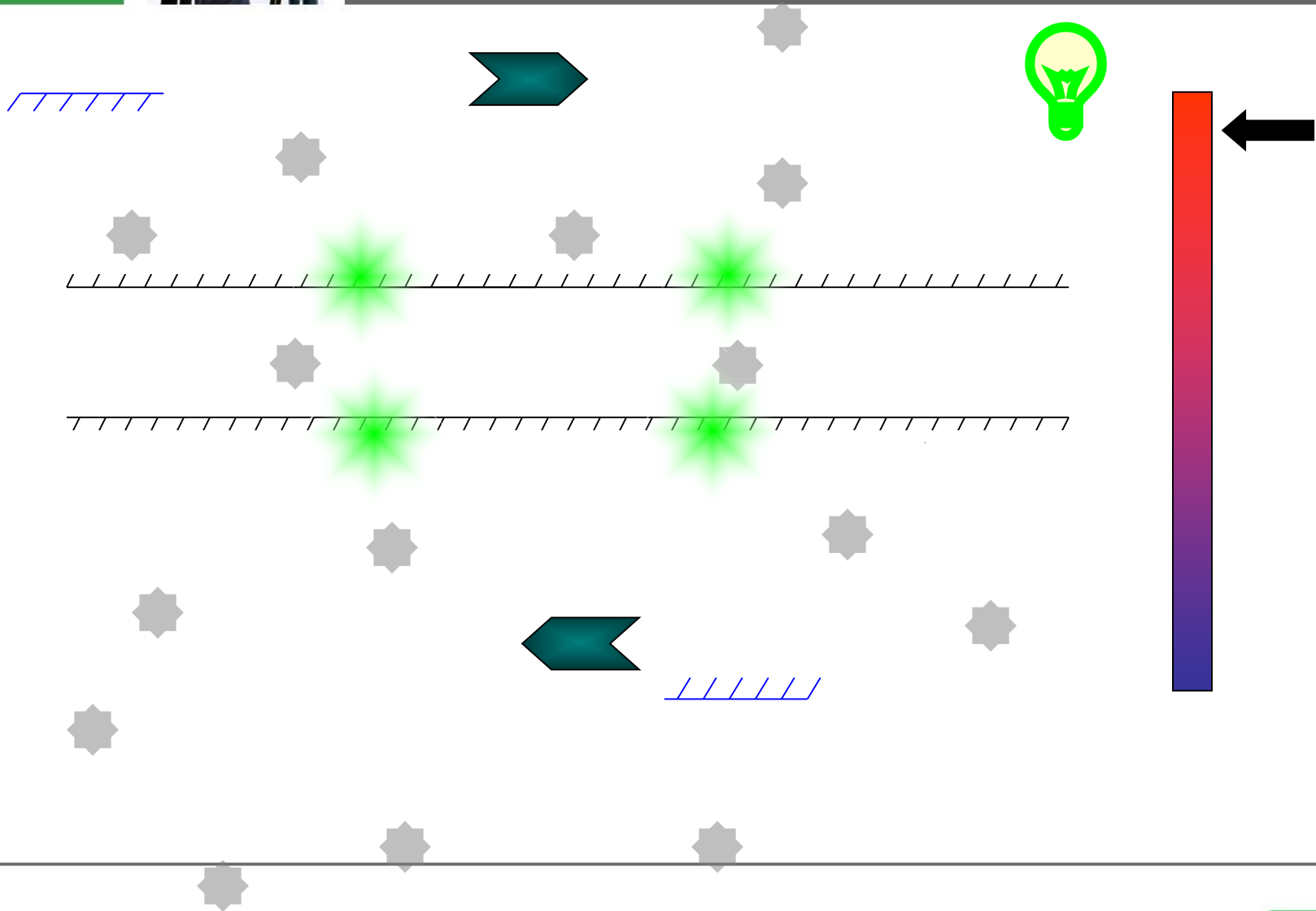


SyBR Green I



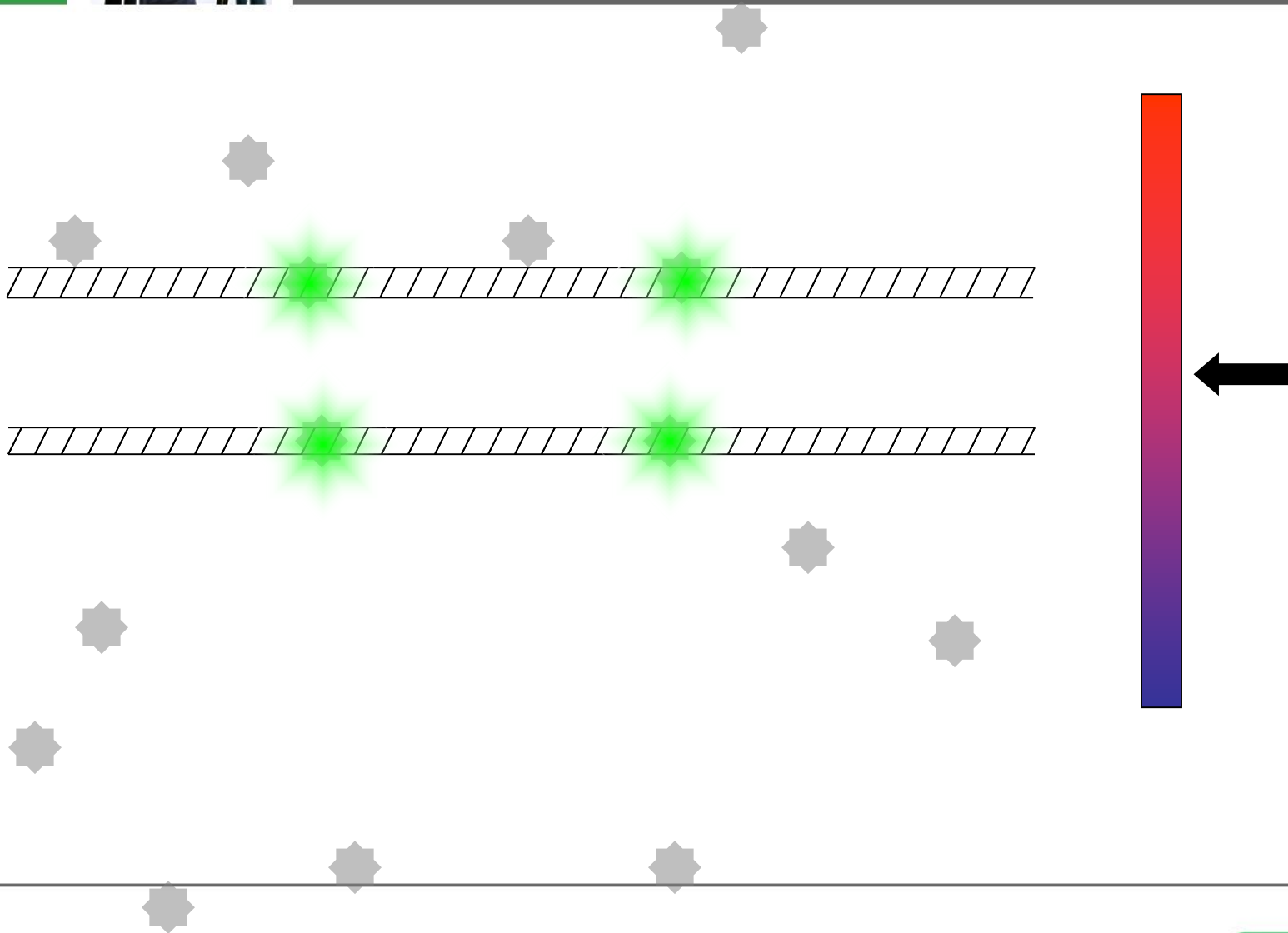


