

荧光定量PCR的技术原理和应用

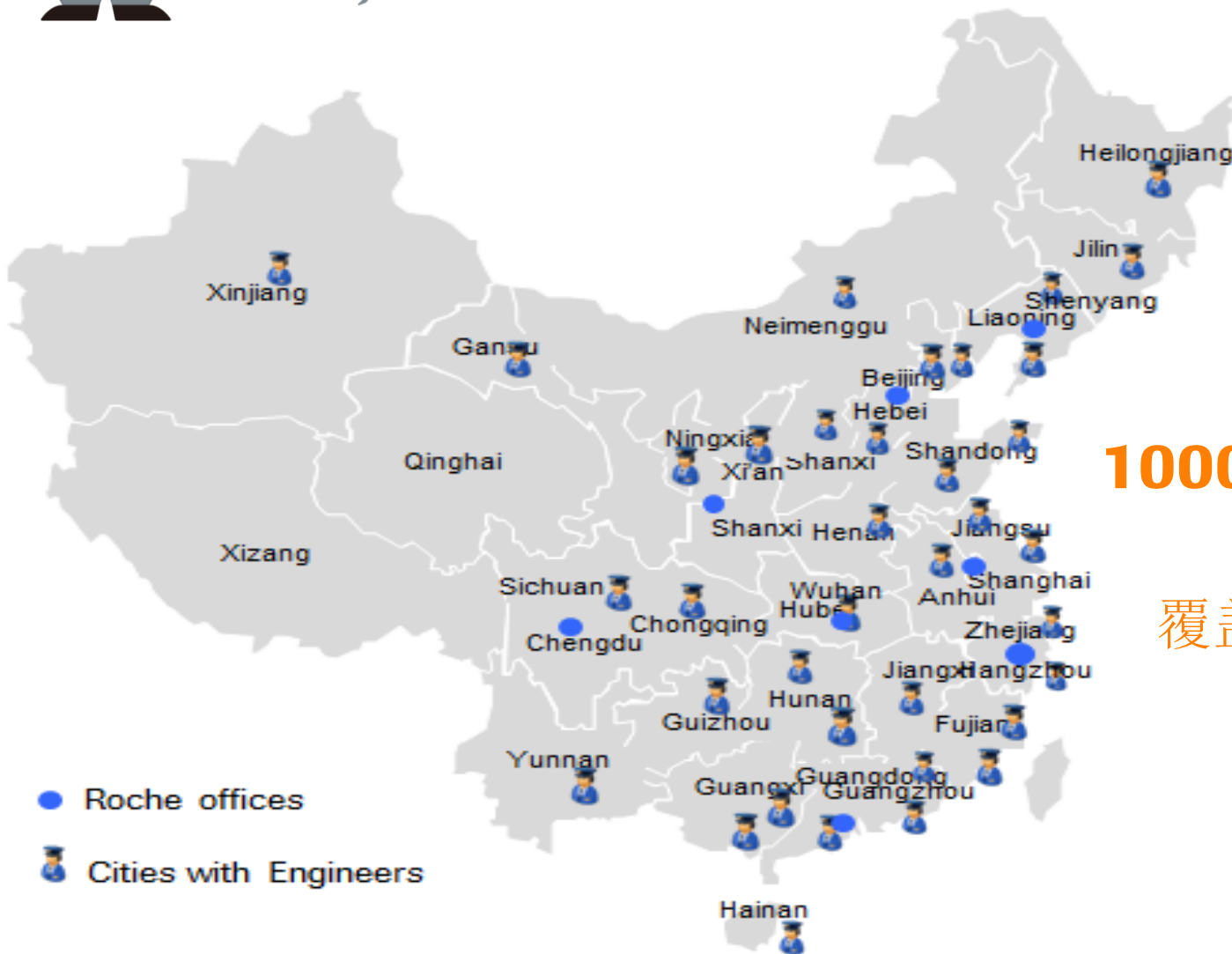
罗氏诊断应用专员：林炎城

邮箱：yan_cheng.lin@roche.com





Care your care | 服务常在 关爱有加⁺



1000名客户服务专业人士

覆盖约70个城市

带着你的问题



内容

- **Real-time PCR的基本原理**
- **Real-time PCR的常见检测模式**
- **Real-time PCR硬件介绍**

罗氏诊断生命科学部核心服务领域之一



实时定量PCR原理

PCR原理简述

聚合酶链式反应 (PCR) :

能够按照模板DNA序列，在DNA聚合酶的催化下，用4种dNTP来合成与模板DNA完全相同的拷贝，从而在多种DNA分子的混合物中特异地扩增某一特定DNA片段。

- 模板DNA
- 与模板DNA两端互补的一对引物
- DNA聚合酶
- dATP, dGTP, dCTP, dTTP

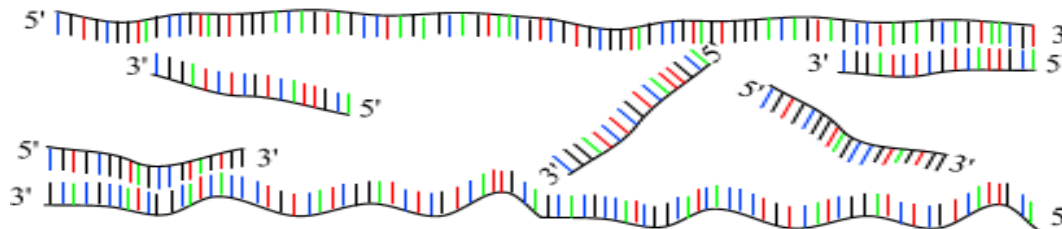
PCR原理

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

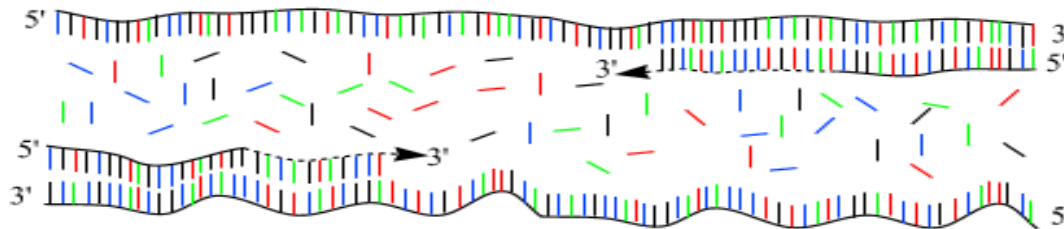
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's

