

荧光定量 PCR 技术及其应用(一)

荧光定量 PCR (也称 TaqMan PCR,以下简称 FQ-PCR) 是美国 PE (Perkin Elmer) 公司 1995 年研制出来的一种新的核酸定量技术, 该技术是在常规 PCR 基础上加入荧光标记探针来实现其定量功能的, 与变通 PCR 相比, FQ-PCR 具有许多优点。本文拟就该技术的特点、原理和方法以及应用作一简要叙述。

1 特点

FQ-PCR 不仅具有普通 PCR 的高灵敏性, 而且由于荧光探针的应用, 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, 克服了常规 PCR 的许多缺点。如一般 PCR 产物都需通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色紫外光观察结果或通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测, 不仅需要多种仪器, 而且费时费力, 所使用的染色剂溴化乙锭对人体又有害, 这些繁杂的实验过程又给污染和假阳性提供了机会。而 FQ-PCR 只须在加样时打开一次盖子, 其后的过程完全是闭管操作, 不需要 PCR 后处理, 避免了常规 PCR 操作中的诸多弊端。实验一般使用 PE 公司研制的 ABI7100 型 PCR 扩增仪。该仪器具有以下特点: ①应用广泛: 可用于 DNA 和 RNA 的 PCR 产物定量、基因表达研究、病原体检测及 PCR 条件的优化等。②独特的定量原理: 采用荧光标记探针, 经激光激发后荧光量随 PCR 循环而累积, 从而达到定量目的。③工作效率高: 内置 9600 型 PCR 扩增仪, 电脑控制 1~2 小时全自动同步完成 96 个样品的扩增及定量。④无须凝胶电泳: 无须对样品进行稀释和电泳, 只须通过特殊探头在反应管内直接检测。⑤无管道内污染: 采用独特全封闭反应管及光电传导系统, 无须顾及污染。⑥结果重现性好: 定量动态范围高达五个数量级。所以自从此项技术研制成功以来, 受到许多科研工作者的重视并在多个领域得到应用。

2 原理和方法

FQ-PCR 的工作原理是利用 Taq 酶的 5'→3'外切酶活性，在 PCR 反应系统中加入一个荧光标记探针。该探针可与引物包含序列内的 DNA 模板发生特异性杂交，探针的 5'端标以荧光发射基因 FAM（6-羧基荧光素，荧光发射峰值在 518nm 处），靠近 3'端标以荧光淬灭基团 TAMRA（6-羧基四甲基若丹明，荧光发射峰值在 582nm 处），探针的 3'开端被磷酸化以防止探针在 PCR 扩增过程中被延伸。当探针保持完整时，淬灭基团抑制发射基团的荧光发射。发射基团一旦与淬灭基团发生分离，抑制作用被解除，518nm 处的光密度增加而被荧光探测系统检测到。复性期探针与模板 DNA 发生杂交，延伸期 Taq 酶随引物延伸沿 DNA 模板移动，当移动到探针切断，淬灭作用被解除，荧光信号释放出来。模板每复制一次，就有一个探针被切断，伴随一个荧光信号的释放。由于被释放的荧光基团数目和 PCR 产物数量是一一对应的关系，因此用该技术可对模板进行准确定量。实验仪器一般使用 PE 公司研制的 ABI7100 型 PCR 扩增仪，也可用其它 PCR 仪。如果用 ABI7700 型反应型反应系统进行实验，反应结束后，通过电脑分析，可直接给出定量结果。如果用其他 PCR 仪，则需要同时使用荧光探测仪测量反应管中的荧光信号，计算出 RQ+、RQ-、 ΔRQ 。RQ+代表样品管荧光发射基团发光强度与淬灭基团发光强度的比率，RQ-代表空白管中二者的比率， ΔRQ

（ $\Delta RQ=RQ+-RQ-$ ）代表 PCR 过程中荧光信号变化量，经过数据处理，即可得出定量结果。由于荧光探针的引入，显著提高了实验的特异性。探针设计一般应符合以下条件：①探针长度应在 20~40 个碱基左右，以保证结合的特异性。②GC 碱基含量在 40%~60%，避免单核苷酸序列的重复。③避免与引物发生杂交或重叠。④探针与模板结合的稳定程度要大于引物与模板结合的稳定程度，因此探针的 Tm 值要比引物的 Tm 值至少高出 5°C。另外，探针的浓度、探针与模板序列的同源性，探针与引物的距离都对实验结果有影响。