SyBR Green I



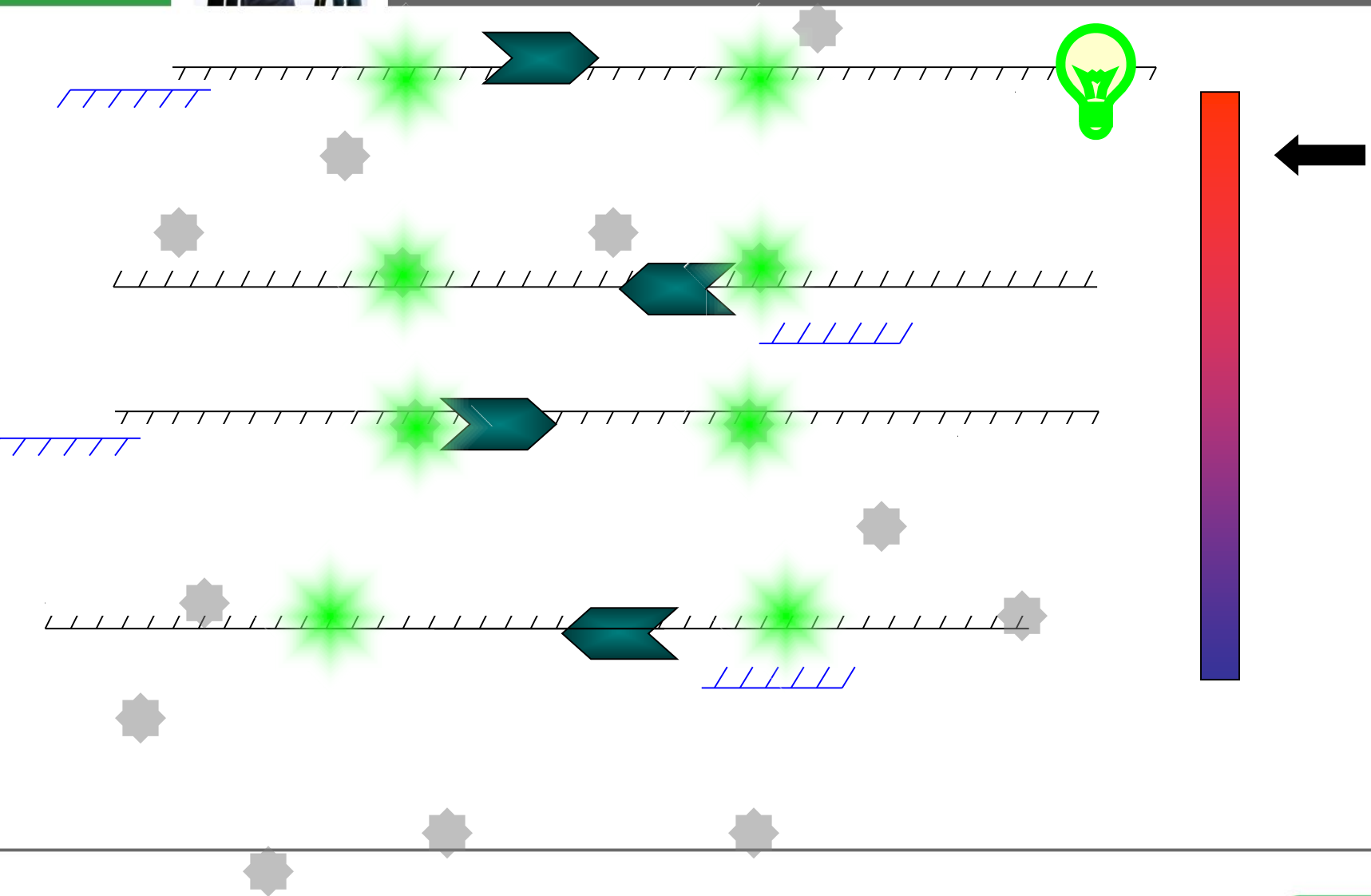


SYBR Green I





SYBR Green I