PCR 的扩增公式

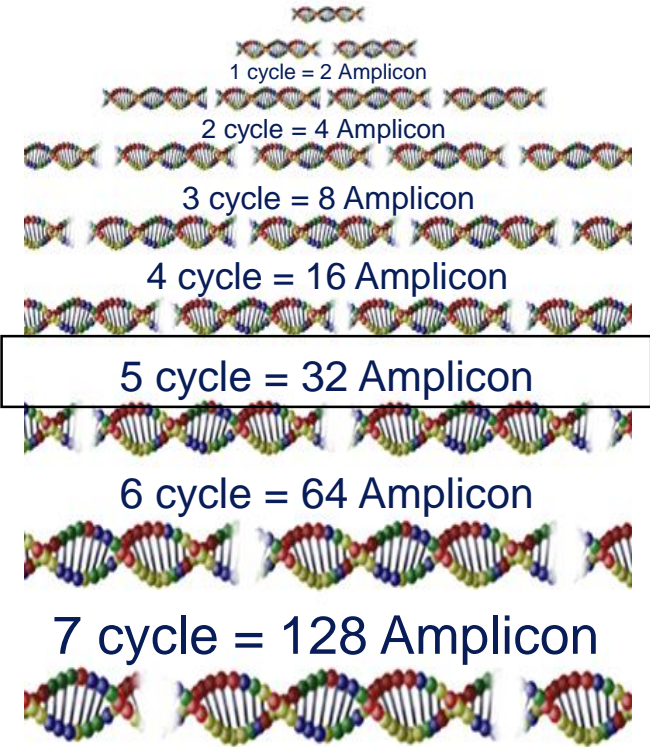
$$N = N_0 \times E^n$$

N: 扩增子数量

N₀: 起始模板数量

E: 扩增效率, 理论值为2

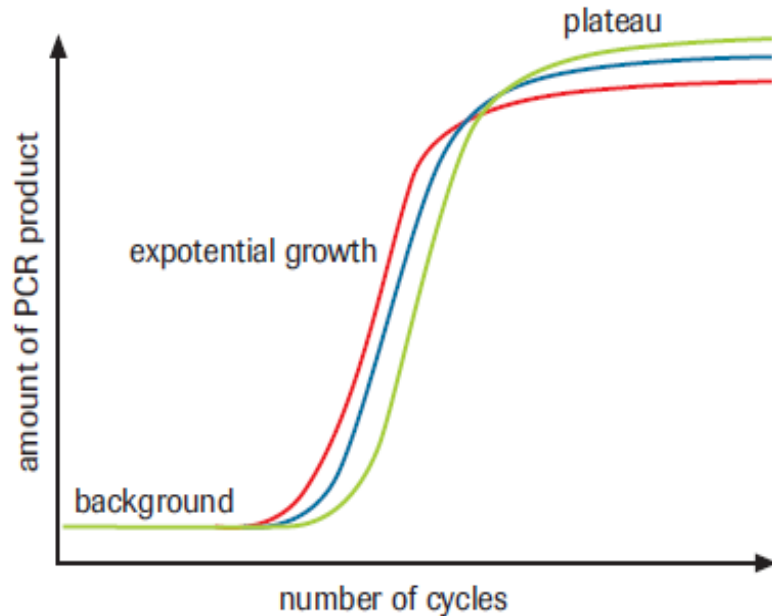
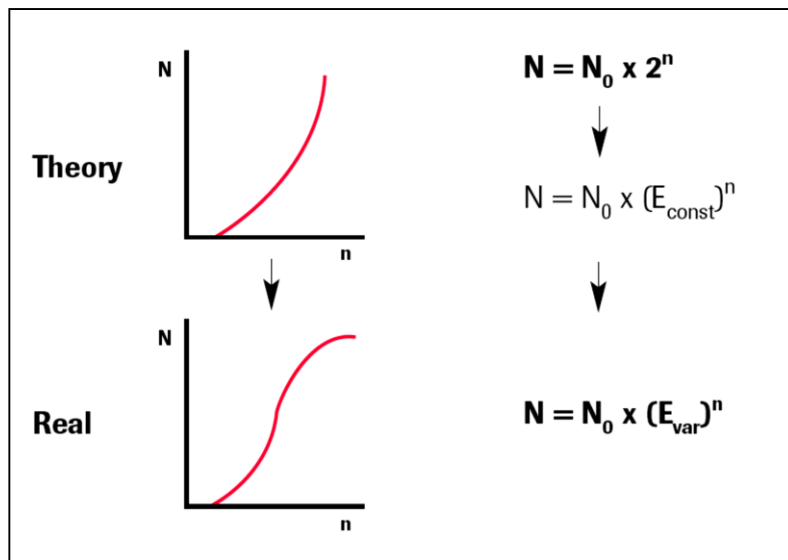
n: 循环数



No. of Cycles	No. of Target Amplicons
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
10	1024
20	1,048,576 (1.0 E6)
30	1,073,741,824 (1.0 E9)
37	137, 438, 953, 472 (1. 3 E11)
40	1,099,511,627,776 (1.1 E12)

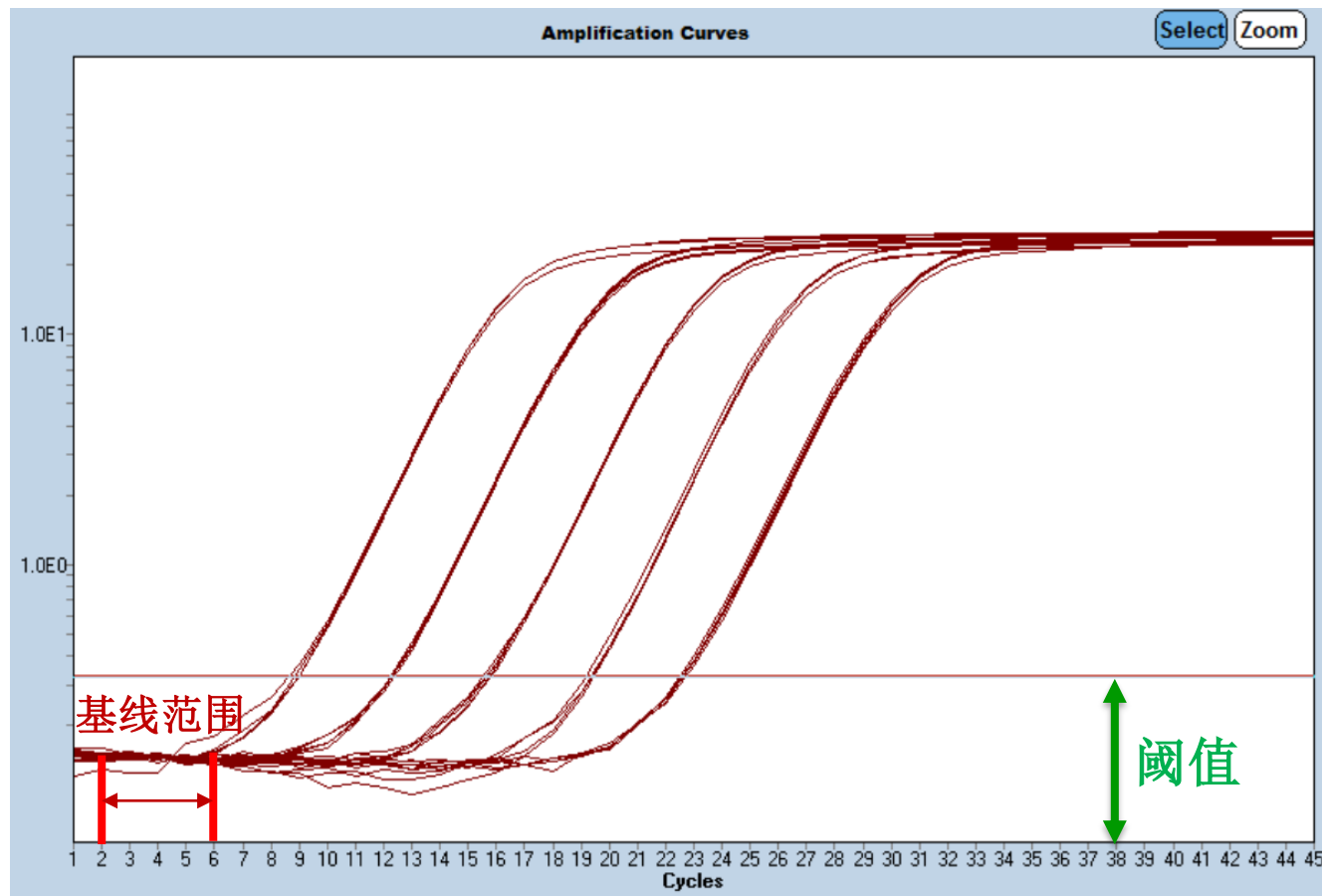
Real-Time PCR的扩增曲线

- 在实时荧光定量PCR反应中，引入了一种荧光化学物质，随着PCR 反应的进行，PCR 反应产物不断累计，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一个荧光强度信号，这样我们就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化，从而得到**荧光扩增曲线**



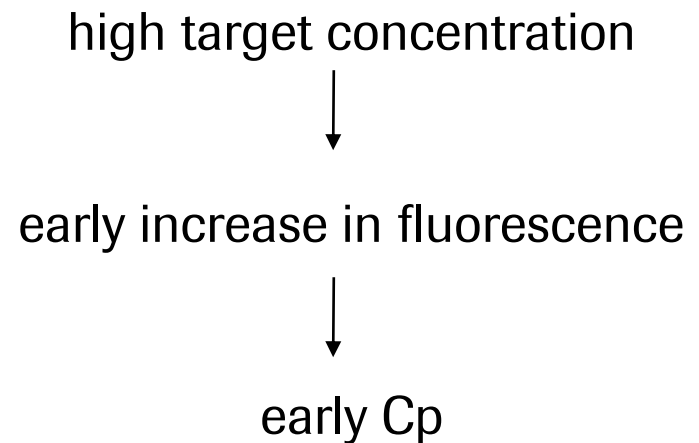
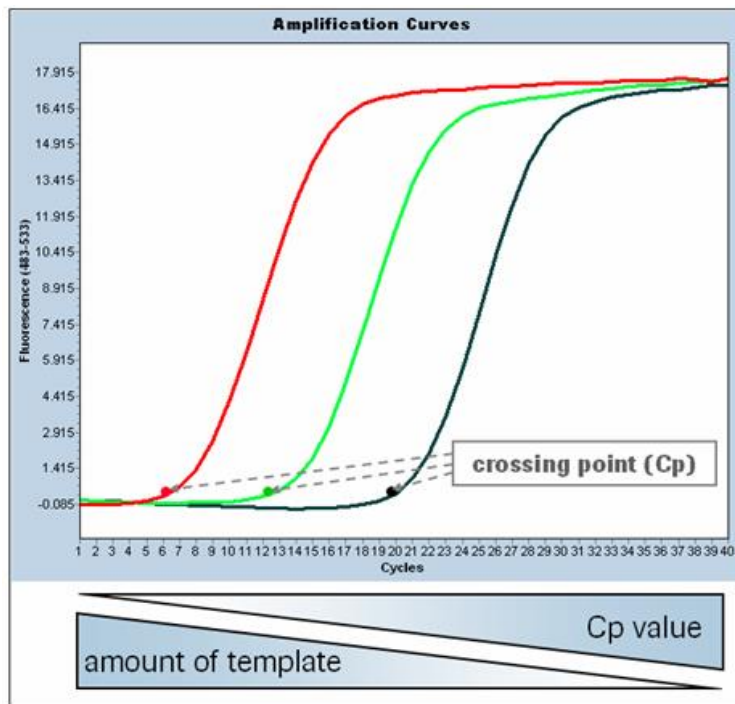
荧光阈值

