

实时荧光定量PCR技术及其在核酸定量检测中的应用

任广睦, 王英元

(山西医科大学法医学院, 山西 太原 030001)

【摘要】实时荧光定量PCR技术近年来被广泛应用于基础医学及分子生物学研究中, 它以其操作简便、高通量检测、特异性强、灵敏度高、准确、全封闭反应等优点成为了分子生物学研究中的重要工具, 本文就该技术的原理、方法、研究进展及其在核酸定量检测中的应用进行了综述, 为医学实践提供新的研究思路和核酸定量检测方法。

【关键词】法医物证学; 实时荧光定量PCR; 核酸定量

Real-Time Quantitative PCR Technique and Application of nucleic acid Quantitative detection/(REN Guang-mu, WANG Ying-yuan./School of medicine Shanxi Medical University, Shanxi Taiyuan 030001, China)

【Abstract】The fluorescence-based real-time PCR technique is widely used for basic research, molecular medicine and biotechnology. It is a critical assays are easy to perform, capable of high throughput, and can combine high sensitivity with reliable specificity. In this review, principle, methods and advancement of real-time PCR technique and application of nucleic acid quantitative detection are discussed, which may provide a new research idea and nucleic acid quantitative detection method for forensic medicine practice.

【Key words】Forensic physical evidence; Fluorescence-based real-time quantitative PCR; nucleic acid quantitation

聚合酶链式反应技术(PCR)自1985年问世以来, 以其灵敏性、特异性和快速性在医学和分子生物学等领域得到广泛的应用。近年来出现的核酸定量PCR技术尤其是实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RQ-PCR)技术^[1]实现了PCR从定性到定量的飞跃。以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点成为了分子生物学研究中的重要工具, 本文就此技术的研究进展及其在核酸定量检测中的应用做一综述。

1 实时荧光定量PCR技术的原理及方法

实时荧光定量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, 最后通过标准曲线模板进行定量分析的方法^[2-5]。

它在常规PCR基础上添加了荧光染料或荧光探针。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。荧光探针法是将荧光共振能量传递(fluorescence resonance energy transfer, 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'端标记一个淬灭基团(Q), 两者可形成能量传递结构, 即5'端荧光基团所发出的荧光可被淬灭基团吸收或抑制; 当两者距离较远时, 抑制作用消失, 报告基团荧光信号发出。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。当信号达到某一阈值(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1.96倍)时, Ct值被记录下来。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。模板的Ct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, Ct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Ct值。这样, 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。

在这一技术的发展过程中，两个重要的发现起着关键的作用：（1）在90年代早期，Taq DNA多聚酶的5'核酸外切酶活性的发现使得它能降解特异性荧光标记探针^[6]，因此使得间接的检测PCR产物成为可能。（2）此后荧光双标记探针的运用使得在一个密闭的体系中实时地监测反应全过程成为可能。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荧光定量PCR技术在研究工作中广泛运用。

1996年，美国应用生物系统公司（Applied Biosystems, ABI）的ABI Prism 7700和5700、罗氏公司（Roche）的Light CyclerTM率先投入商业使用。它们的扩增和检测全部自动化、耗时短、工作效率高。国内使用较多的有ABI Prism7000、7900、7700型Light CyclerTM等。ABI Prism 7900等RQ-PCR仪可用于高通量（384孔板）检测^[7]，而ABI Prism 7000则利用了多色多通道技术。

2 实时荧光定量PCR技术的研究进展

目前最常用的实时荧光定量PCR产物的检测技术都是应用荧光染料或基团,并将PCR与实时信号检测相结合,其中最简单的是SYBR Green I染料法。SYBR Green I染料能与所有的DNA双链相结合,对DNA模板没有选择性,所以特异性较差。如TaqMan探针法^[8,9]。要想用荧光染料法得到比较好的定量结果,对PCR引物设计的特异性和PCR反应的质量要求就比较高。而TaqMan探针法则是高度特异的定量PCR技术,其核心是利用Taq酶的3'→5'外切核酸酶活性,切断探针,产生荧光信号。由于探针与模板特异性结合,所以荧光信号的强弱就代表了模板的数量^[10,11]。随着研究的深入及试剂的商品化,又发展出一些更完善的检测技术。