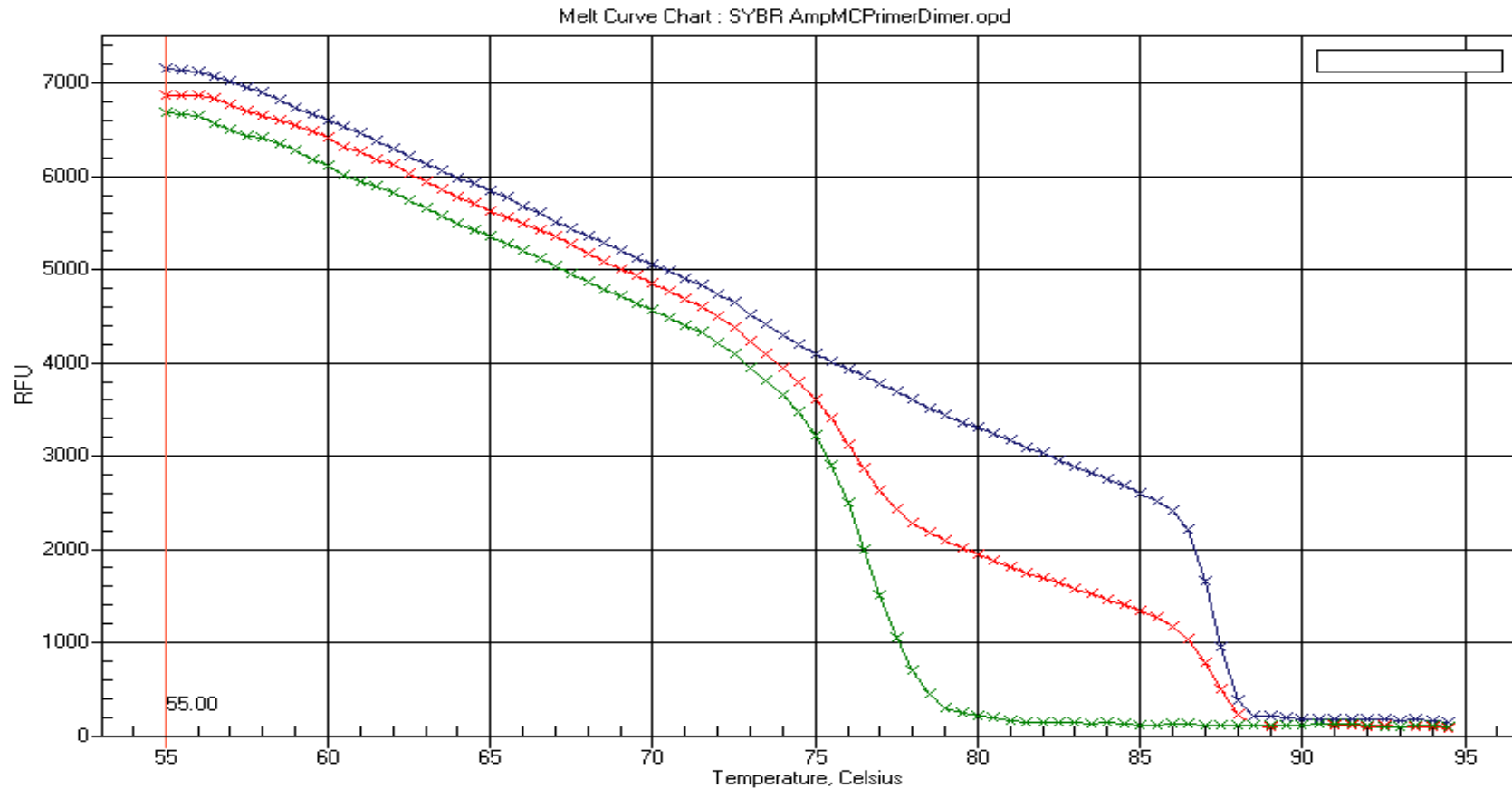
融解曲线反应程序

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		