- 把PCR反应的前6个循环的荧光信号作为荧光本底信号
- 荧光阈值的默认设置是2-6个循环本底荧光信号平均值的12倍



Real-Time PCR And Crossing Points

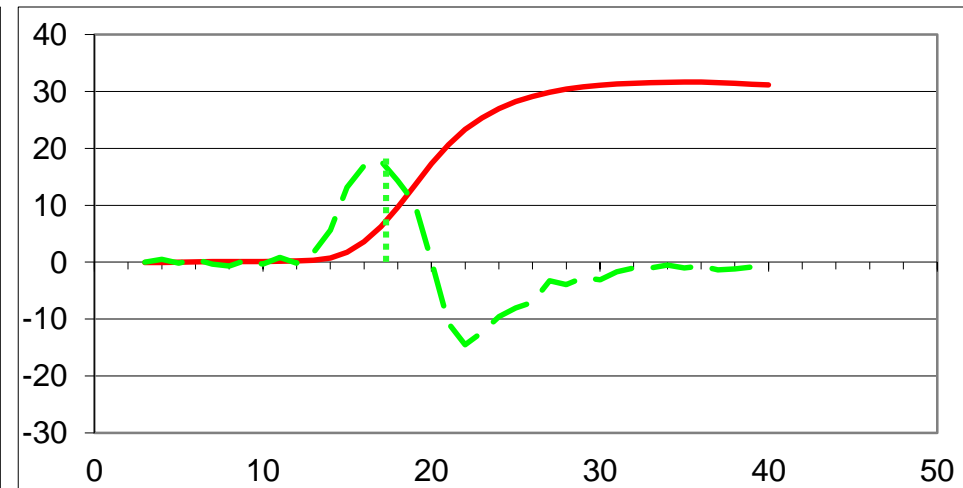
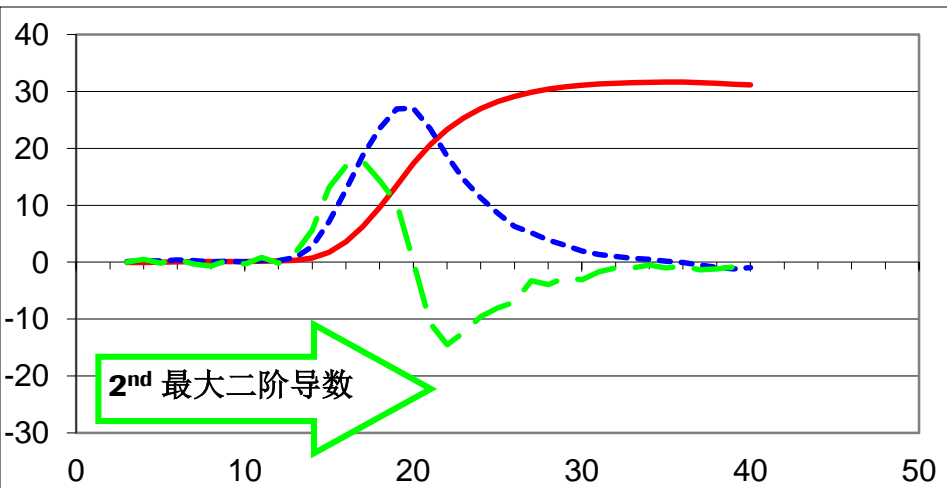
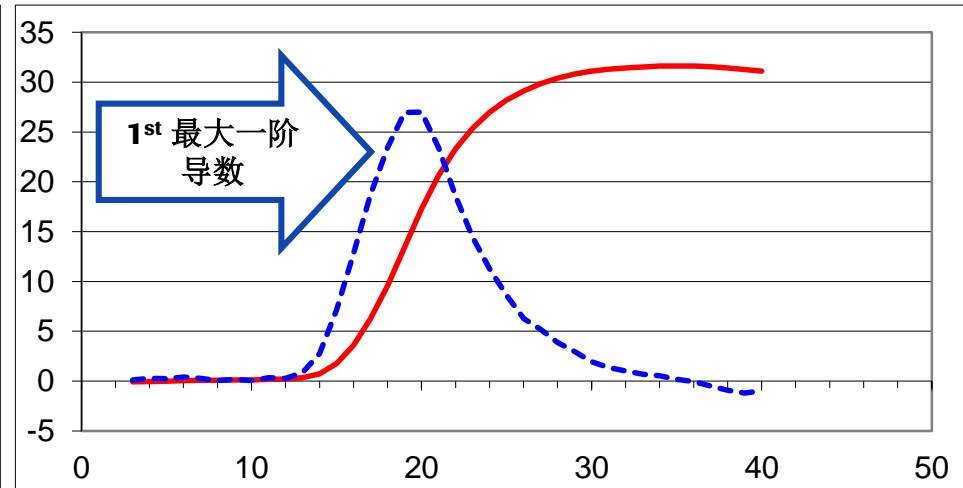
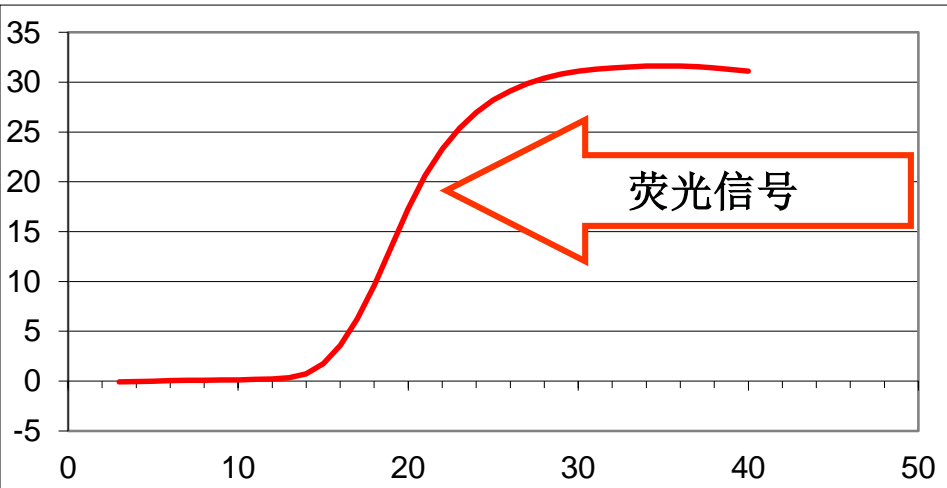
- **不同的叫法:** Real-time PCR; Quantitative PCR; Kinetic PCR
- **Cp的定义:** 样品的荧光强度超过背景荧光值 (**荧光阈值**) 的时刻所对应的循环数, crossing point (Cp), quantification cycle (Cq), threshold cycle (Ct)含义相同。
- **假设:** 对于所有的样品, 在 “crossing point” 时刻, DNA分子数都是一样的



Cp计算原理——最大二阶求导

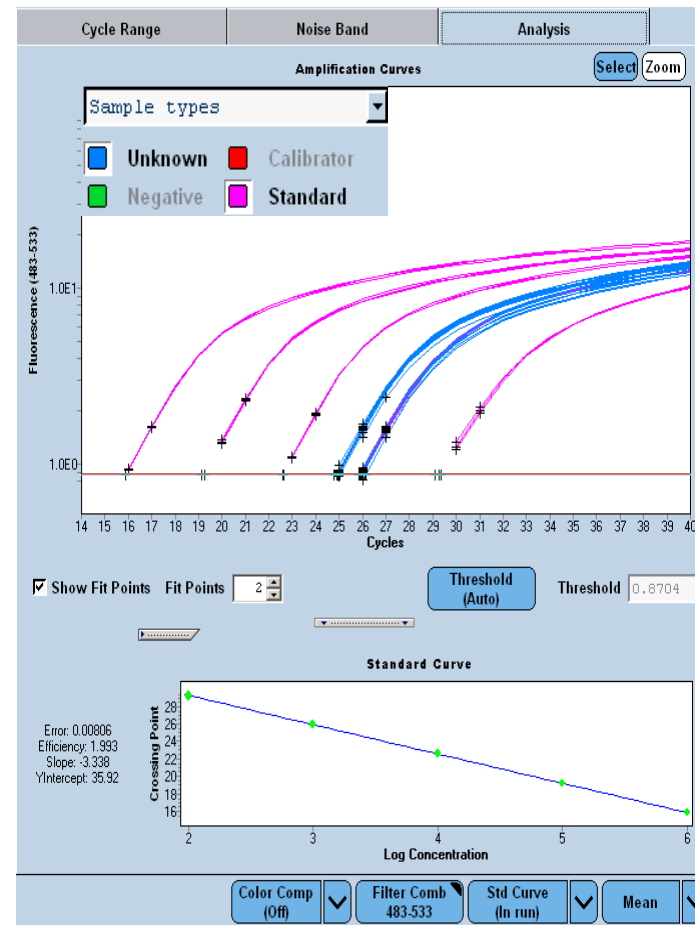
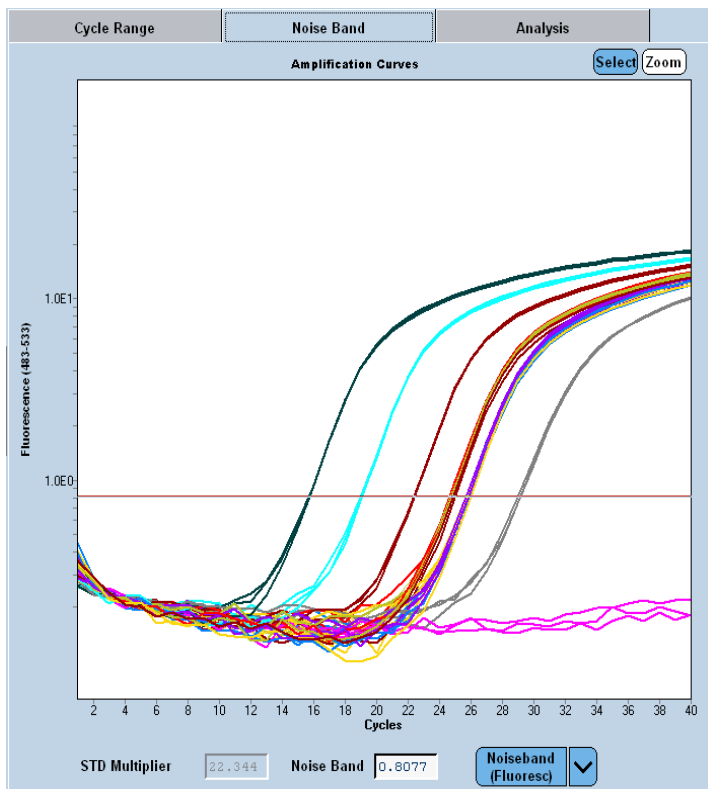
全自动计算方法