2.1 TaqMan MGB水解探针技术

在TaqMan探针法的定量PCR反应体系中,包括一对PCR引物和一条探针。探针只与模板特异性地结合,其结合位点在两条链之间。TaqMan探针根据其3'端标记的荧光淬灭基团的不同分为两种:普通的TaqMan探针和TaqMan MGB探针。MGB探针的淬灭基团是非荧光淬灭基团(Non-Fluorescent Quencher),本身不产生荧光,可以大大降低本底信号的强度。同时探针上还连接有MGB(Minor Groove Binder)修饰基团,可以将探针的T_m值提高10°C左右。因此为了获得同样的T_m值,MGB探针可以比普通TaqMan探针设计得更短,既降低了合成成本,也使得探针设计的成功率大为提高。因为在模板的DNA碱基组成不理想的情况下,短的探针比长的探针更易设计。研究表明,TaqMan MGB探针对于富含A/T的模板可以区分得更为理想^[12]。

2.2 分子灯标 (Molecular beacon)

分子灯标由Tyagi和Krammert^[13]建立。该探针为单链DNA,呈茎环结构,环部与靶DNA序列互补,为15~35bp;茎部核苷酸序列与靶DNA无序列同源性,约8bp。分别在探针的5'端和3'端标记报告荧光基团和淬灭荧光基团。游离时,分子灯标由于报告荧光基团和另一端淬灭基团紧密相邻,发出的荧光被淬灭;在PCR变性后复性阶段,探针的环部核苷酸序列与互补的靶序列形成更稳定的杂交,破坏了茎环结构产生的FRET,淬灭作用被解除;在PCR延伸阶段,分子灯标又从模板上解离,重新形成茎环结构,荧光消失^[14,15]。随着每次扩增产物的积累,荧光强度增加,可反映出每次扩增末扩增产物积累的量。该法探针可循环利用。分子灯标设计较复杂,要求游离在溶液中时无选择性折叠,以免造成部分淬灭和荧光本底;同样,如果茎结构的热力学温度过高,则会影响靶序列杂交。分子灯标尤其适合于鉴定点突变。它们能区别仅单个核苷酸差异的DNA,并且特异性要比常规等长的寡聚核苷酸

明显^[15,16]。主要用于突变检测、病原体定量、病毒复制和胎儿的性别检测。

发卡式引物 (sunrise primer) 是对分子灯标的发展^[17,18], 在延伸时整合进它们的特异扩增子, 产生荧光信号。其特异性仅依赖于引物序列。此法能将所有扩增产物均标记上荧光分子, 因此荧光信号响应快。但无法区分特异和非特异扩增是其最大不足。

蝎状引物 (scorpion primer) 是对发卡式引物的进一步改进^[19]。该技术在引物与分子灯标探针之间连接一个间隔臂, 使PCR延伸时不能够延伸至分子灯标。这样, 非特异扩增产物便无荧光信号; 当有特异扩增产物时, 即可与分子灯标进行杂交, 产生荧光信号。既解决了非特异问题, 又保留了响应快的特点。但仍存在杂交时探针不能完全与模板匹配, 且探针合成复杂等问题。已有研究在热循环仪上, 尤其是在快速循环条件下蝎状引物要好于TaqMan探针或分子灯标^[20]。

Kuhn等^[21]利用基于肽核酸的分子灯标 (PNA-based MB), 使目标双链DNA不须变性便能与灯标结合, 克服了常规分子灯标需要在目标核酸变性条件下才能与灯标结合的不足。

2.3 双杂交探针^[22,23]

此系统中用了四种寡聚核苷酸、两种引物和两种探针。两个探针各有一个标记, 以头尾相接的方式与靶扩增子退火。一个探针的3'端供体分子被循环仪的光源激发后, 产生从供体到毗邻探针 (相差1~5核苷酸) 5'端受体基团的FRET。由于只有当两个探针与模板结合时才产生荧光, 因而特异性高, 但影响扩增效率。另外, 需合成两个探针, 也提高了成本。

3 实时荧光定量PCR技术在核酸定量检测中的应用

3.1 病毒感染的定量监测

实时荧光定量PCR技术的出现使研究病毒的负荷和疾病进展的关系成为可能, 它不仅能对病毒定性, 而且由于其实验的批间差异小, 重复性好, 因此能方便、快速、灵敏、准确地定量病毒DNA或RNA的序列, 更重要的是从中可以动态地研究在整个病程中病毒的复活或持续, 从而使临床医生和病毒学家能检测临床的变化, 如抗病毒治疗的效果, 耐药变异的出现等。目前运用较多的是乙肝病毒(HBV-DNA)、HIV-DNA的定量监测^[24,25]。