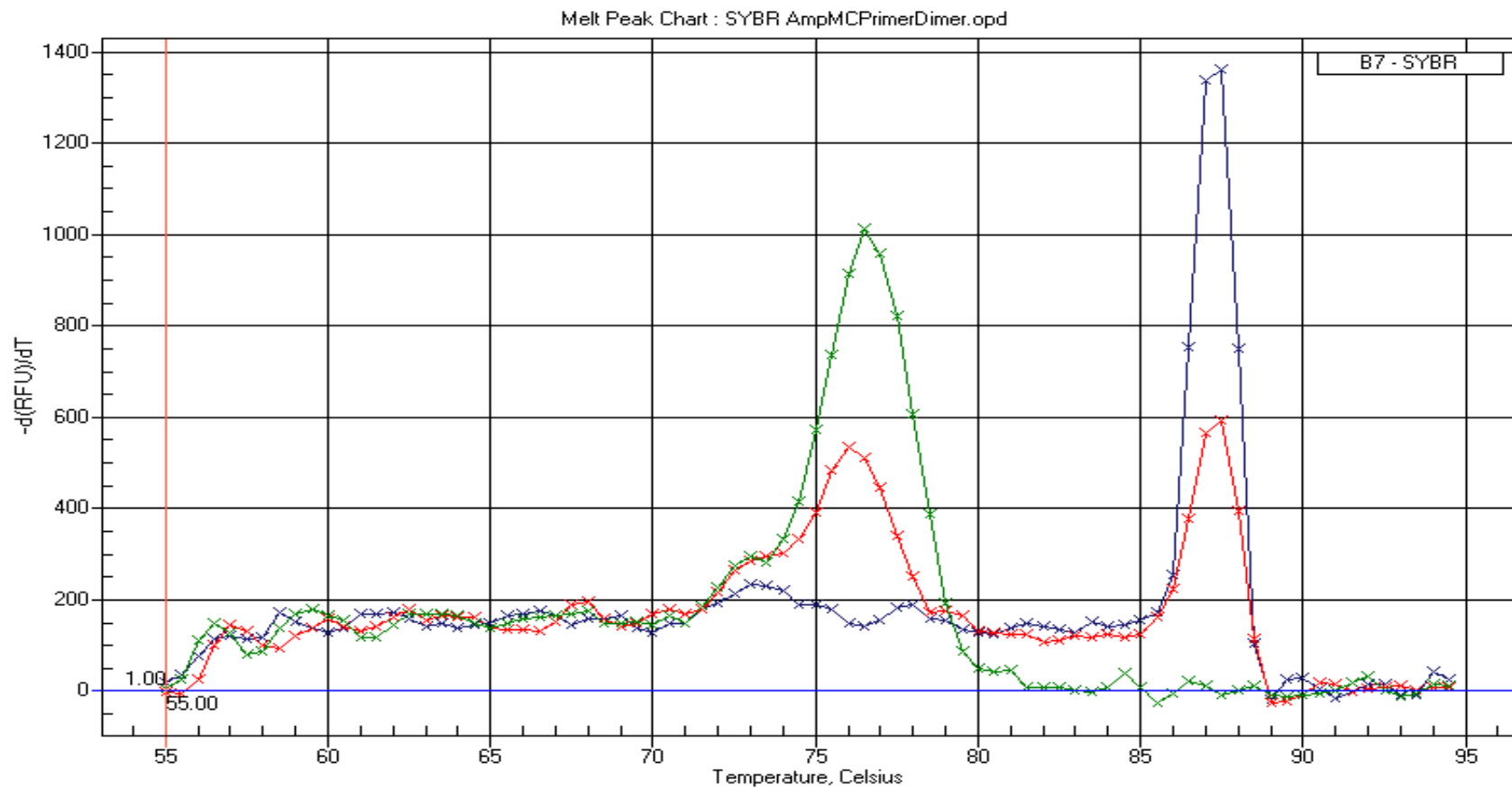
2、软件自动分析结果，生成融解曲线图谱

融解曲线分析-原始图谱





