

PCR技术

北京天坛医院

国家神经系统疾病临床医学研究中心

李昊文

PCR技术发展历程



1953



1976



1985



1989

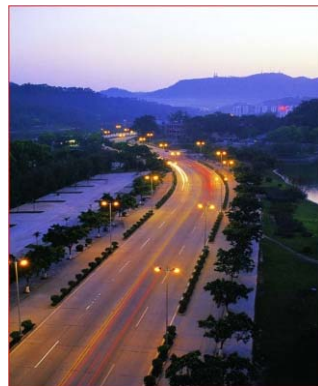


1996

1971



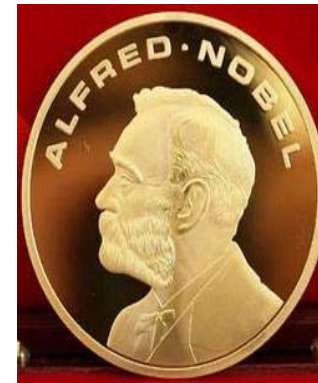
1983



1988



1993

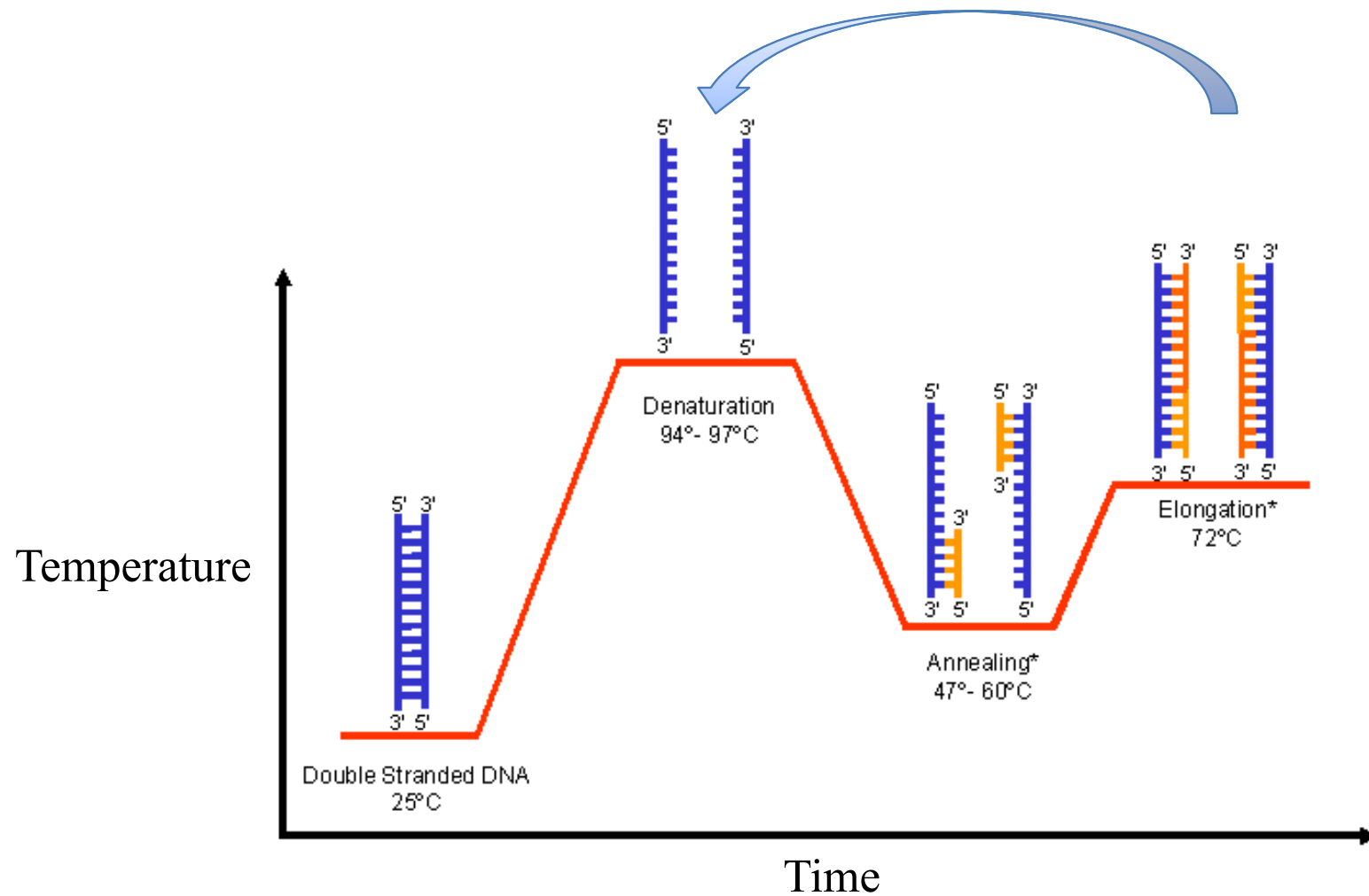


2006

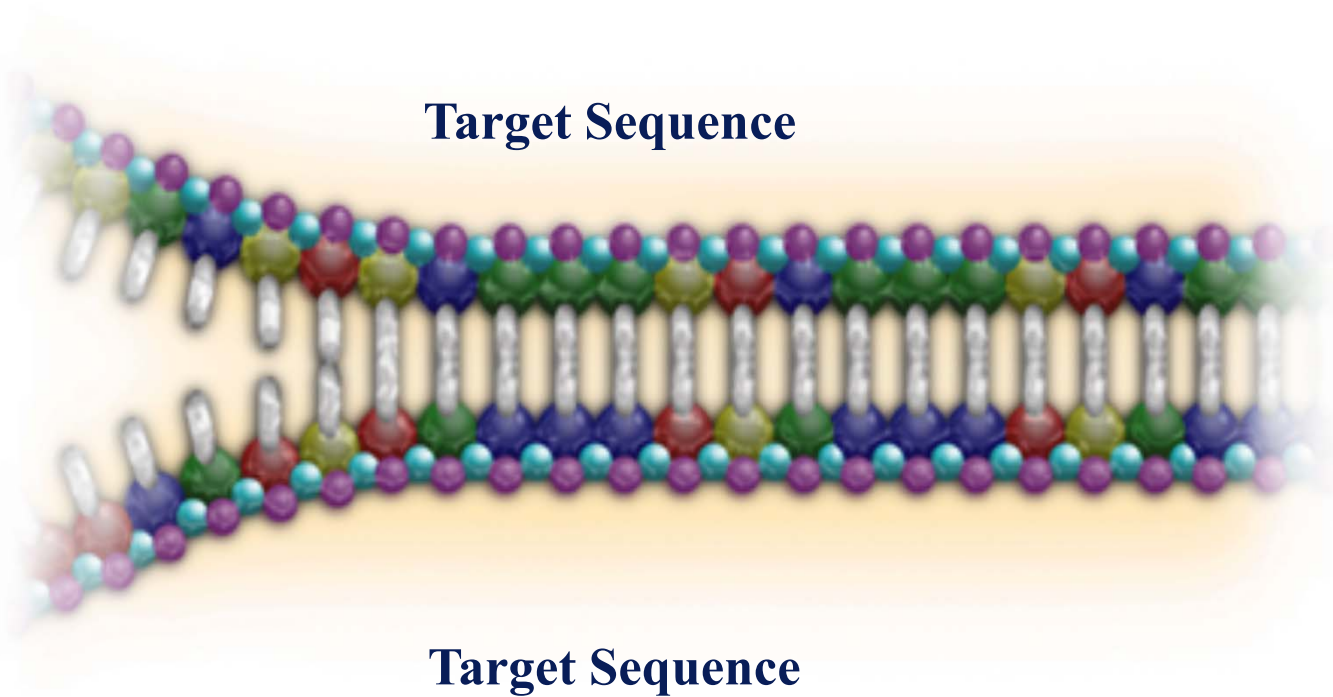


Polymerase Chain Reaction (PCR)