- 无需使用者任何定义
- 根据扩增曲线形状自动计算



Cp 值的计算

Fit Points 法



半自动计算方法

- 使用者自行调节曲线噪音

普通PCR和荧光定量PCR的区别



VS

普通PCR	荧光定量PCR
在PCR反应的 平台期 检测， 分析 终点 产物的量	在PCR反应的 对数期 检测， 分析 起始点 产物的量
检测模式为电泳	实时监测荧光信号
动力学范围有限	动力学范围广($10^0 \sim 10^{10}$ 拷贝/mL)
副产物形成不能鉴别	有效鉴别非特异扩增和突变
绝对和相对定量困难(相对于 看家基因的定量复杂)	不仅可以相对定量， 还可以绝对定量

问题与讨论



内容

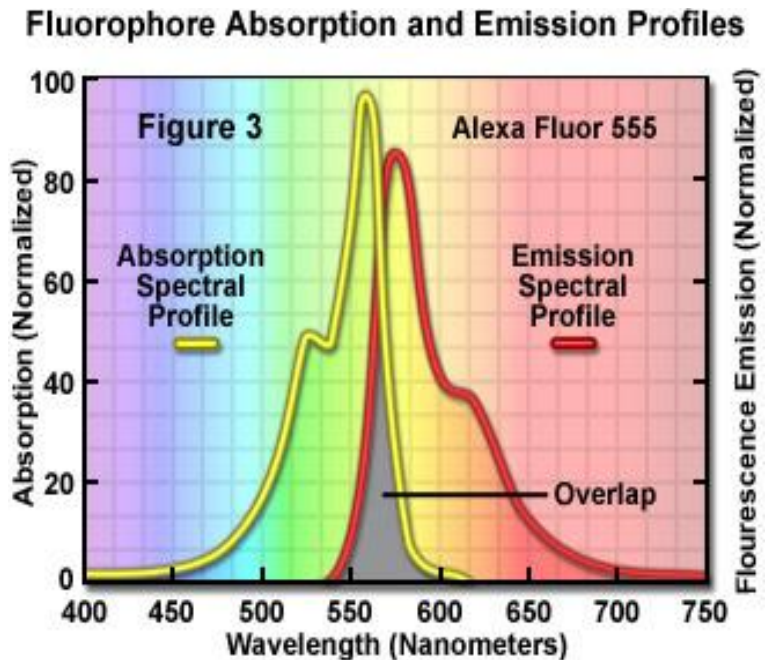
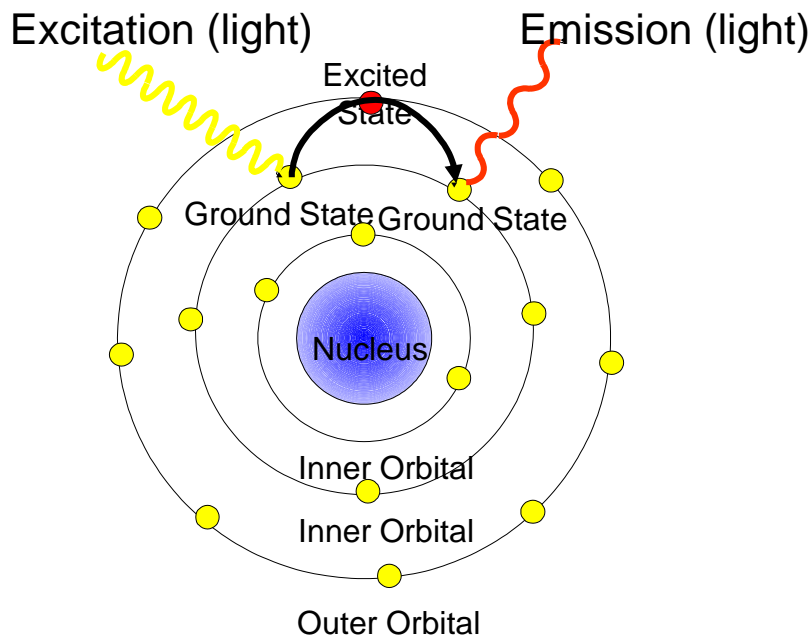
- **Real-time PCR的基本原理**
- **Real-time PCR的常见检测模式**
- **Real-time PCR硬件介绍**

Real-time PCR的常见检测模式

- **非特异性染料**
 - *SYBR Green I*
 - *ResoLight*
- **序列特异性探针**
 - *Taqman*
 - *Molecular Beacons*
 - *HybProbes*
 - *Simple Probe*
 - *Universal probe*

荧光分子的工作原理

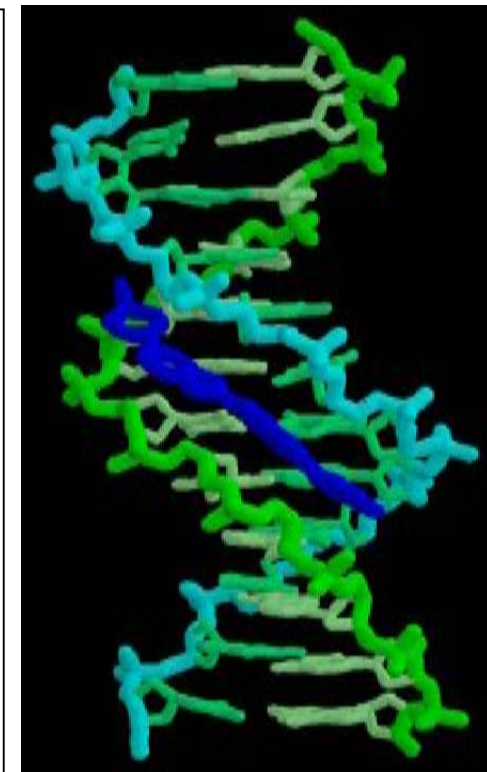
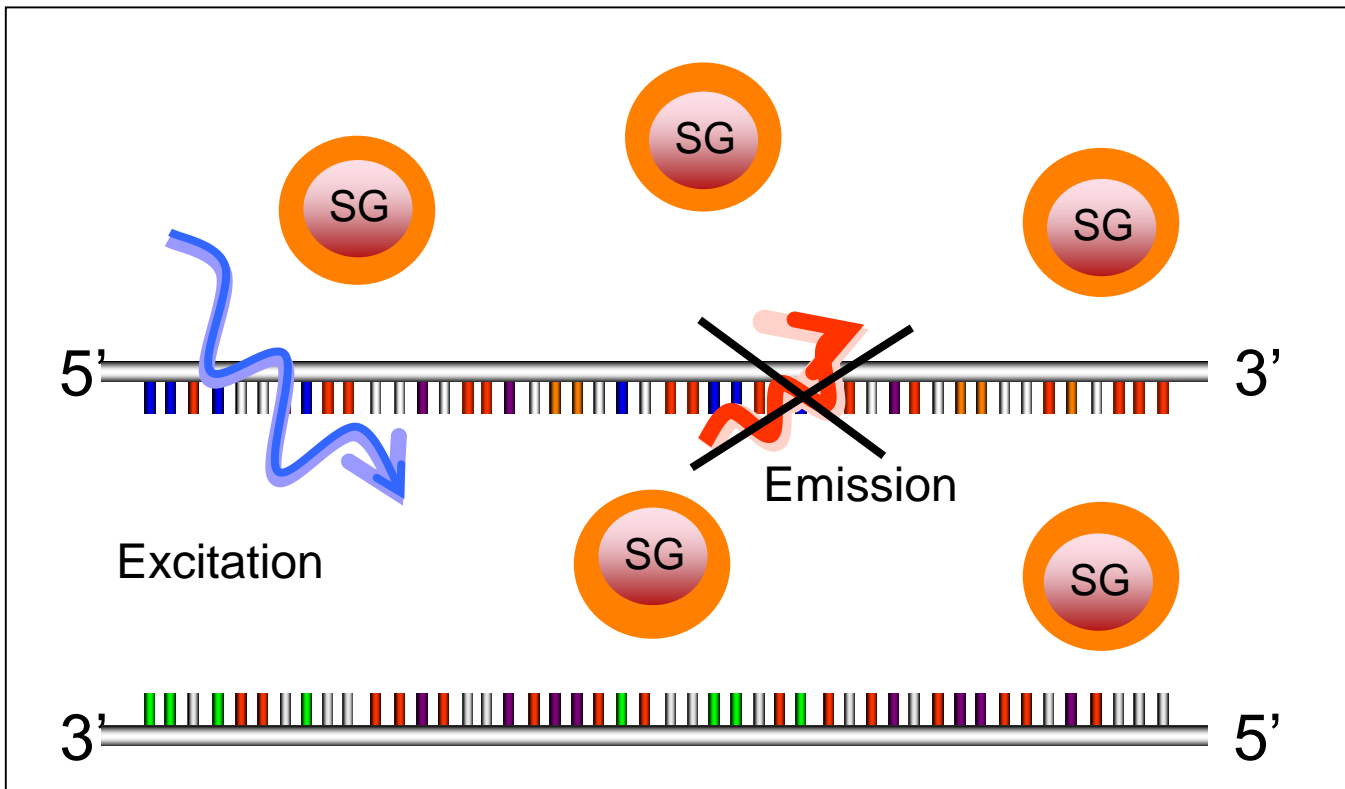
- 吸收短波长光源的能量
- 发出长波长的光
- 发射光谱在长波长区域有“拖尾”现象