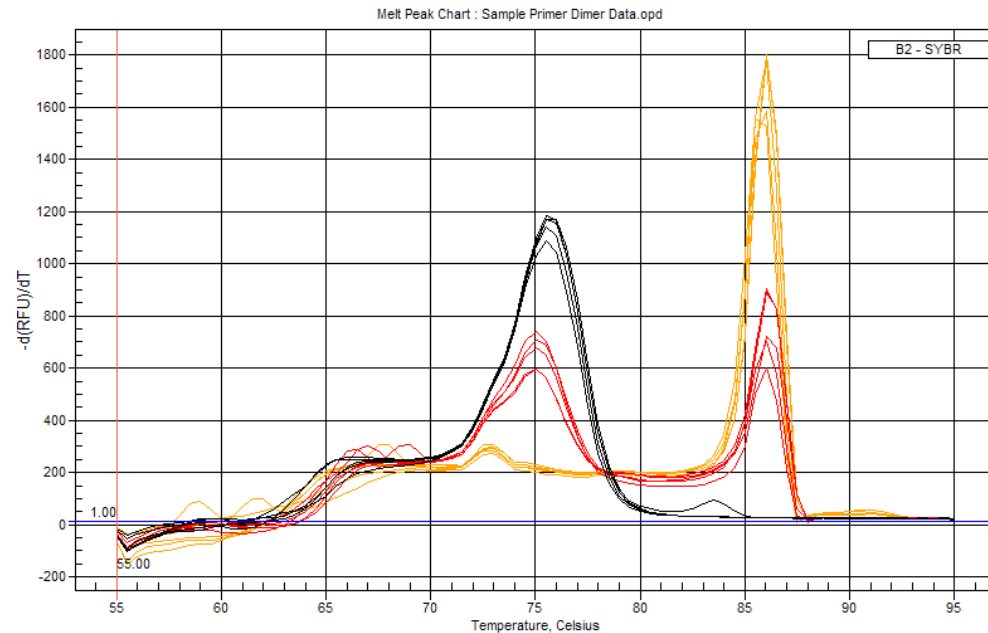
融解曲线分析-导数图谱





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