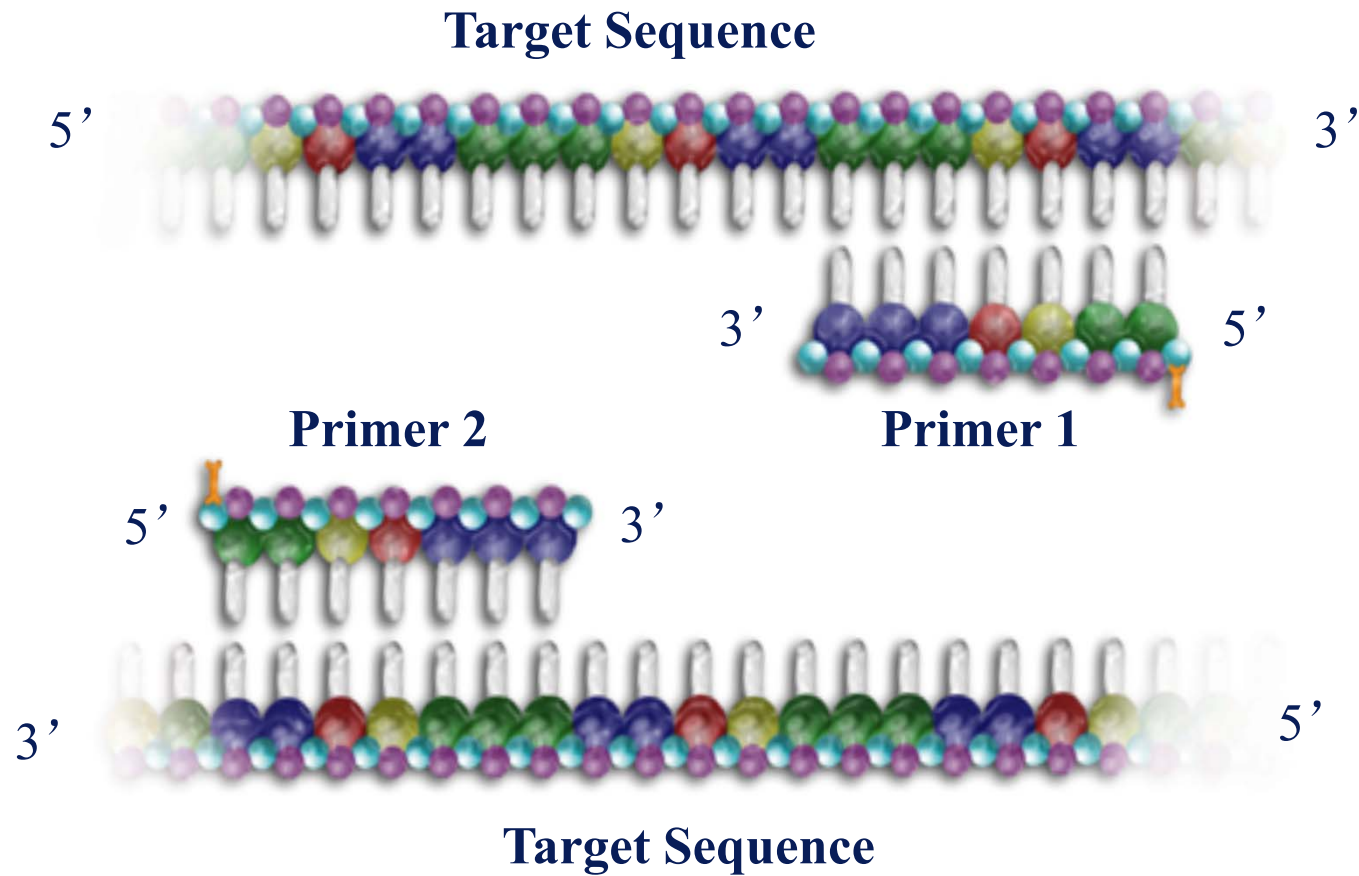
- 目的DNA片段的体外复制。



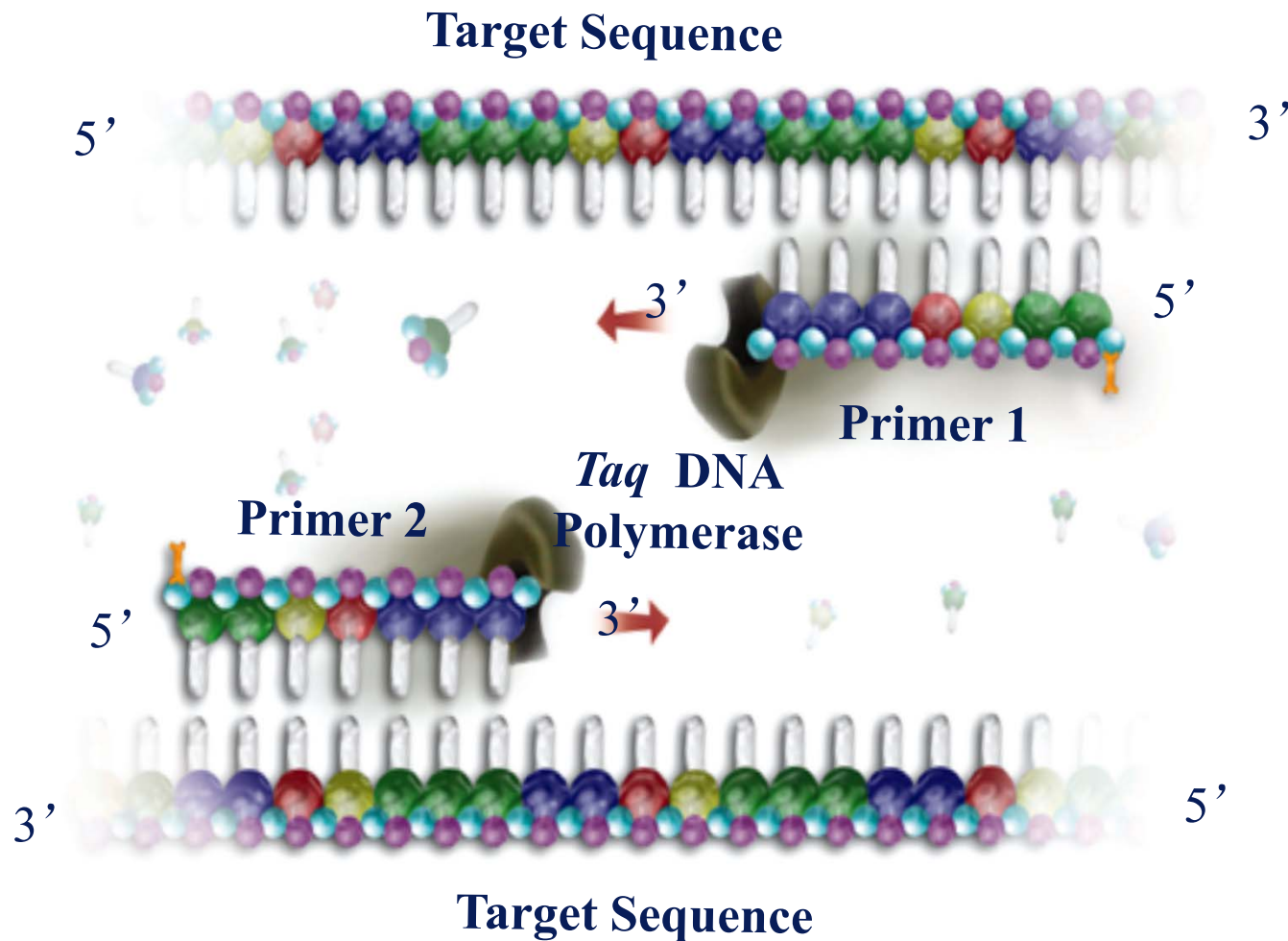
PCR Cycle (Step 1) Denaturation



PCR Cycle (Step 2) Annealing



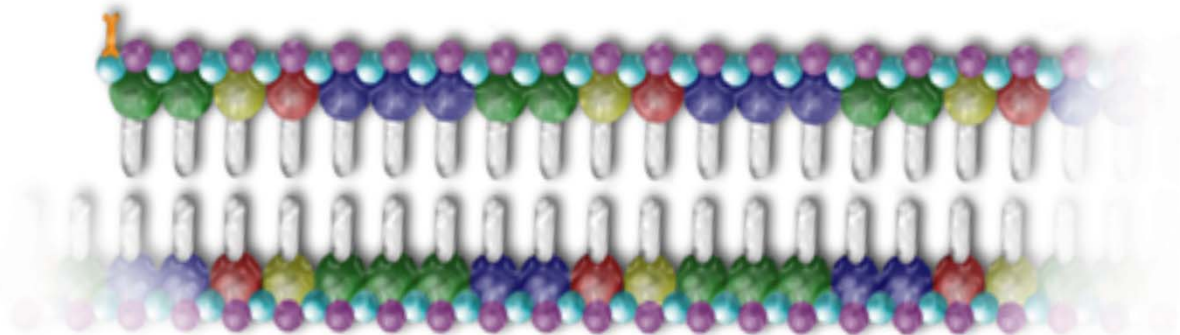
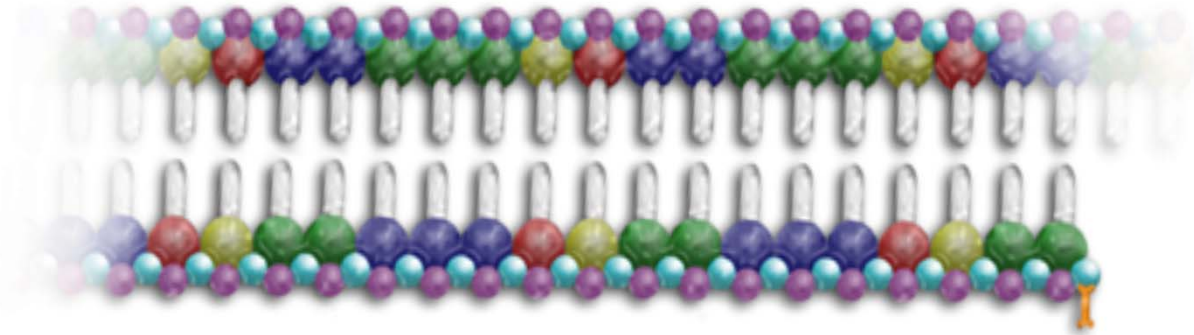
PCR Cycle (Step 3) Extension



End of the 1st PCR Cycle

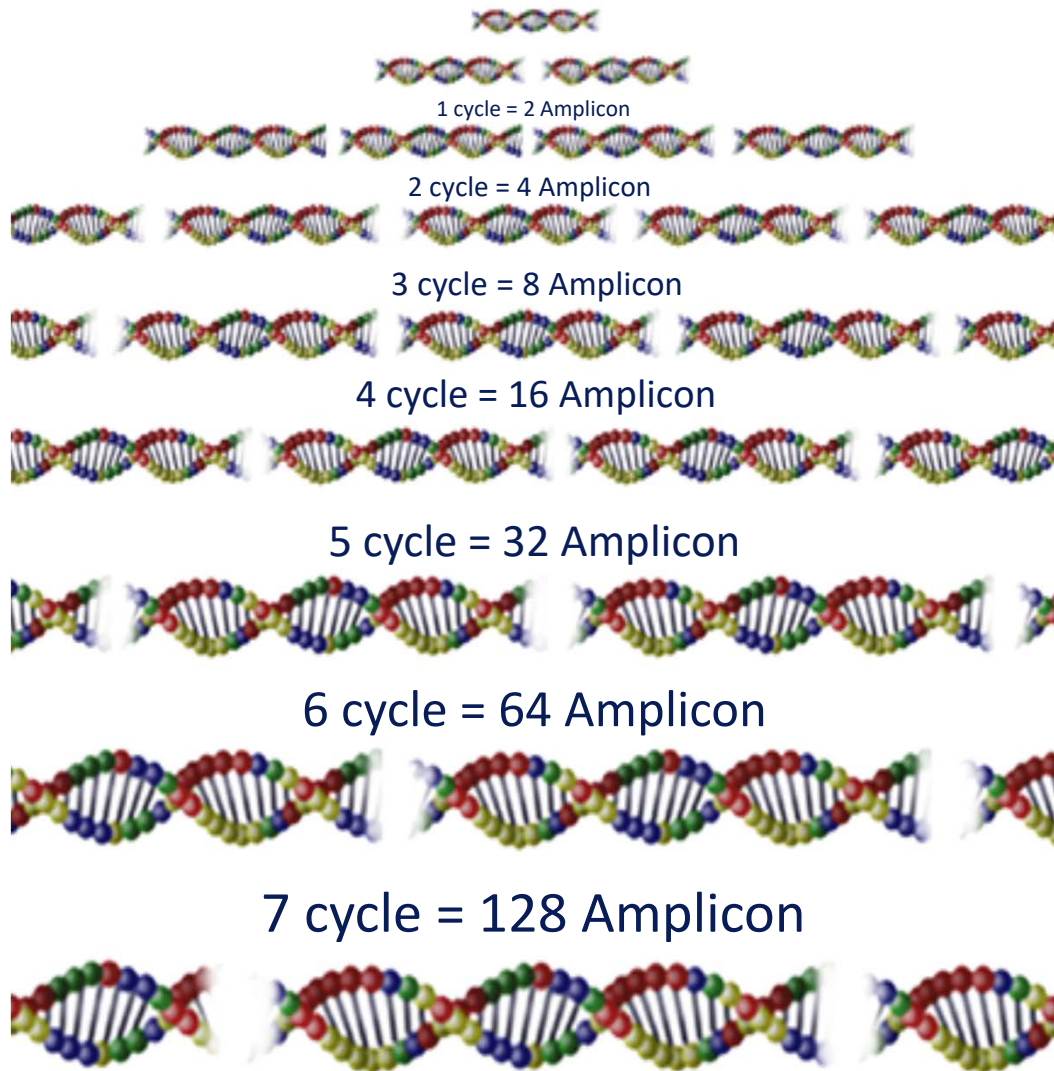
Two copies of target sequence

Target Sequence



Target Sequence

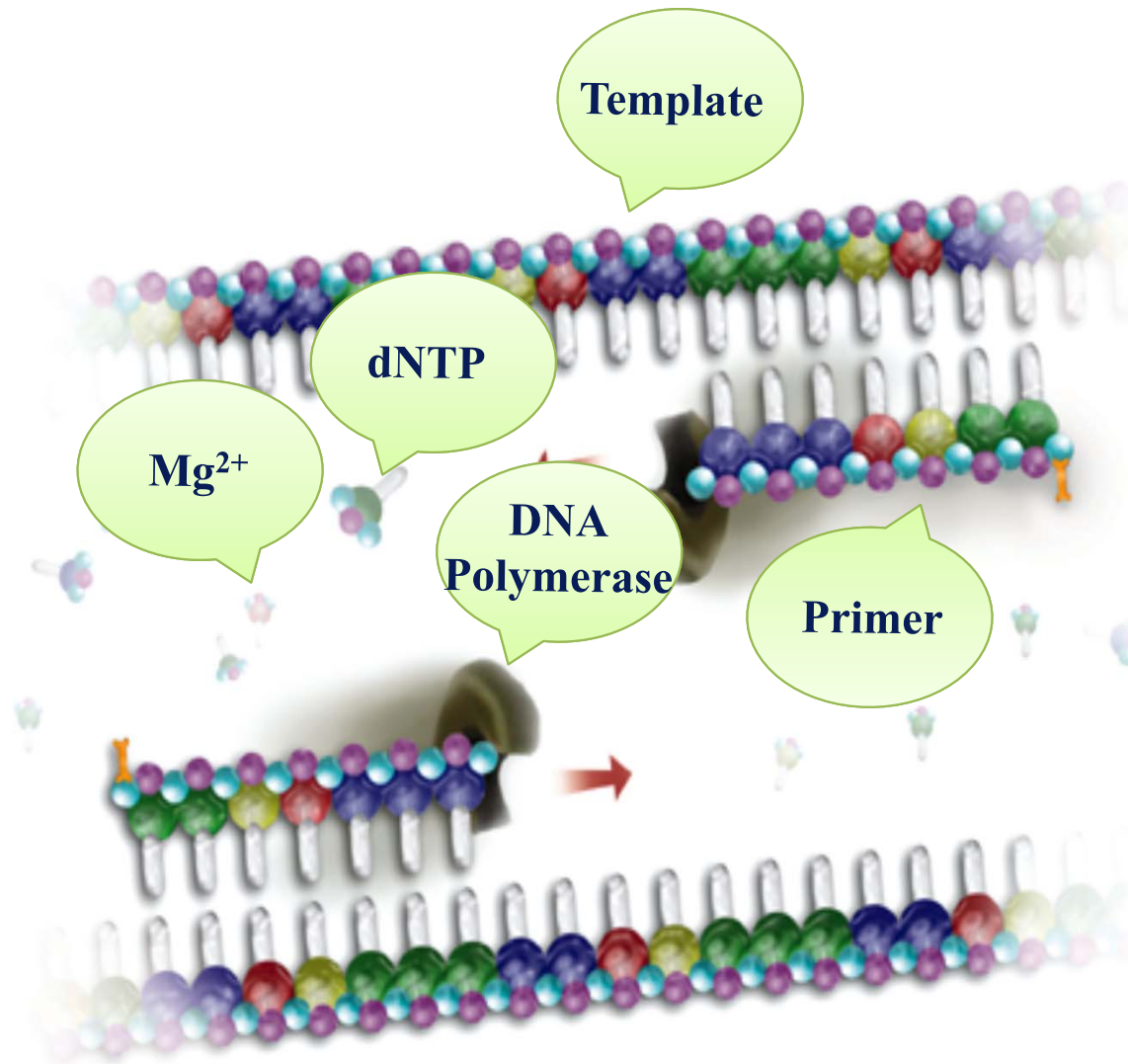
Target Amplification



Cycles	Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
10	1,024
20	1,048,576
30	1,073,741,824
40	1,099,511,600,000