3.2 细胞因子mRNA的表达分析

细胞因子是调节蛋白, 它通过调节免疫反应在免疫系统中起着核心作用。许多不同类型的细胞都能分泌这种低分子量的蛋白质, 其中包括淋巴细胞、抗原递呈细胞、单核细胞、内皮细胞和成纤维细胞。为了阐明在许多炎症反应、自身免疫性疾病和器官移植排斥反应中的免疫致病途径, 细胞因子mRNA表达谱的可靠定量是很重要的。尽管被检样本中细胞因子含量往往极低, 然而实时荧光定量RT-PCR的高敏感性和准确性在细胞因子的定量中越来越受到青睐^[26-28]。

3.3 基因突变及多态性研究

扩增DNA的核苷酸序列不需要分子克隆、宿主细胞内的生长准备, 即可在媒介中的生物分子纯化过程中直接测得, 因此实时荧光定量PCR可用于检测特异突变基因。利用实时荧光定量PCR和有关的间接测序方法, 可对已知DNA序列进行基因突变及多态性的

如对已知DNA序列进行位置突变基因及序列多态性的定位, 扩增DNA限制性位点检测遗传变异等[29-34]。

3.4 法医学应用

该技术目前法医学应用较少, 主要有: 采用实时荧光定量RT-PCR技术定量检测组织中相关损伤因子mRNA的变化来进行推断的推断[35]; 通过观察长期放置的血涂片RNA的降解规律来推断血涂片的储藏时间并探讨用于法医学时间的可能性[36]; 定量检测同组织中基因mRNA的降解规律来研究其用于死亡时间推断的可能, 并提供了研究的新思路[37]。

4 实时荧光定量PCR存在的问题及应用前景

在实时荧光定量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问题有待解决。在标准曲线定量中, 标准品是一个必不可少的过程。目前由于无统一标准, 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。此实时荧光定量RT-PCR来研究mRNA时, 受到不同RNA样本存在不同的逆转录(RT)效率的限制。在相对定量中, 其前提是假设控制物不受实验条件的影响的, 合理地选择合适的内源控制物也是实验结果可靠与否的关键。另外, 与传统的PCR技术相比, 实时荧光定量PCR的不足之处是: (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量; (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荧光定量PCR的复合式(multiplex)检测的应用; (3) 目前实时荧光定量PCR实验成本比较高, 从而也限制了其广泛的应用[38]。

目前实时荧光定量PCR已成为科研的主要工具, 该技术未来的应用前景是令人鼓舞的, 一方面实时荧光定量PCR技术与其它生物学技术相结合使定量极微量的基因表达或DNA拷贝数成为可能; 另一方面荧光标记核酸化学技术和寡核苷酸探针杂交技术的应用, 使实时荧光定量PCR技术有一个足够的基础为广大临床诊断实验室及法医学实验室所接受, 其应用前景将越来越广阔。

【参考文献】

- [1] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. *Biotechnology*, 1993, 11: 102-106.
- [2] 韩俊英, 曾瑞萍. 荧光定量PCR技术及其应用[J]. *国外医学·遗传学分册*, 2000, 23(3): 177.
- [3] Wall SJ, Edward DR. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR): A comparison of primer-dropper, competitive, and real-time PCR methods[J]. *Anal Biochem*, 2002, 300(2): 269-273.
- [4] Schmittgen TD. Real-time quantitative PCR[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 383-385.
- [5] Willard MF, Stephen JW, Kent EV. Quantitative RT-PCR: pitfall and potential[J]. *Bio Techniques*, 1999, 26(1): 112-125.
- [6] Holland P M, Abramson R D, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Taq* DNA polymerase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7276-7280.
- [7] 美国应用生物系统中国公司. ABI Prism 7900HT型荧光定量PCR仪操作手册[M]. 北京, 2003.
- [8] Yin JL, Shackel NA, Zekry A, et al. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor expression with fluorogenic probes or SYBR Green I[J]. *Immunol Cell Biol*, 2001, 79: 213.
- [9] Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of end-point and real-time methods[J]. *Anal Biochem*, 2000, 285: 194.
- [10] Gibson U, Heid C, Williams P. A novel method for real time quantitative RT-PCR[J]. *Genome Res*, 1996, 6: 995.
- [11] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR[J]. *Genome Res*, 1996, 6: 986.
- [12] Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 655.
- [13] Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization[J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 303.
- [14] Tyagi S, Bratu D P, Kramer FR, et al. Multicolor molecular beacons for allele discrimination[J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 49-53.