非特异性染料检测-*SYBR Green I*

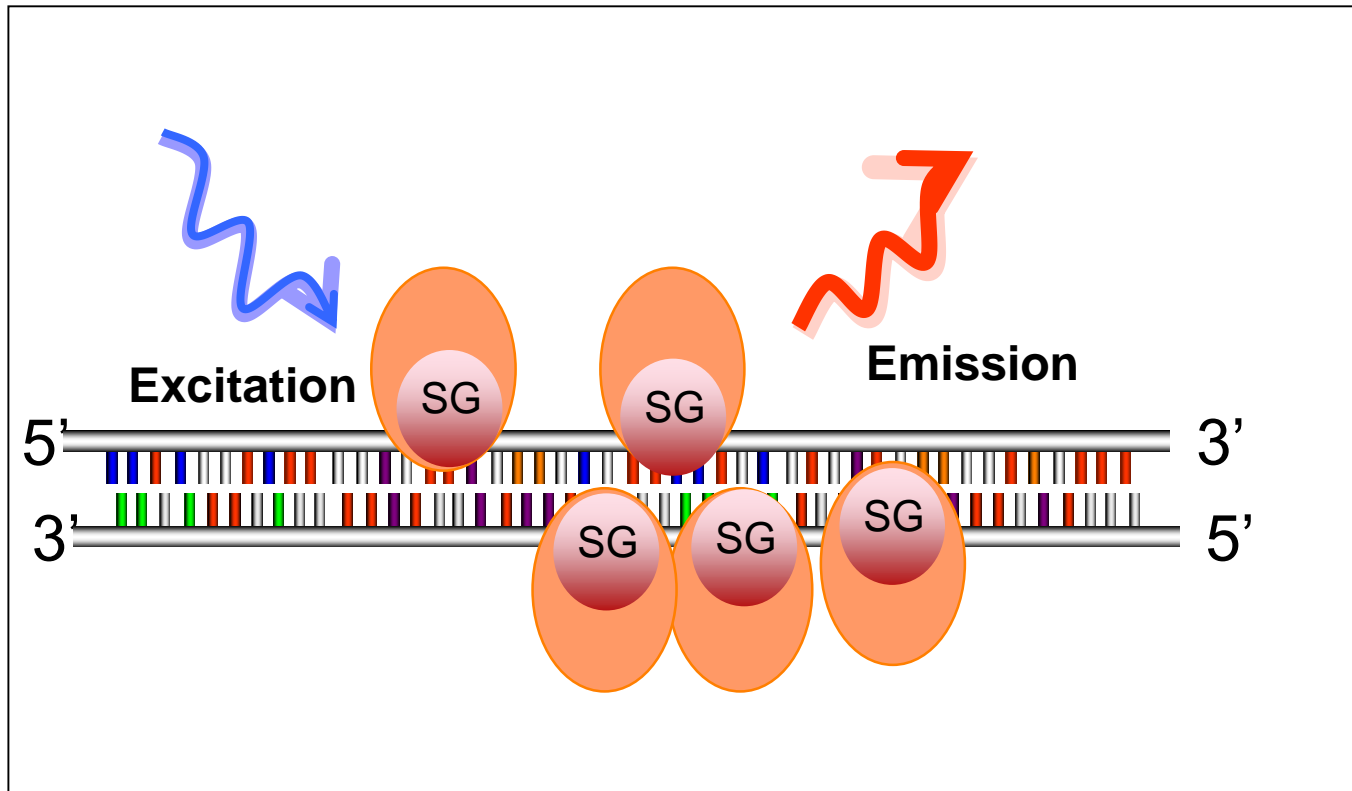


- SYBR Green I是具有绿色激发波长的染料，能结合于任意dsDNA双螺旋小沟区域，不依赖于序列
- **不饱和** dsDNA 结合染料
- Excitation: 488nm; Emission: 533nm
- 信号检测: elongation; melting curve



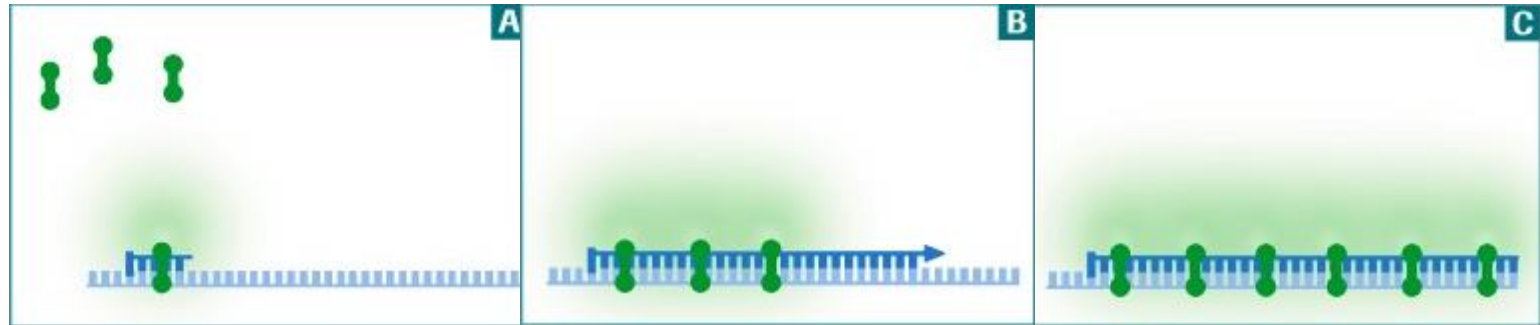
非特异性染料检测-*SYBR Green I*

- SYBR Green I是具有绿色激发波长的染料，能结合于任意dsDNA双螺旋小沟区域，不依赖于序列
- **不饱和** dsDNA 结合染料
- Excitation: 488nm; Emission: 533nm
- 信号检测: elongation; melting curve



实时定量PCR染料与探针

SYBR Green I 的优势和局限



优势

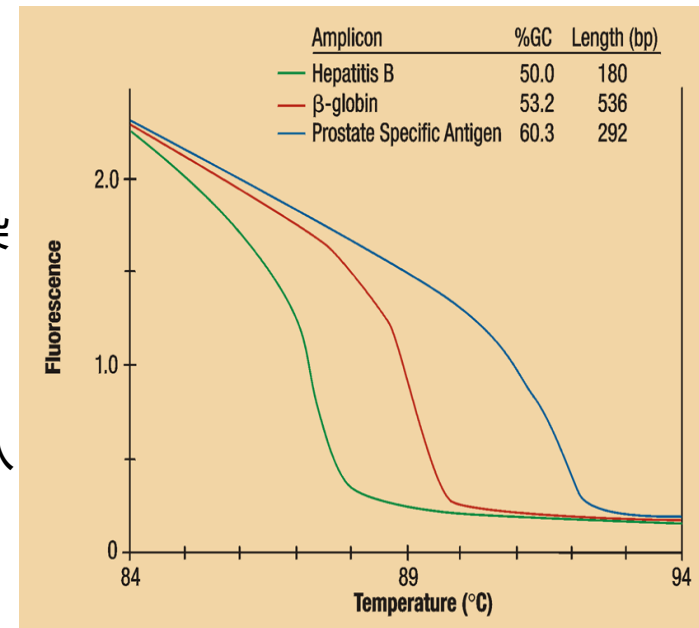
- 对DNA模板没有选择性，适用于任何DNA，通用性好
- 使用方便
- 不需要设计和合成复杂探针
- 灵敏度高
- 价格便宜