PCR反应体系 (PCR反应五要素)



1. 引物

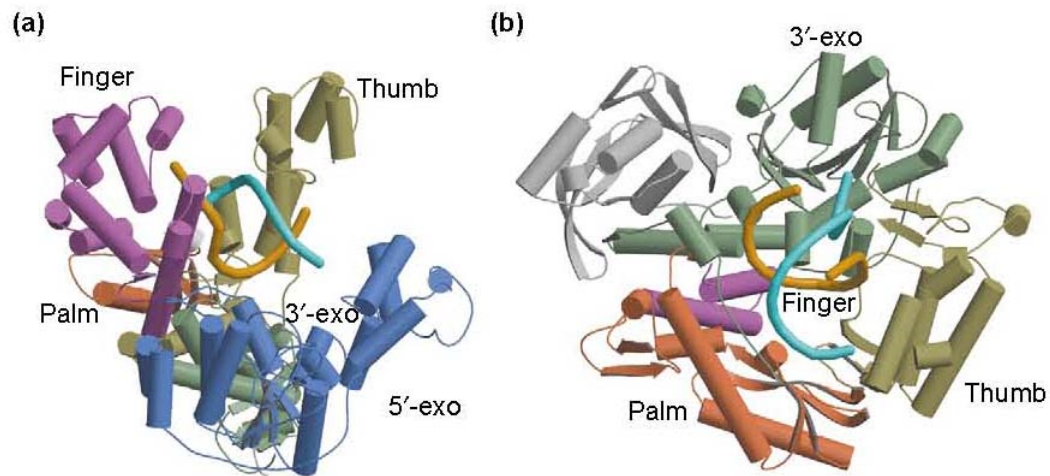
- 引物：决定PCR反应的特异性
- T_m值(熔解温度)，指DNA双螺旋结构降解一半时的温度。核酸的吸光值达到其260nm吸光值两倍时的温度。
- 长度为25mer以下的引物， $T_m = 4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T})$

引物设计的原则

1. 序列应位于高度保守区，与非扩增区无同源序列
2. 长度18-24个核苷酸
3. G+C含量在40 - 60%之间，上下游引物之间 T_m 差异小于 2°C
4. 四种碱基随机分布
5. 引物自身不应存在互补序列，以防形成发夹结构
6. 引物之间不应存在互补序列，以防形成二聚体
7. 引物3'端的末位碱基对Taq酶的合成效率有较大的影响
8. 5'端序列对PCR影响不太大，因此常用来引进修饰位点或标记物

2. DNA聚合酶

- *Taq* (Thermusaquaticus) DNA聚合酶
- 热启动酶
- *Pfu* DNA聚合酶
- 复合酶
- 基因工程改造酶



3. dNTP

- 浓度过低会降低PCR产物的产量
- 高浓度dNTP可与 Mg^{2+} 结合，使游离的 Mg^{2+} 浓度下降，影响DNA聚合酶的活性
- 影响产量、特异性、保真性

4. 模板DNA

模板DNA的浓度：0.1-2ug/100ul体系

- PCR产量随模板DNA浓度的增加而显著升高
- 模板浓度过高导致产生弥散产物或非特异性扩增产物
- 模板中抑制物或杂质较多：降低模板用量或稀释模板

5. 反应缓冲液

➤ pH值

提供酶的最佳工作环境

pH升高，扩增量提升，突变率上升

pH降低，扩增量下降，保真性提升

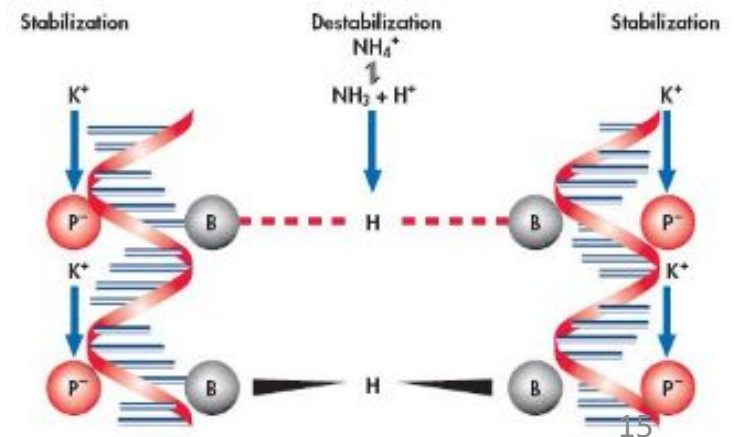
➤ 关键组分： Mg^{2+}

酶工作所必需的离子

Mg^{2+} 升高：提升扩增量，产生非特异性扩增

Mg^{2+} 降低：降低扩增量，特异性增强

➤ 其它离子： KCl ， $(NH_4)_2SO_4$ 等 中和DNA所带电荷



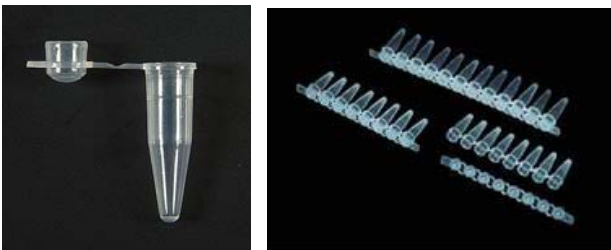
标准PCR实验流程-反应体系配制

- DNA 模板
- 上游引物 (FW primer) 0.1-0.5uM
- 下游引物 (RV primer) 0.1-0.5uM
- 底物 dNTPs 250uM
- DNA 聚合酶 0.5-2.5 units
- 缓冲液 (Tris-HCl, KCl)
- MgCl_2 或 MgSO_4 1.5-2.0 mM

标准PCR实验流程-热循环

预变性	94°C	5min	
变性	94°C	30s	} 25-35 Cycles
退火	55°C	30s	
延伸	72°C	30s	
再延伸	72°C	5-10min	

目的片段: 500bp



循环参数

1. 变性

使双链DNA解链为单链

94-95°C 20-30s

2. 退火

退火温度= T_m 值-5°C

$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ 引物长度 $\leq 20nt$

增加温度能减少引物与模板的非特异性结合

降低温度可增加反应的灵敏性

3. 延伸

延伸时间由扩增片段长度决定

Taq DNA Polymerase: 1 kb/min

4. 循环数

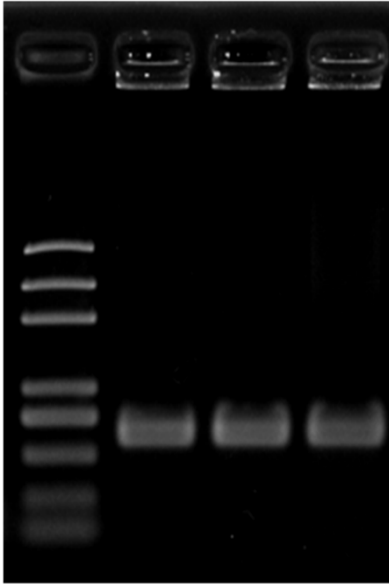
主要取决于模板DNA的浓度

一般为25-35次

循环数过多：扩增效率降低，错误掺入率增加

标准PCR实验流程-产物检测

琼脂糖凝胶电泳



什么是成功的PCR?

- Specificity 特异性
- Yield 灵敏性 (产量)
- Fidelity 保真性
- Product length 产物长度

Annealing temperature

extension time

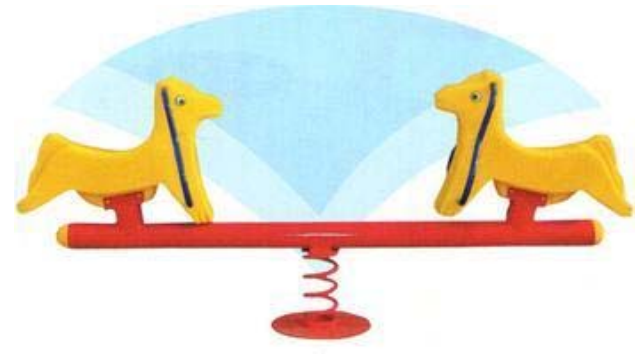
Cycle number

Nature of DNA sequence

Type of DNA polymerase

Reaction conditions (pH, dNTPs and Mg^{2+})

Initial number of template



PCR技术应用

- 生命科学研究
 - 基因克隆, DNA测序, 分析突变
- 疾病诊断
 - 细菌、病毒、寄生虫检测
 - 各种肿瘤检测
- 遗传工程
 - 遗传图谱构建, DNA测序, 表达图谱
- 法医学
 - 犯罪现场标本分析
- 其他

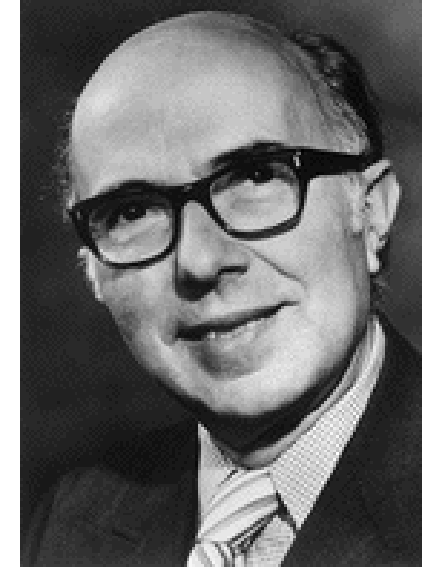
1975年诺贝尔生理和医学奖



David Baltimore



Howard Martin Temin



Renato Dulbecco

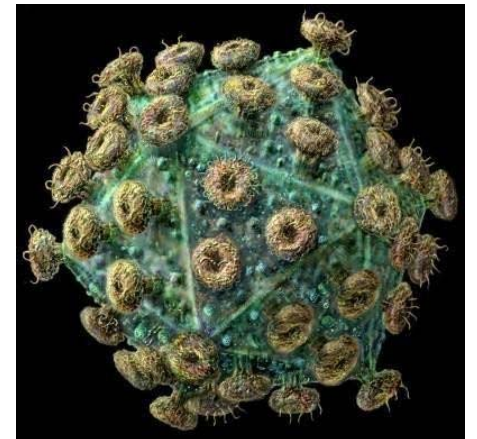


RT-PCR

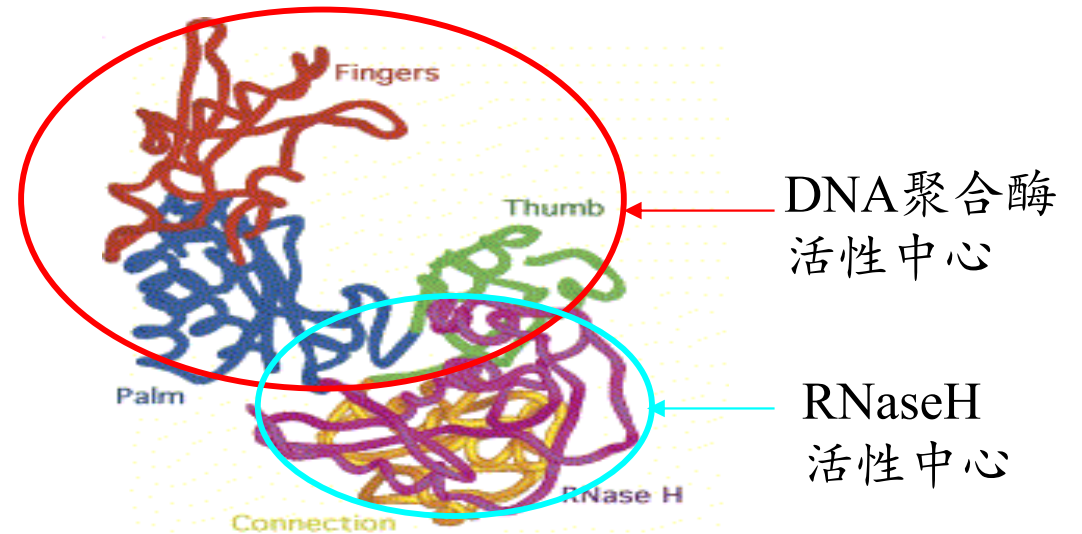
逆转录酶以 mRNA 为模板合成第 1 条 cDNA 链，
然后通过 PCR 反应扩增出许多 cDNA 分子拷贝。