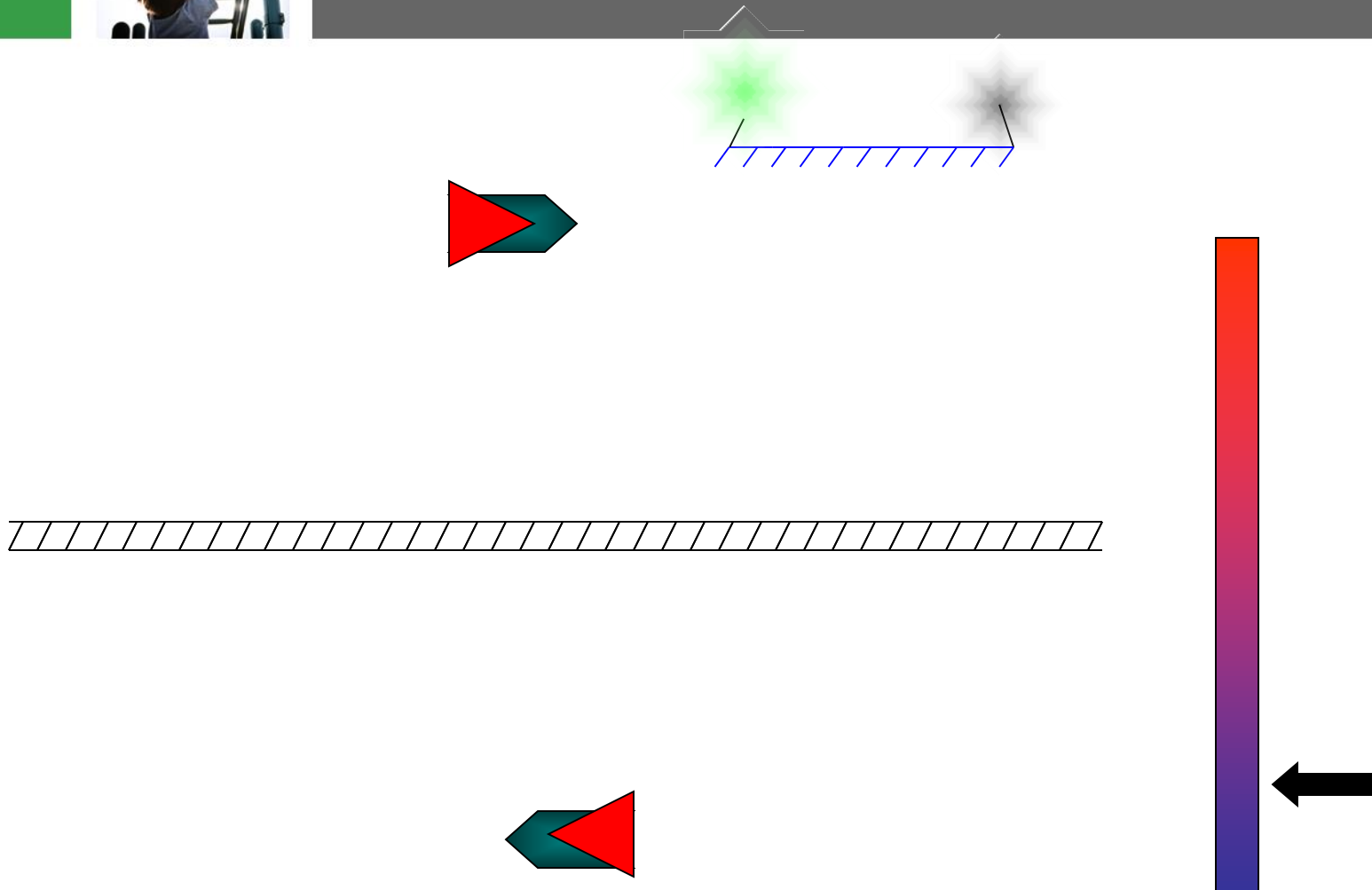


AQMAN 探针



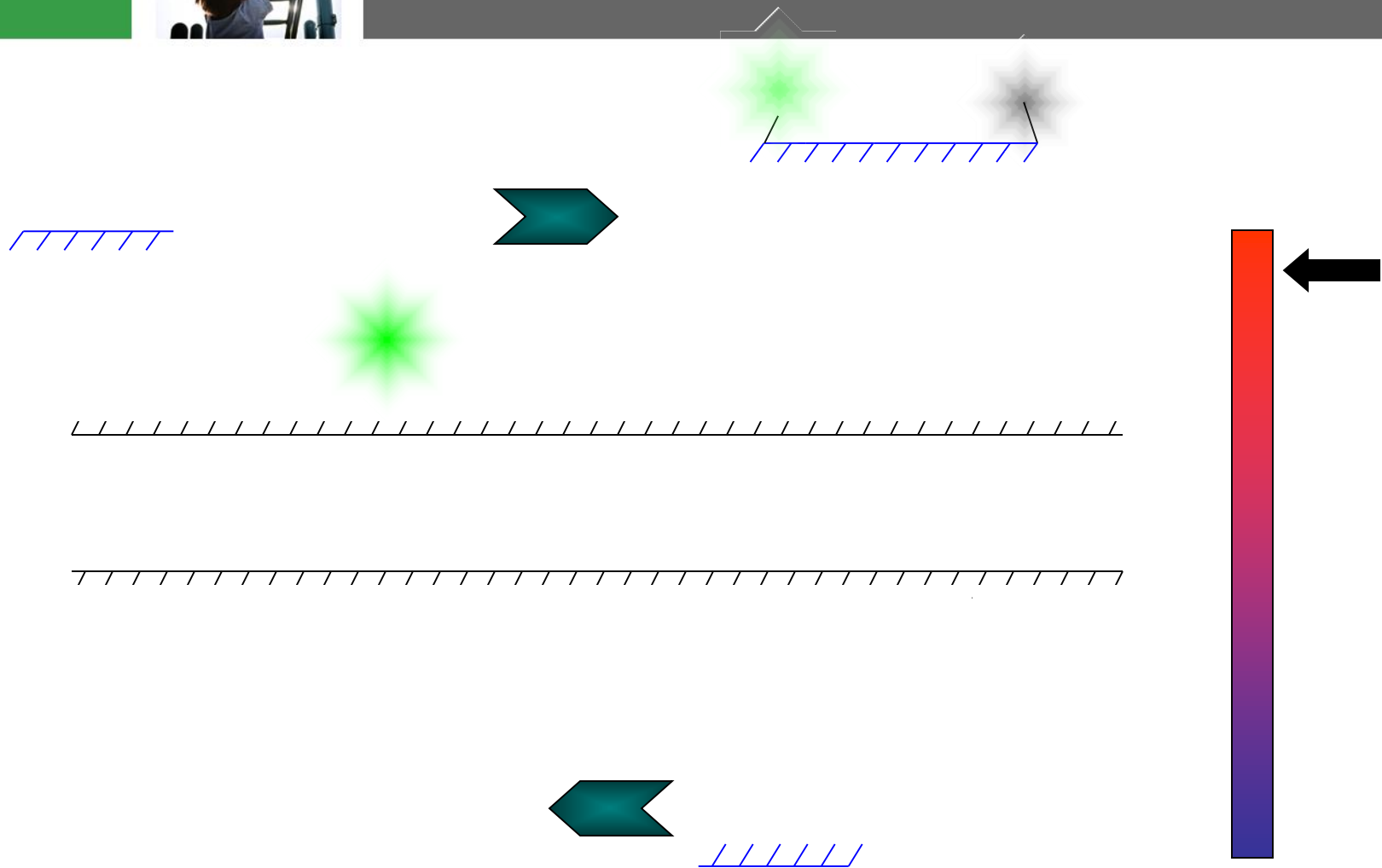


TAQMAN 探针





TAQMAN 探针





TaqMan探针小结

- ❑ 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