局限

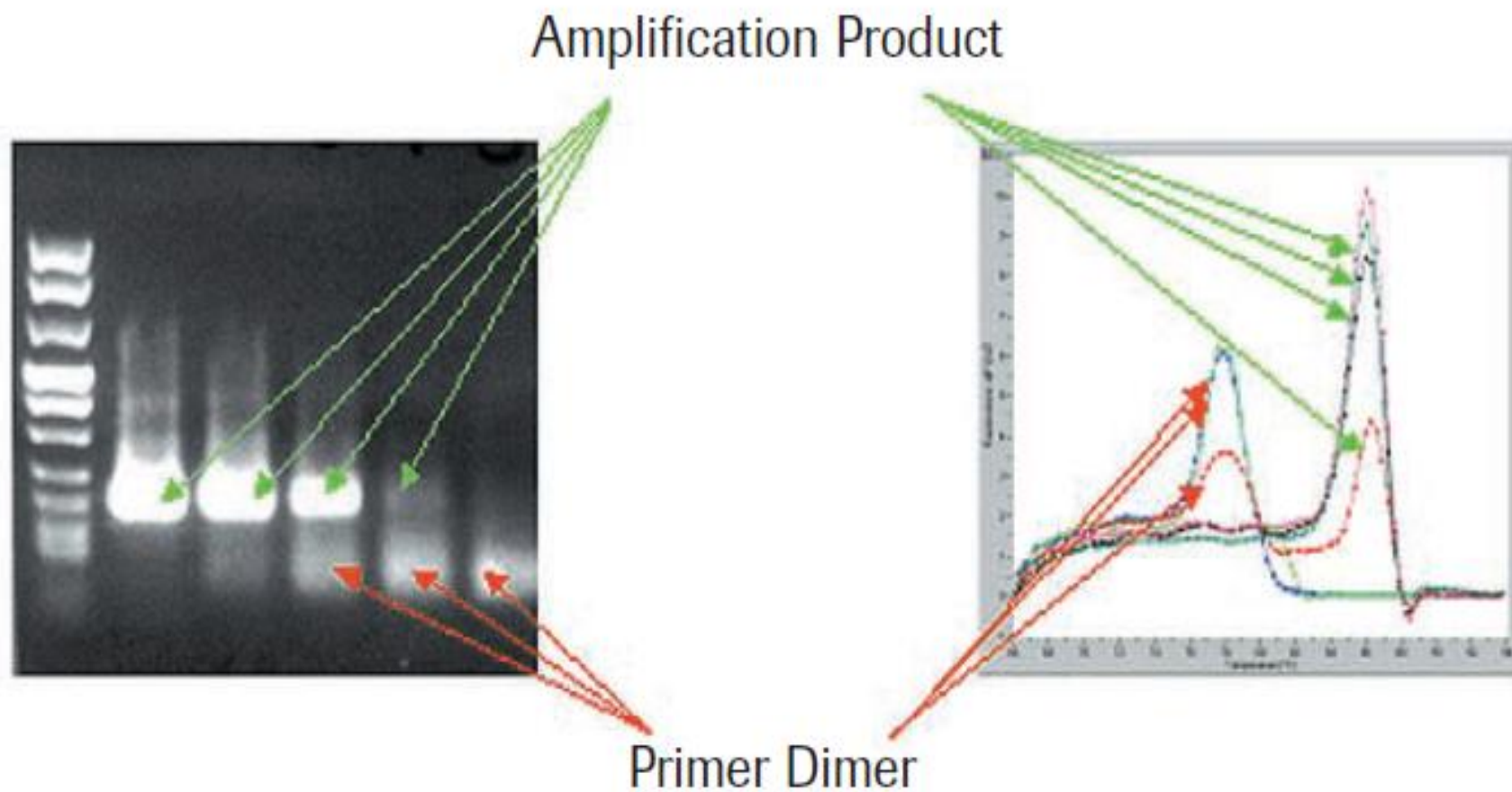
- 会与非特异性双链DNA（如引物二聚体）结合，产生假阳性，需要通过后续熔解曲线分析进行产物鉴定
- 对引物特异性要求较高

使用溶解曲线分析进行产物验证

- T_m 熔解温度：
 - 50% dsDNA 变性为 ssDNA 时的温度
 - 每个PCR产物都有其特定的 T_m
 - 非特异性产物，引物二聚体都可以通过看T_m值来判断出来
- 影响 T_m的因素：
 - GC%， 片段长度
 - 盐离子浓度， Mg²⁺浓度， SYBR Green I 染料的浓度
- 熔解曲线：随着温度升高， SYBR Green I 染料从变性的 dsDNA上脱落下来， 荧光减弱。



溶解曲线检测引物二聚体



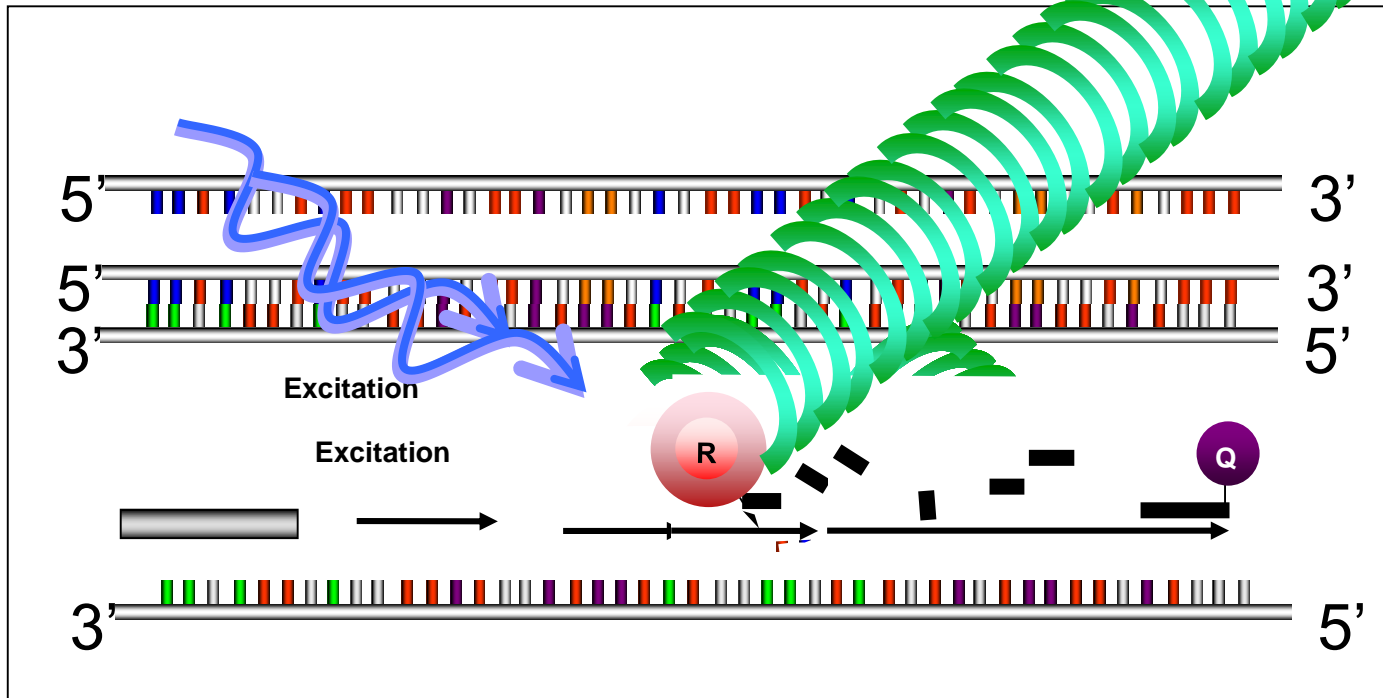
非特异性染料检测-*SYBR Green I*

实验 Set-up

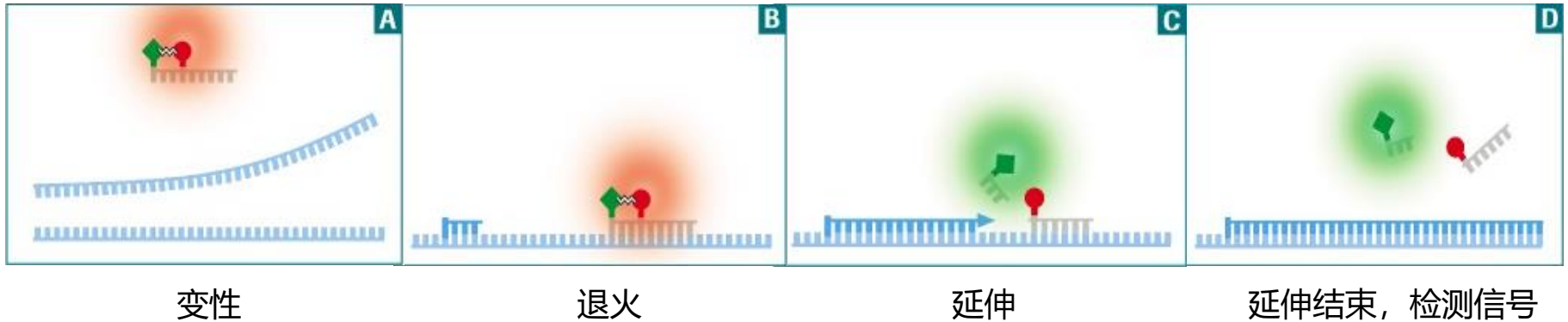
- 模板: 50-100ng gDNA for 20ul reaction
 - 模板量太多是不好的
- 引物: 0.2-1uM
 - 0.5uM recommended
- Enzyme, dNTPs, MgCl₂, buffer
- SYBR Green I
 - 太多的 SYBR Green 是不好的
- Negative control (阴性对照)
 - 阴性对照对于使用染料法(SYBR Green)的实验来说特别的重要