RT-PCR 是扩增 mRNA 的快速及灵敏的方法。

1. 检测某一基因在转录水平的表达
2. 克隆特异的 cDNA

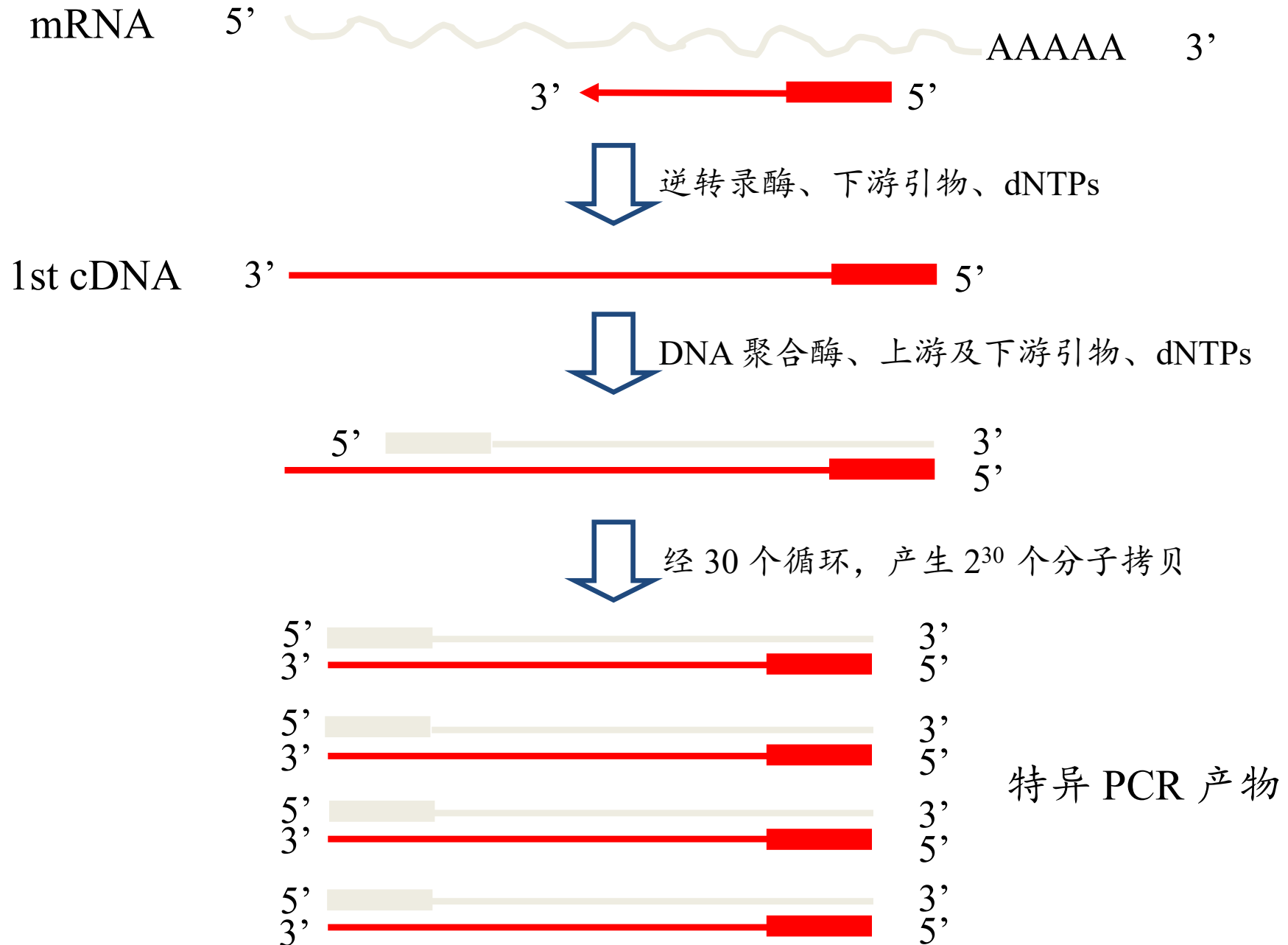


逆转录酶

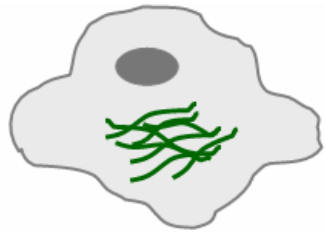


	AMV RT	MMLV RT
RNase H活性	强，合成长度短	弱，合成长度长
合成量	低	高
热稳定性 反应温度	好 42~55°C	差 37~42°C

RT-PCR原理



RT-PCR实验流程



组织或培养细胞



总RNA提取



DNase去除DNA污染



Reverse transcriptase
催化1st cDNA合成



DNA polymerase
催化PCR扩增

下游引物

- 特异性引物
- Oligo(dT)

一步法 RT-PCR

RT 反应与 PCR 反应在同一个试管中进行。

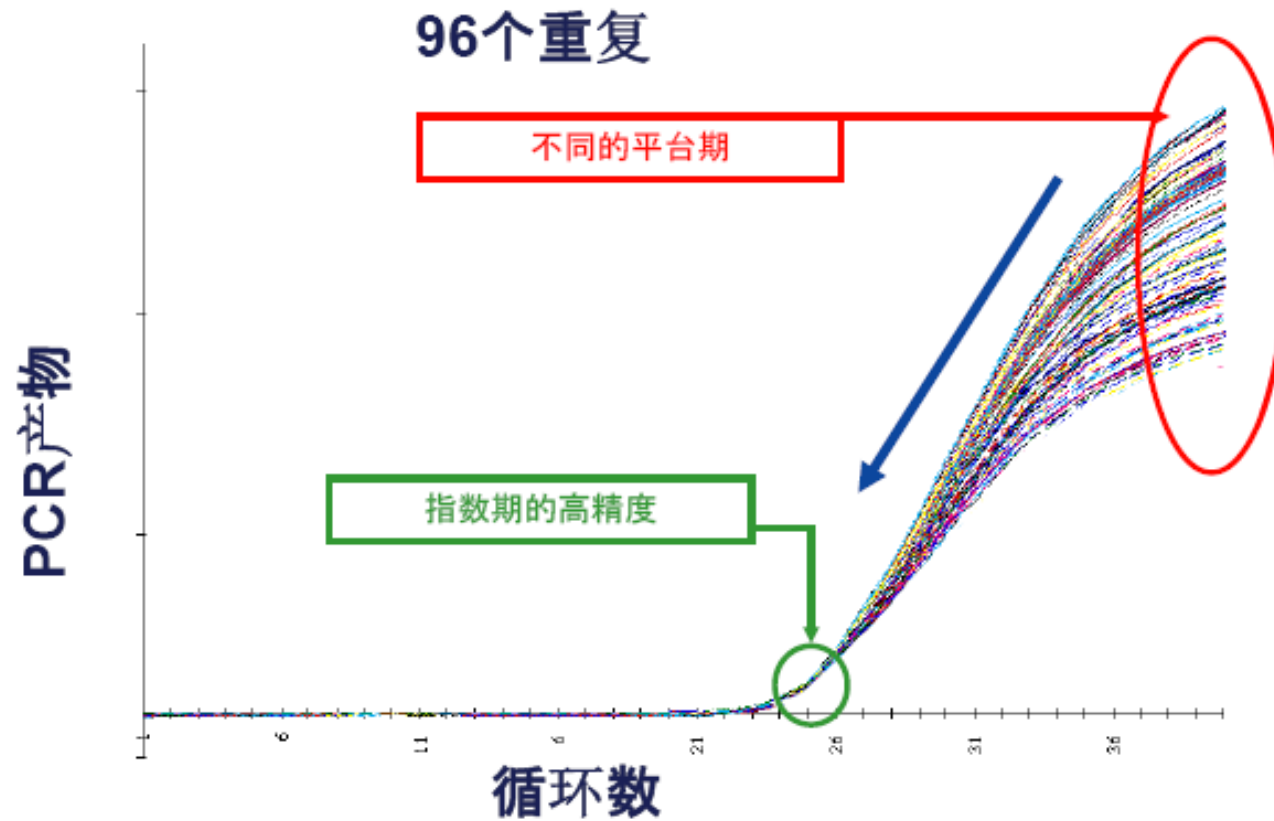
两步法 RT-PCR

RT 反应与 PCR 反应在不同的试管中进行。

Real-time PCR



Why using Real-time PCR ?



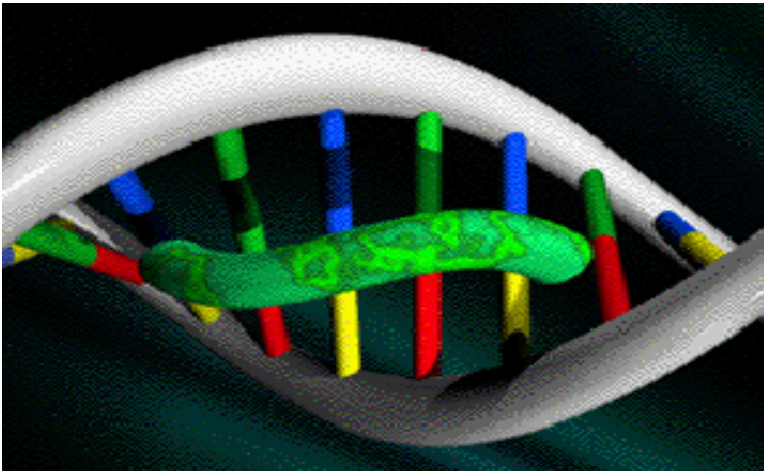
Real-time PCR原理

在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号的变化实时监测反应过程中扩增产物的变化，通过Ct值和标准曲线的分析对起始模板进行定量。