- [15] Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A, et al. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 6171-6176.
- [16] Kaboev OK, Luchkina L A, Tretiakov A N, et al. PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons(hairpin-like structure)[J]. Acids Res, 2000, 28 : 94.
- [17] Nazarenko I, Bhatnagar S, Hohman R. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28:2516-2521.
- [18] Winn-deen ES, Direct fluorescence Detection of Allele Specific PCR Products Using Novel Energy-Transfer Labeled Primers [J]. Mol Diagn, 1998, 2:217-221.
- [19] Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17:804-807.
- [20] Thelwell N, Millington S, Solinas A, et al. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation Detection[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28:3752-3761.
- [21] Kuhn H, Demidov VV, Gildea BD, et al. PNA beacons for duplex DNA[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2001, 11(4): 265-270.
- [22] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification[J]. Biotechniques, 1997, 22:133-138.
- [23] Brechtbuehl K, Whalley SA, Dusheiko GM, et al. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus[J]. J Virol Methods, 1999, 93(1-2): 105-113.
- [24] 杨柳, 苏明权, 岳乔红, 等. 荧光定量PCR在HBV-DNA定量检测中的应用[J].中华综合临床医学杂志, 2004, 6 (11) : 25-27.
- [25] Desire N, Dehee A, Schneider V, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39:1303.
- [26] Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. Comparison between Taq DNA polymerase and its Stoffel fragment for quantitative real-time PCR with hybridization probe[J]. Biotechniques, 2001, 30:1052.
- [27] Rozzo SJ, Allard JD, Choubey D, et al. Evidence for an interferon-inducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus[28]. Immunity, 2001, 15:15-24.
- [28] Elson D, Thurston G, Huang E, et al. Quiescent angiogenesis in transgenic mice expressing constitutively active hypoxia-inducible factor-1a[J]. Development, 2001, 128:2520.
- [29] Nigro JM, Takahashi MA, Ginzinger DG, et al. Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative PCR assay[J]. Am J Pathol, 2001, 157:1253.
- [30] Ginzinger DG, Godfrey TE, Nigro J, et al. Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28:5405.
- [31] Oliver DH, Thompson RE, Griffin CA, Eshleman JR. Use of single nucleotide polymorphisms (SNP) and real-time polymerase chain reaction for bone marrow engraftment analysis[J]. J Mol Diagn, 2000, 2:202.
- [32] Walburger DK, Afonina IA, Wydro R. An improved real time PCR method for simultaneous detection of C282Y and H63D mutations in the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis[J]. Mutat Res, 2001, 432:69.
- [33] Al-Taher A, Bashein A, Nolan T, et al. Global cDNA amplification combined with real-time RT-PCR: accurate quantification of multiple human p-glycoprotein channel genes at the single cell level[J]. Yeast, 2000, 17:201.
- [34] Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M. A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA[J]. J Virol Methods, 2001, 92:183.
- [35] Masataka T, Kiyoshi S R K, Nori N, et al. Studies on mRNA expression of tissue-type plasminogen activator in bruises for wound age estimation[J]. Int J Leg Med, 2005, 119: 16-21.
- [36] Stacey A, Brandi H, Gerald R, et al. A method for determining the age of a bloodstain[J]. Forensic Science International, 2005, 148 :37-45.
- [37] Martin B, Ira G, Silke P, et al. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval-a pilot study[J]. Legal Medicine, 2003, 7:227.
- [38] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. Molecular Endocrinology, 2000, 14:101-104.

作者简介：任广睦（1975~ ），男，辽宁丹东人，在读博士，主要从事猝死病理学及死亡时间的推断研究。联系电话：0351-8160482（办），0351-8160482（小灵通）通讯地址：山西医科大学法医学院（邮编030001）E-mail地址：renguangmu@163.com