序列特异性探针检测-水解探针 (*Taqman*)

- 例如: TaqMan probes, Universal ProbeLibrary probes
- 将一个荧光分子报告基团(Reporter, R), 如FAM与淬灭基团(Quencher, Q)偶联,探针完整时, R所发射的荧光能量被Q基团吸收, 无荧光
- 扩增时, 利用 DNA聚合酶的5' 外切酶活性水解掉探针的5' 端
- 退火与延伸均在 60°C
- 信号检测: elongation



TaqMan 水解探针法的优势和局限



优势

- 特异性高，可鉴定野生型和突变型
- 引物设计相对简单
- 重复性比较好

局限

- 只适合一个特定的目标
- 荧光探针不能自行标记，合成价格较高

序列特异性探针检测-水解探针 (*Taqman*)

实验 Set-up

- 模板: up to 500ng gDNA; 10^1 - 10^{10} copies of pDNA for 20ul reaction
 - 太多模板是不好的
- 引物: 0.3-1uM
 - 0.5uM recommended
- Enzyme, dNTPs, MgCl₂ , buffer
- 探针: 0.05-0.2uM
 - 0.1uM recommended
 - 对于多重PCR, 适当增加探针浓度
- Negative control

问题与讨论



内容

- **Real-time PCR的基本原理**
- **Real-time PCR的常见检测模式**
- **Real-time PCR硬件介绍**

LightCycler[®] 480 荧光定量PCR系统的优势

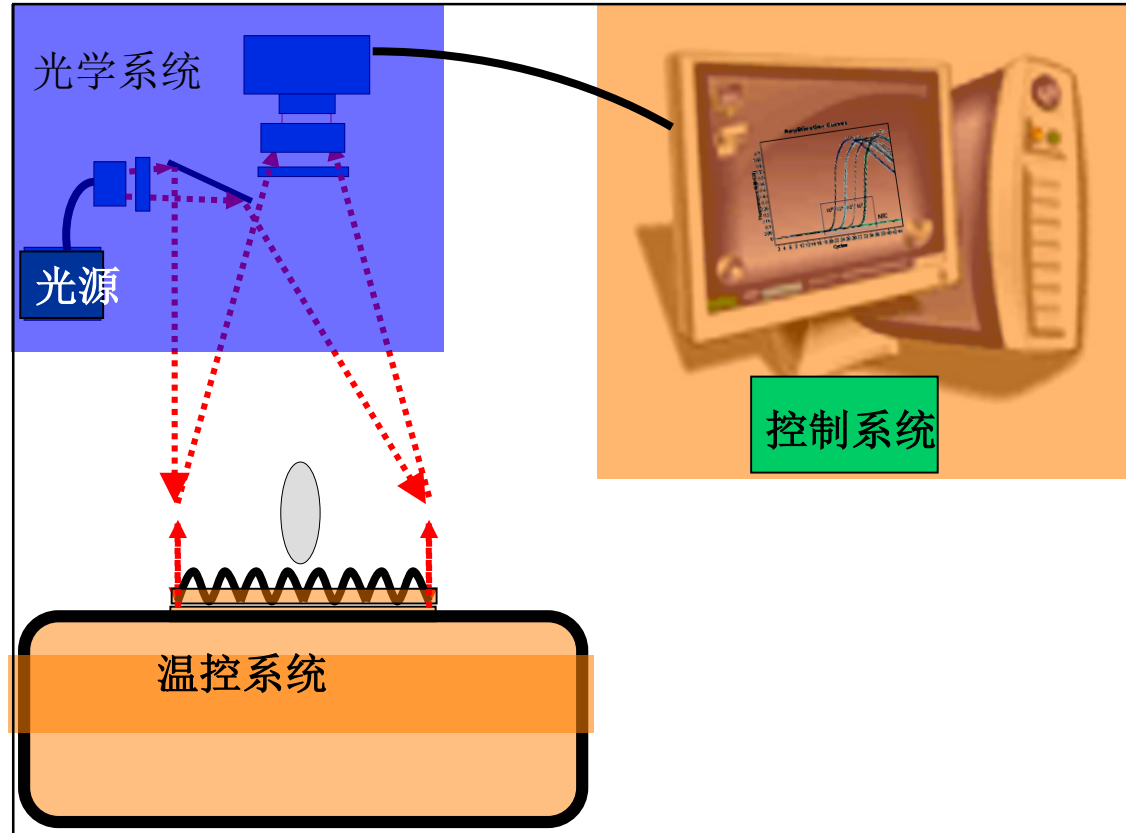
三好一快

光源好

温控好

检测好

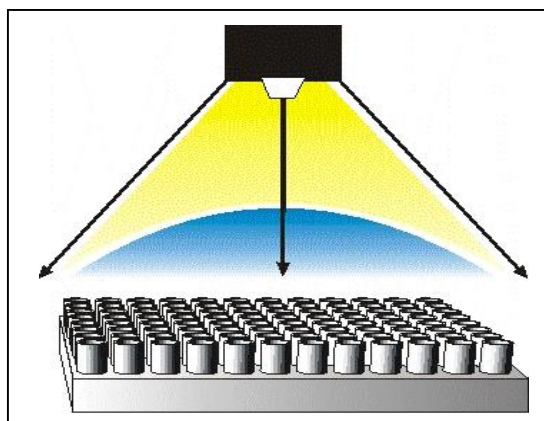
加热快



光学系统好



高强度白光固态光源 + 优化的光路系统

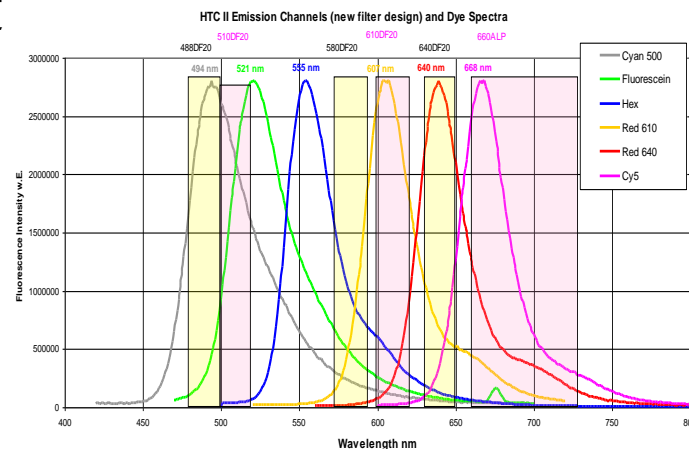
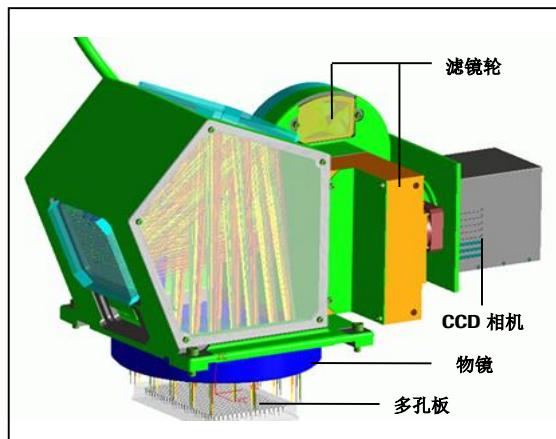