- 绝对定量
- 相对定量



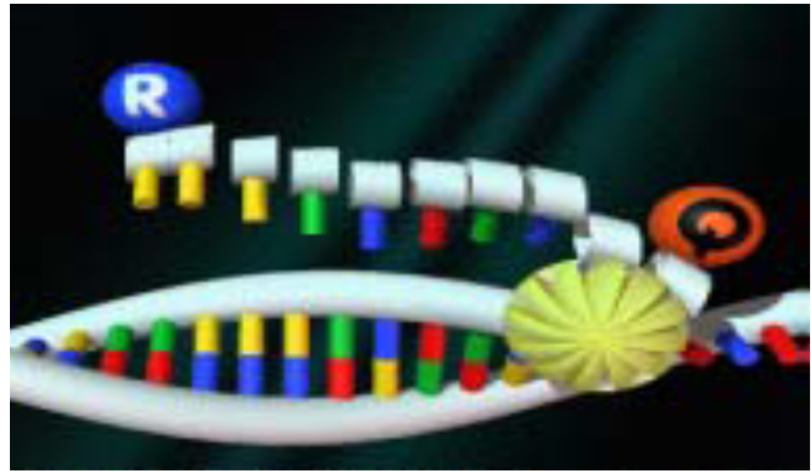
Real-time PCR的主要方法



SYBR Green I

简单

成本低

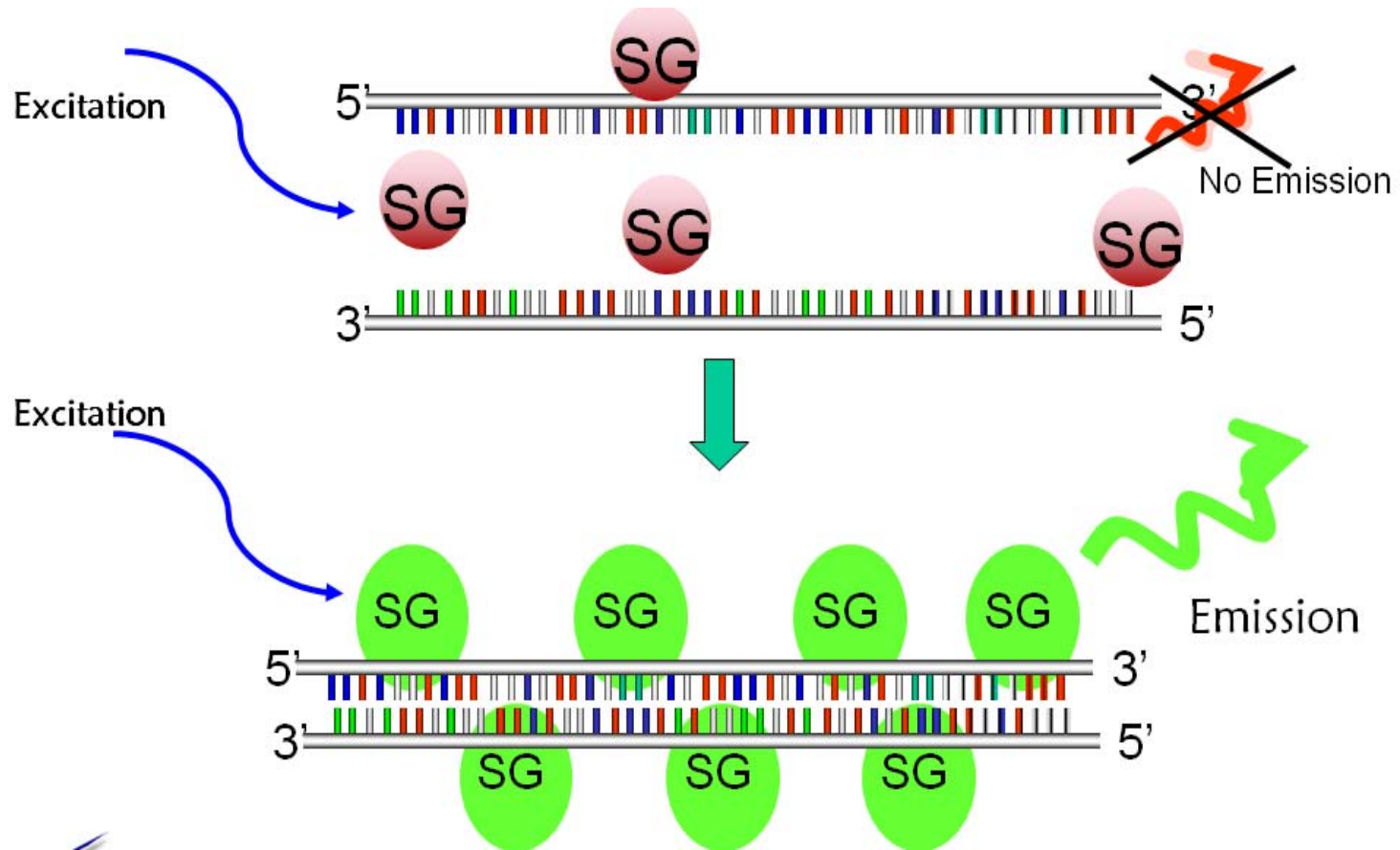


TaqMan探针

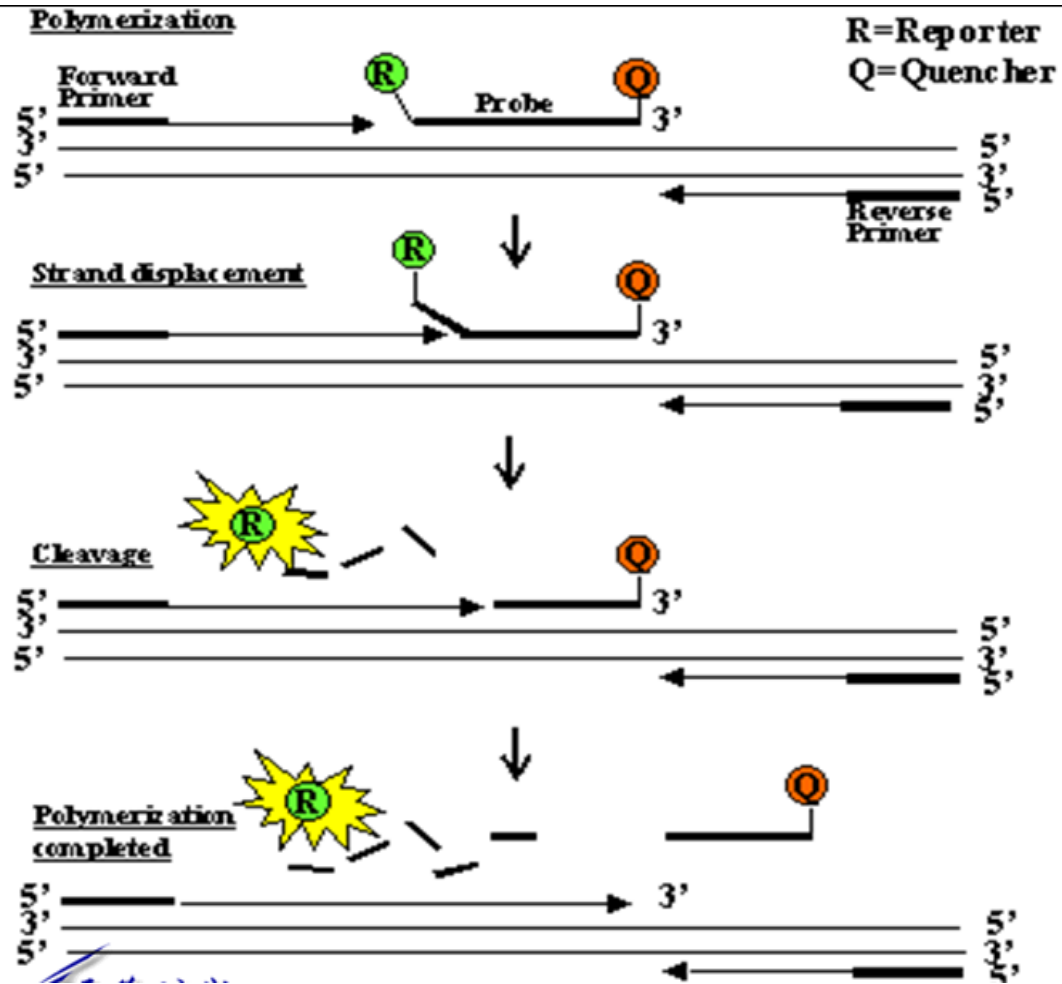
适用于多重PCR

特异性较好

SYBR Green法



TaqMan探针法



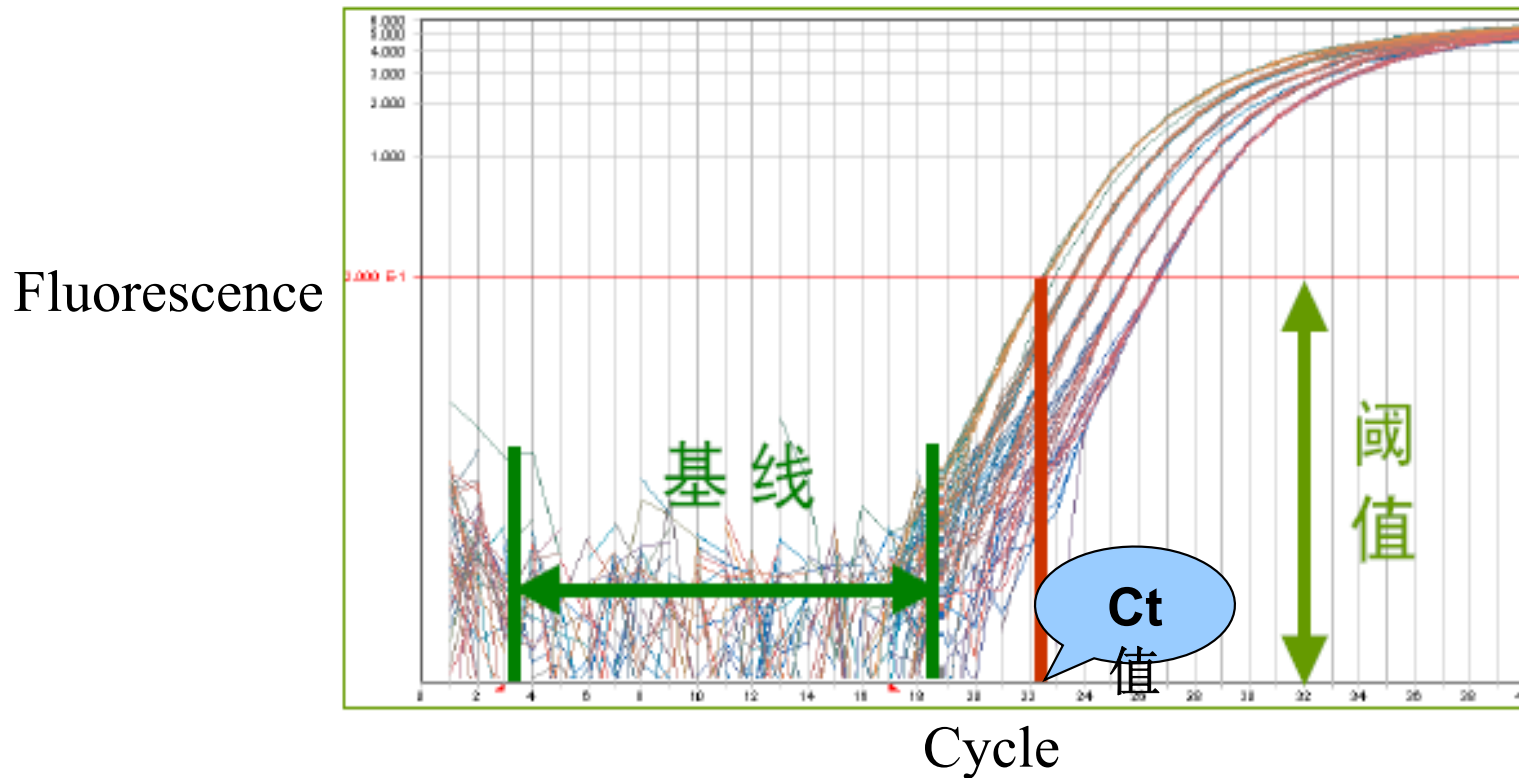
每扩增一条DNA分子，释放一个荧光信号，可以在循环过程中任一点检测荧光

Real-time PCR 参数

- 扩增曲线
- 熔解曲线
- 标准曲线（扩增效率）
- NTC（No Template Control）
- NRT（No RT Control）

扩增曲线

- 基线 (Baseline): 采用前15个循环信号作为荧光本底信号。
- 阈值 (Threshold): PCR扩增信号进入相对稳定对数增长期时的荧光值, 3-15个循环的荧光信号标准差的10倍。
- Ct值 (Cycle Threshold): 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。

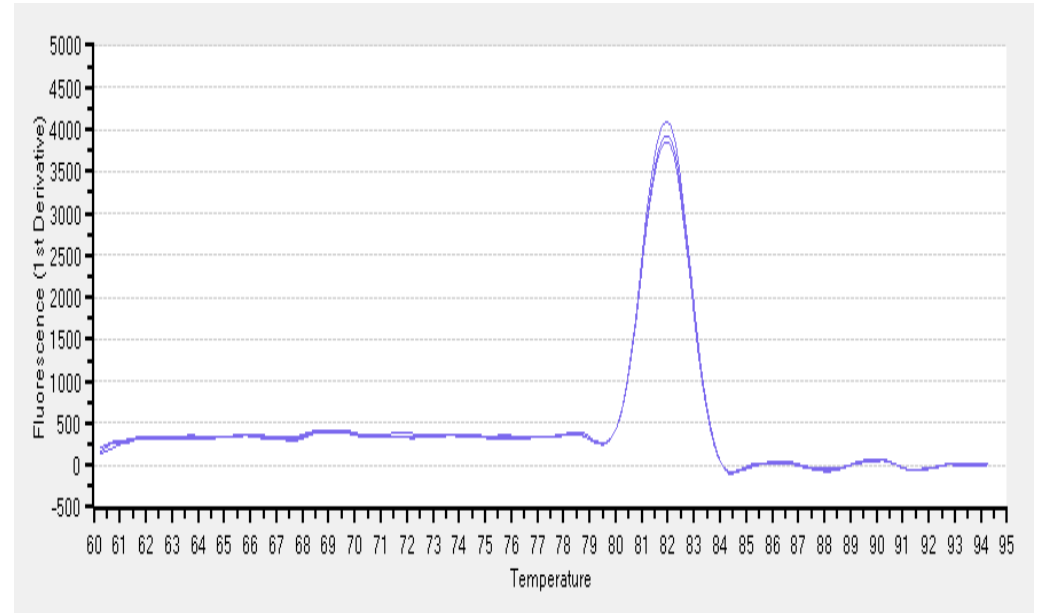
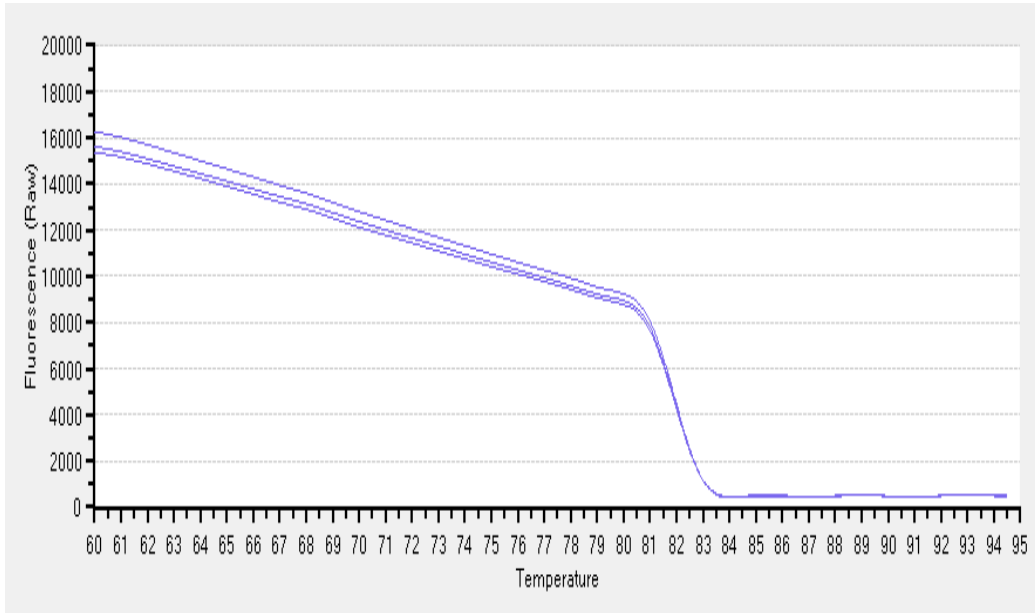


Ct值

- Ct值主要是由反应中**模板的初始浓度**决定。模板浓度高，只需较少的扩增循环就可累积足够的产物，产生高过背景的荧光信号，那么Ct值就会很早出现，相反CT值则会较晚出现。
- 大多数荧光定量PCR实验的Ct值在**18-30**之间。
- Ct值在**30-35个循环之内**出现，需要多次重复试验以判断数据的准确性，然后再判断是否有目的基因的扩增。
- Ct值在**35个循环之后**出现，可以认为反应失败。

溶解曲线（染料法）

—判断产物特异性

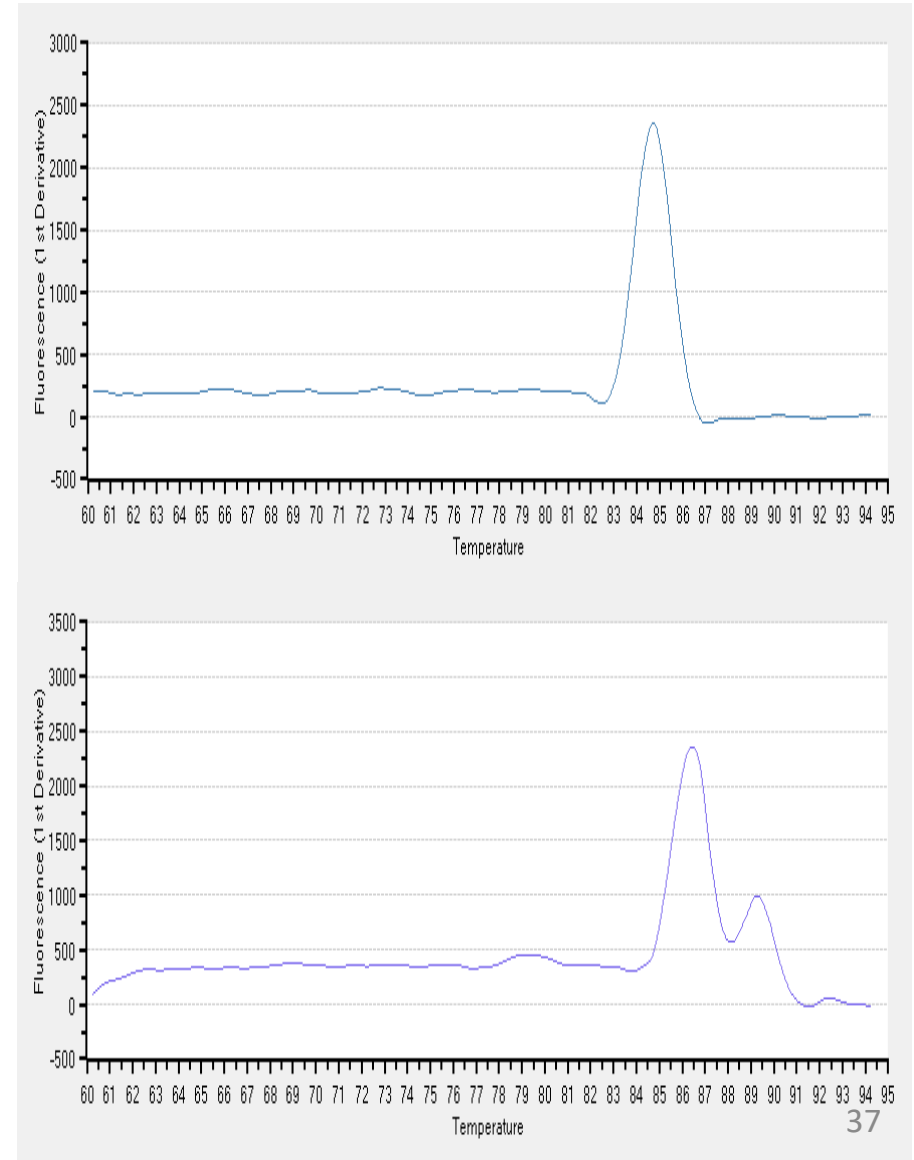
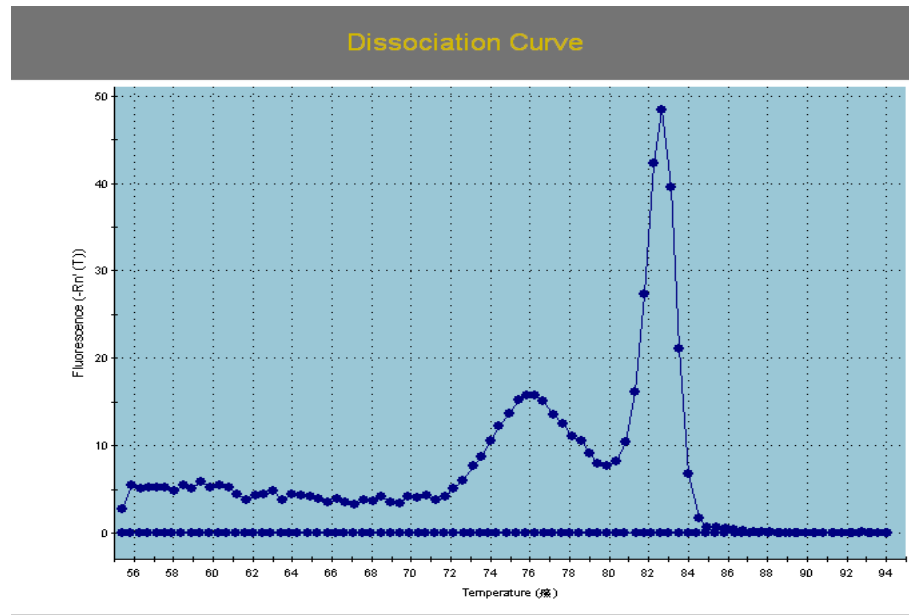