高强度白色固态光源

- 光强度高，无需预热
- 寿命长达20000小时，基本终身无需更换
- 5个激发通道，6个检测通道

光路系统

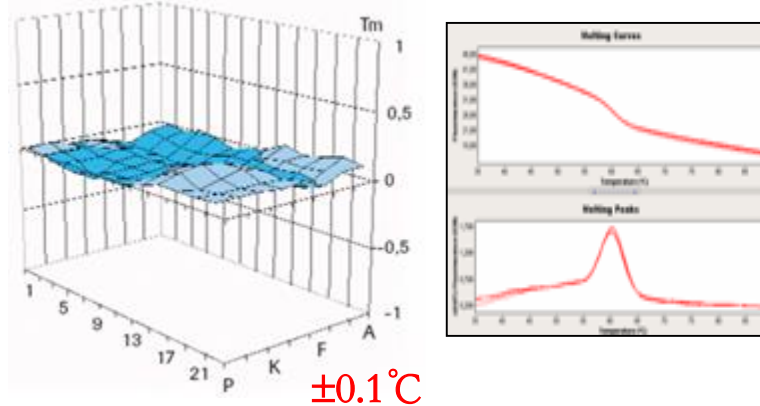
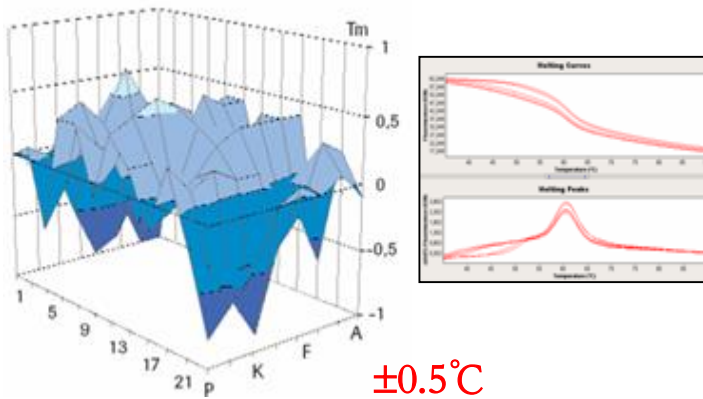
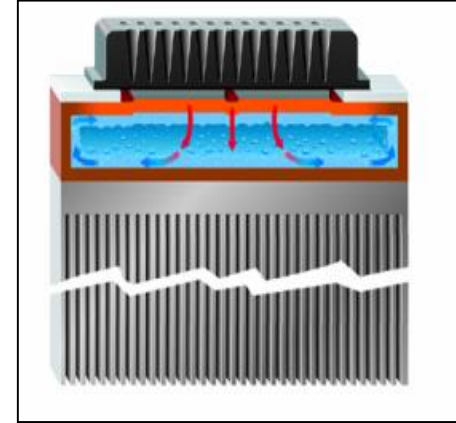
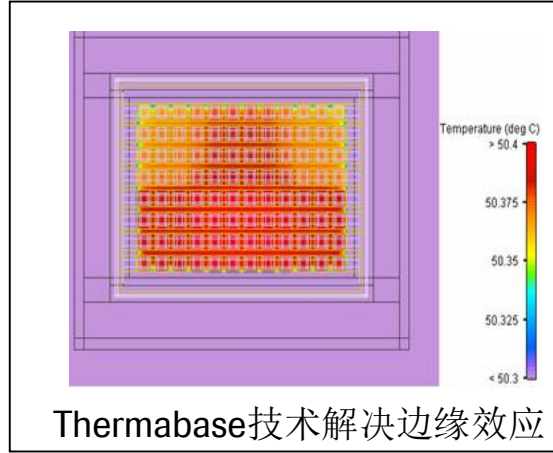
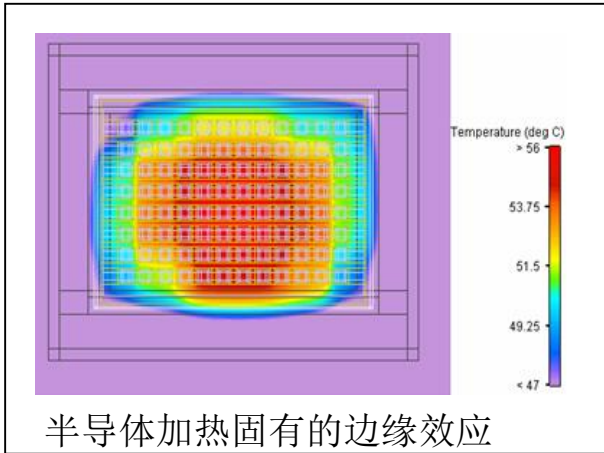
固定光路系统，无需定期校正
特别设计的**五棱反射光路**，减少光程差
有效避免传统仪器的中心强、两边弱的光学边缘效应
无需ROX被动染料校正



温控系统好



独一无二的 *Therma-Base* 专利技术

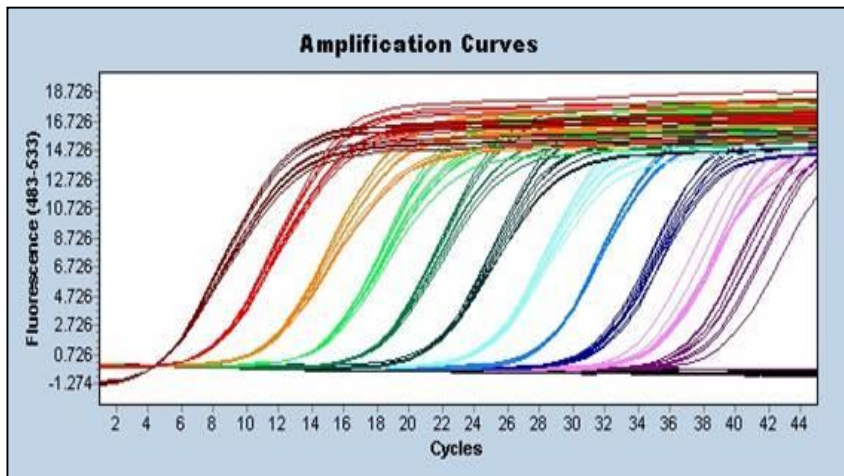
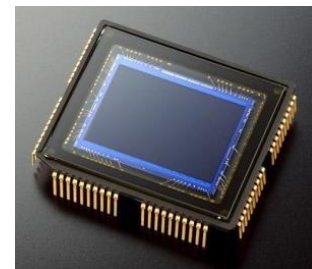


彻底解决边缘效应，孔间温度均一性达业内最佳的 $\pm 0.1^\circ\text{C}$

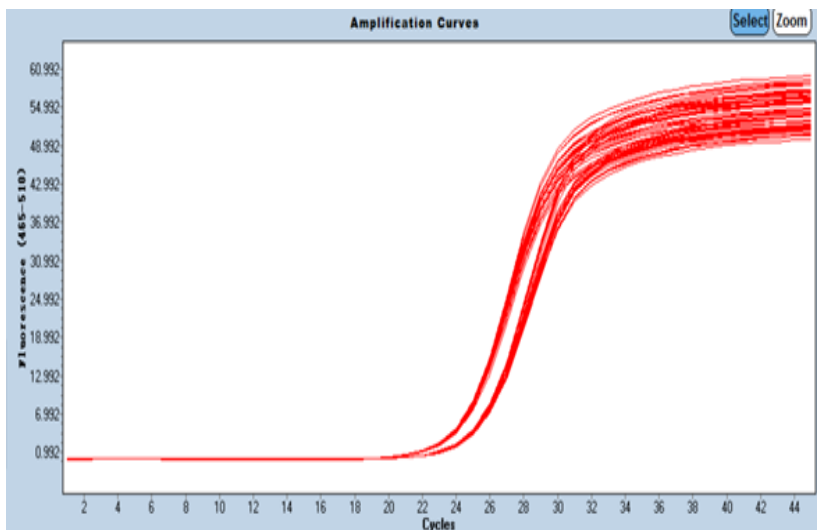
检测系统好



冷CCD检测芯片保证最好的分辨率和重复性



检测线性范围11个数量级: $10^0 - 10^{10}$



- 冷CCD检测芯片

- 仅业内高端仪器采用, 工作温度低至 $+10^{\circ}\text{C}$, 背景噪音低, 可获得最佳的检测分辨率

- 高分辨率熔解曲线(HRM)应用

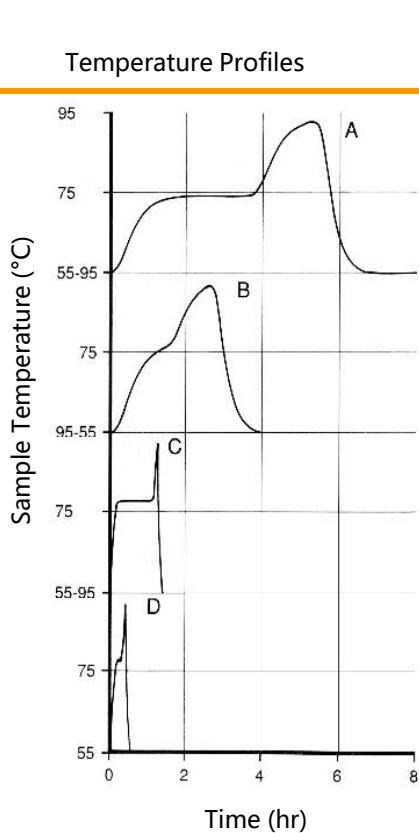
- 溶解曲线温度分辨率: 0.01°C
- 发表HRM相关的SCI文献数量为所有仪器之最

精确区分1000拷贝与2000拷贝, 是其他最好的同类仪器的5倍以上, 样本重复24次, Cp值标准差仅0.04, 孔间检测的重复性为 $\text{CV} \leq 0.15\%$ (Cp值) .

Sam...	Mea...	STD ...
A1, A1	25.07	0.04
A11, A	23.98	0.03

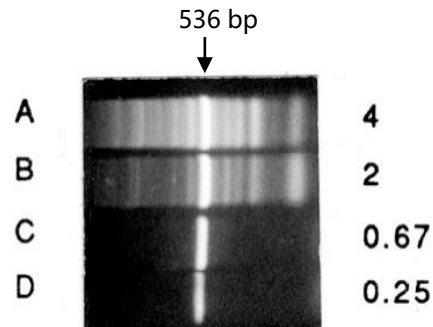
加热降温快

一小时内完成40个循环的常规检测



Gel Analysis

Time for 30 Cycles (hr)



Amplification of a 536 bp β -globin fragment from genomic DNA

- 升温4.8 °C/秒, 降温2.5 °C/秒
- 无需快速酶和薄壁管等特殊试剂和耗材, 通过硬件上的设计快速完成40个PCR循环

96孔模式 < 1 hour; 384孔模式 < 40 min

LightCycler® 480 荧光定量PCR仪

96孔模块与384孔模块互换



- 可互换的热循环模块
- 无需厂家工程师在场
- 无需重新校准
- 更换完毕后仪器自动检测并确认模块型号



Doing now what patients need next