溶解曲线(Dissociation curve): 随温度升高DNA的双螺旋结构降解程度的曲线。

溶解温度(T_m): DNA双链解链50%的温度

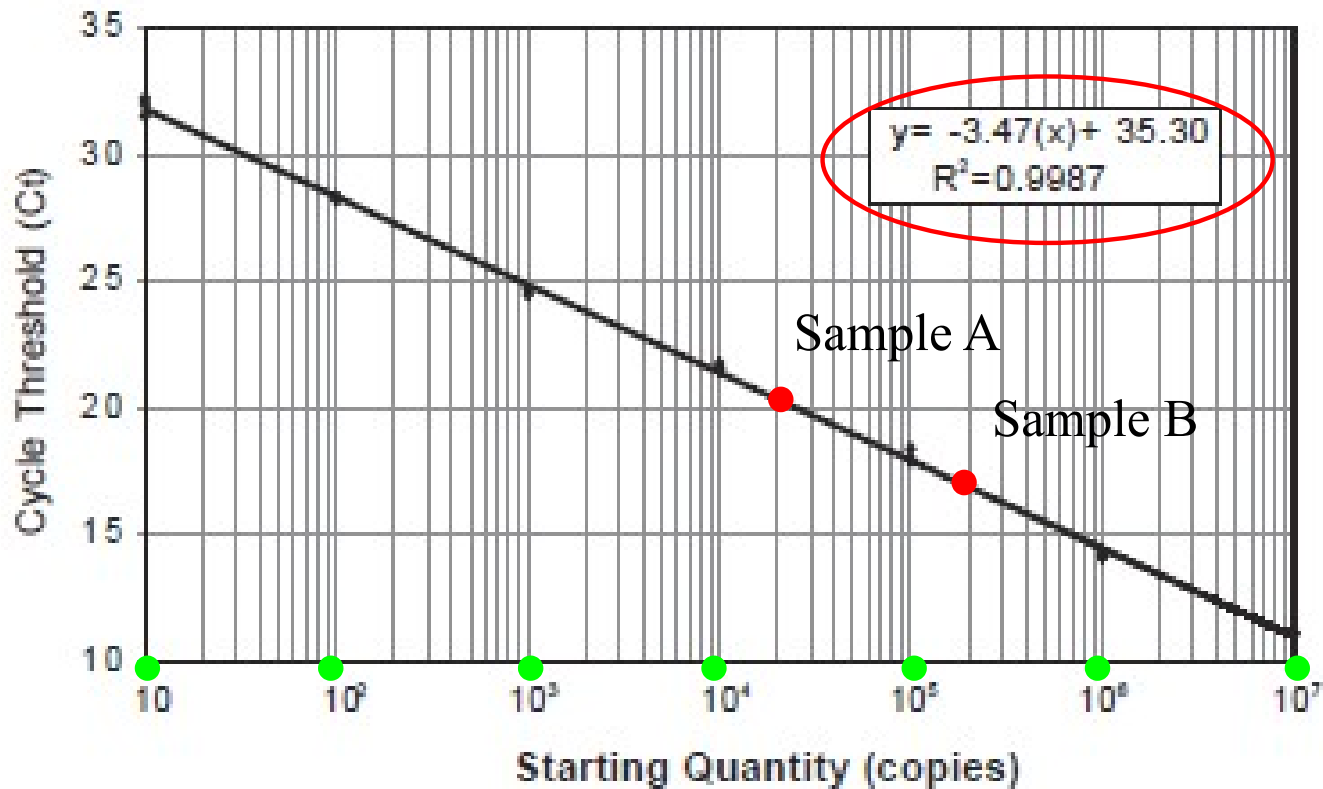
溶解曲线

—判断产物特异性

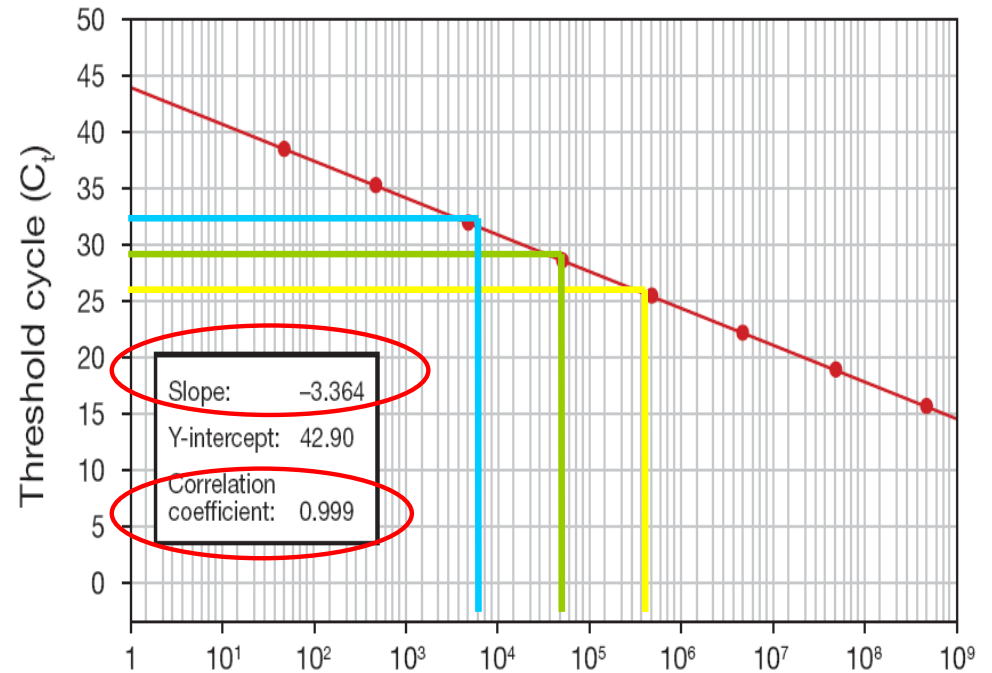
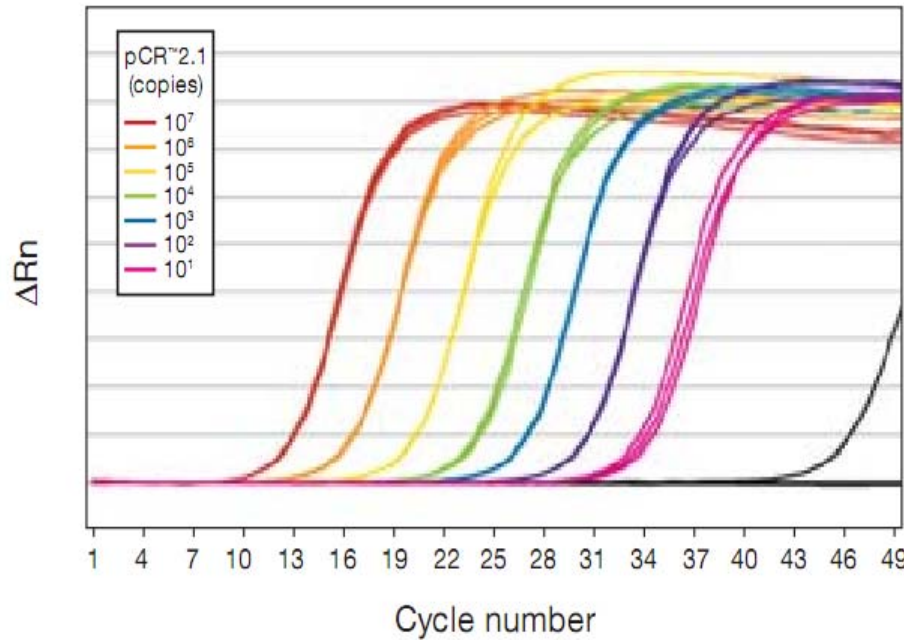


标准曲线

- 绝对定量：用标准曲线来计算待测样本的量
- 相对定量：用标准曲线来判断反应是否需要优化



扩增效率



$r^2=0.999$ Slope= -3.364

$E=10^{(-1/slope)} - 1$

$r^2: 0.95\sim 1$ Slope: -3.58~ -3.10

E: 90%~110%

➤ $E < 90\%$

- 引物本身即存在问题。
- 反应体系需进一步优化。

➤ $E > 110\%$

- 稀释样品加样错误。
- 反应中有非特异性产物生成。
- 存在反应抑制剂。

NTC (No Template Control)

NTC—反应是否存在污染

NTC—引物是否特异，是否会形成引物二聚体

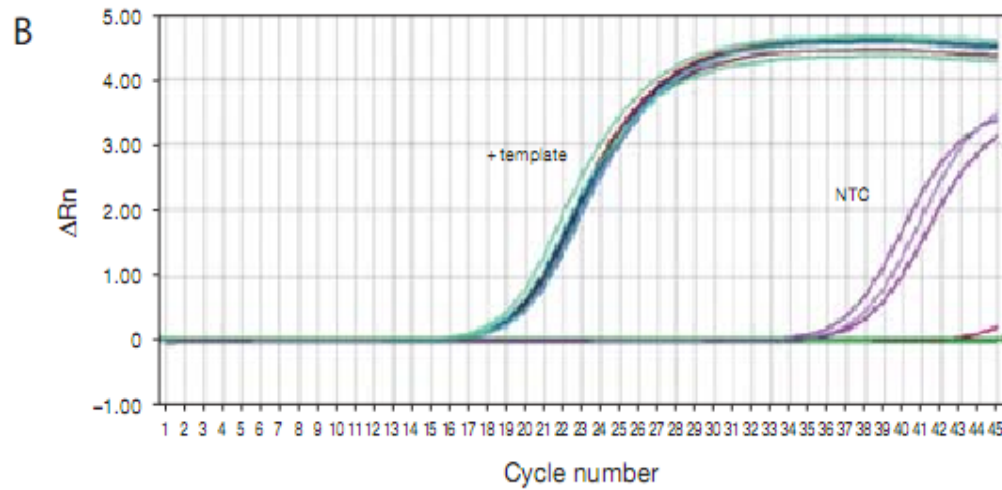
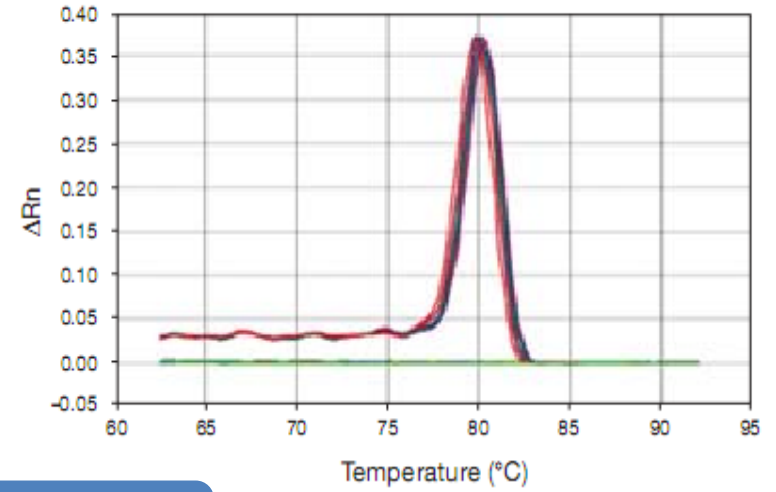
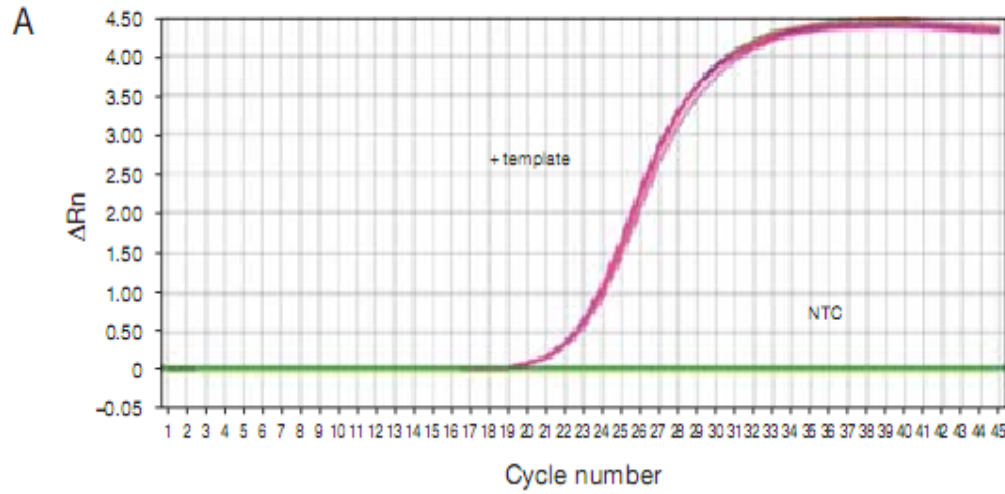
➤ NTC的最佳状况

NTC的CT值为零，扩增曲线与基线重合

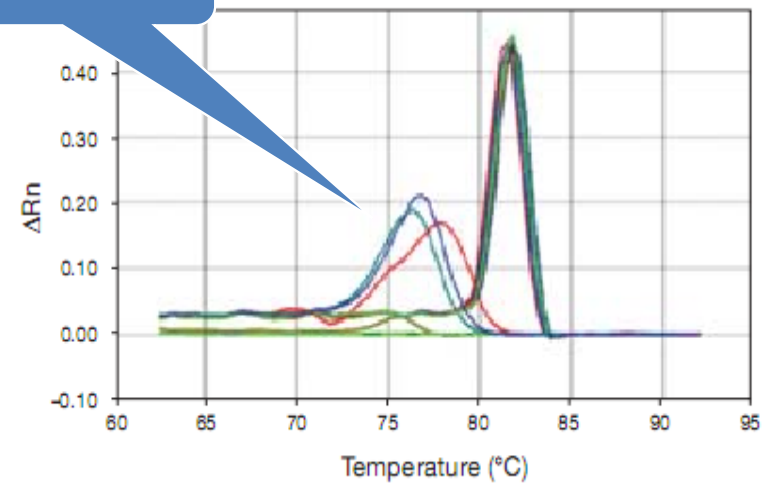
➤ NTC不为零

NTC的CT值与全管反应物的CT值相差5以上或10以上

NTC

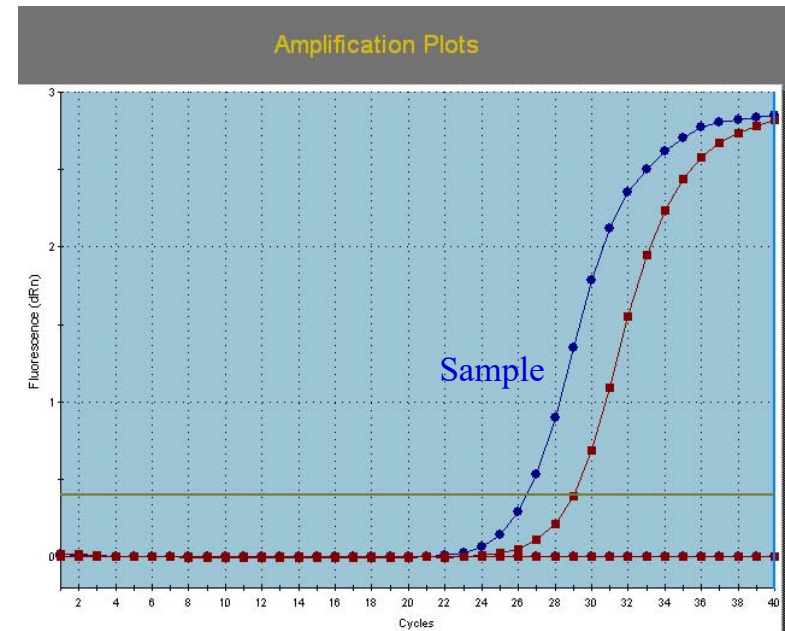
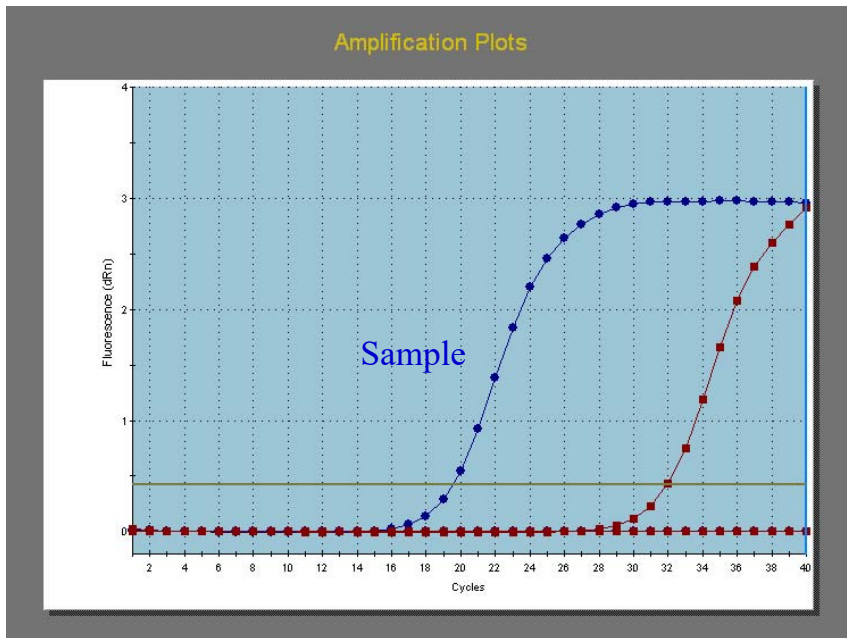
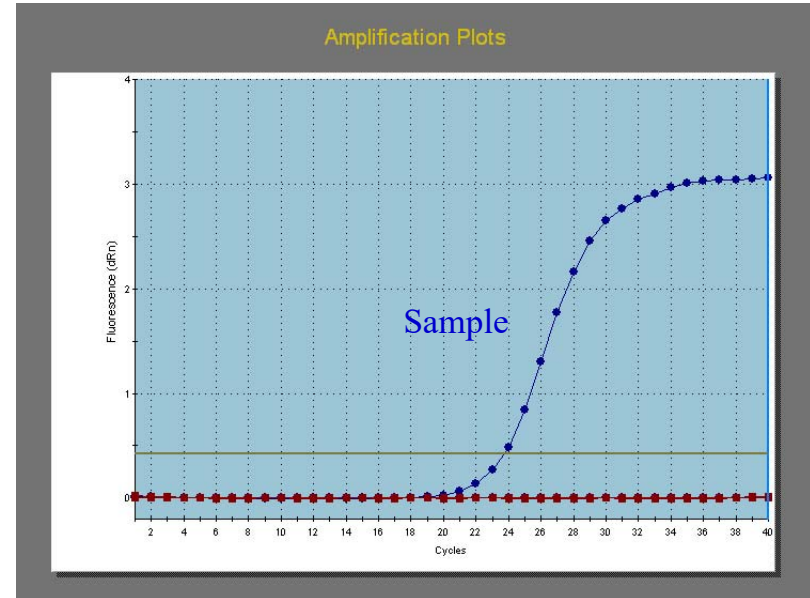


引物二聚体



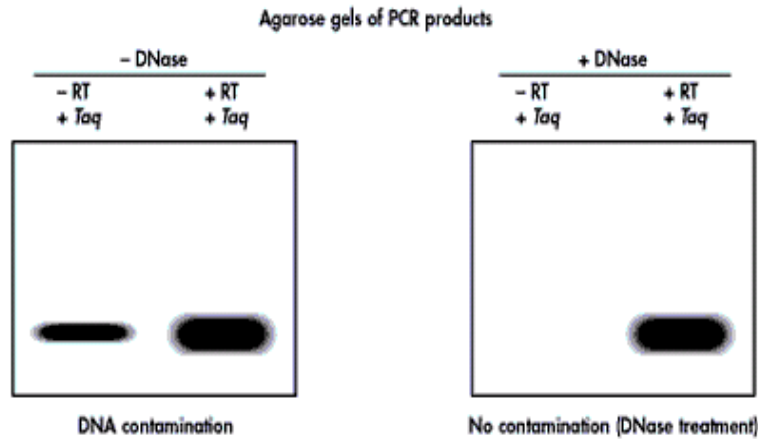
NRT (No RT Control)

- RT反应的阴性对照，
不加入RT酶的反应
- 检测RNA中是否有基因组DNA残留



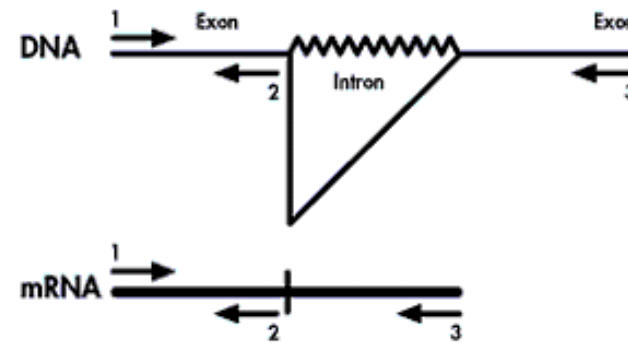
如何避开DNA的干扰？

Use controls with and without reverse transcriptase.
Presence of a product in the absence of RT indicates DNA contamination.

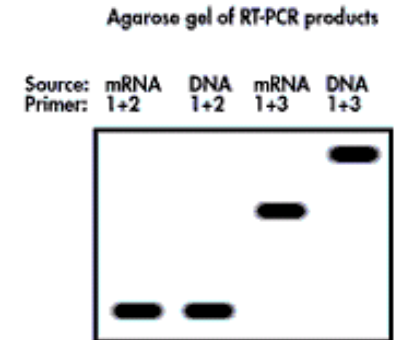


A

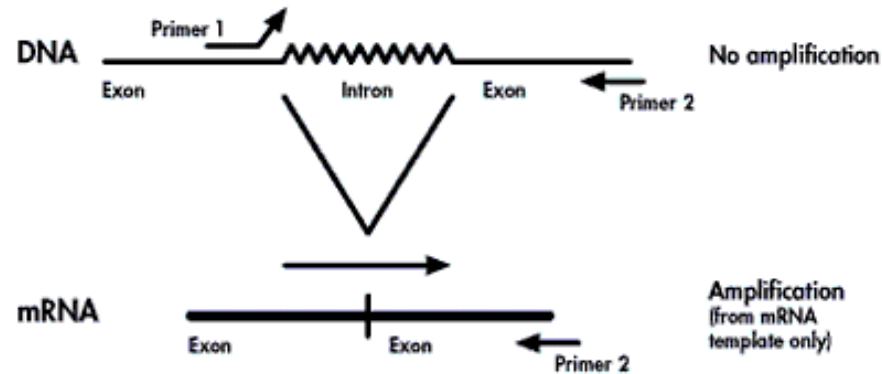
Use intron-spanning primers.



B



Design primers to anneal at a splice junction to avoid any signal based on DNA contamination.



C

相对定量实例

比较正常组织与胶质瘤病人
样本中A基因的表达差异

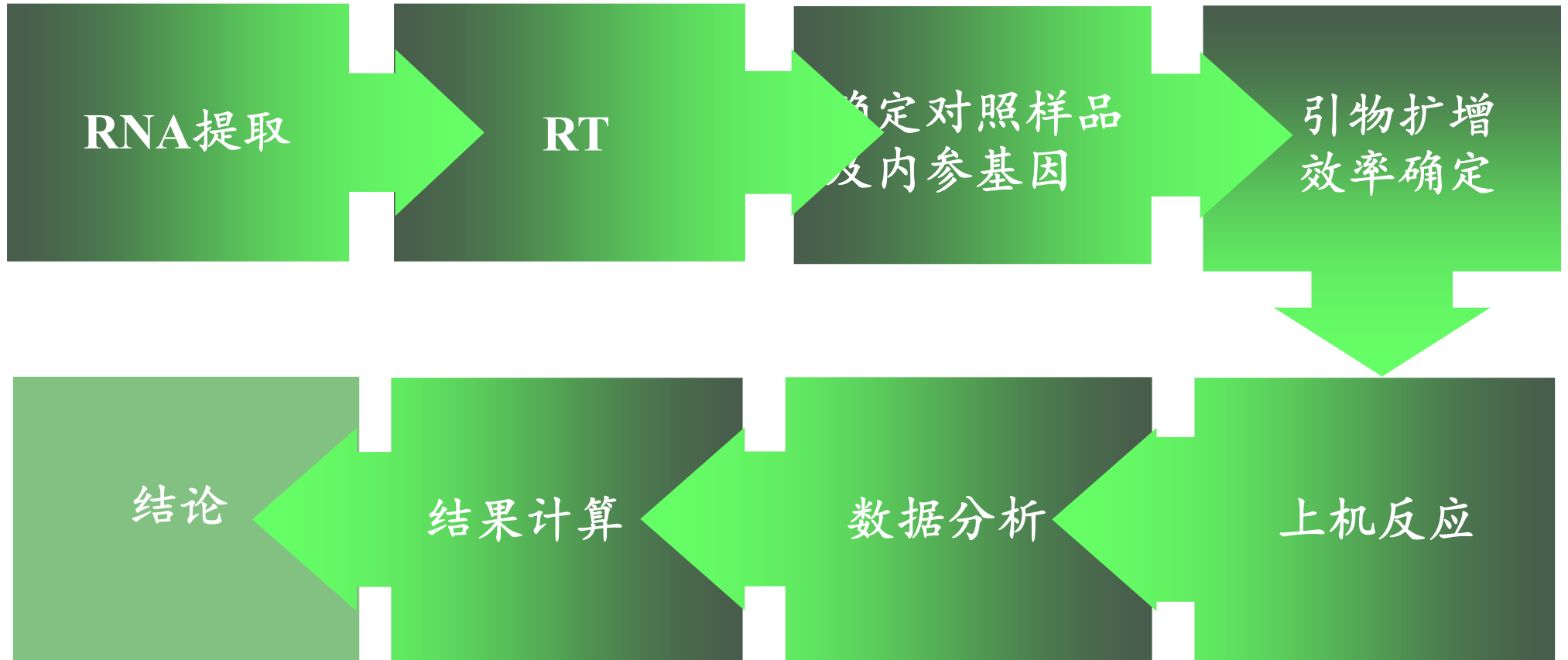
```
CTAAAGATGATCTTTAGTCCCGGTTTCGAA  
TCTTTAGTCCCGGTTGATAACACCAACC  
GTAATACCAACCGGGACTAAAGATCCCG  
GGGACTAAAGTCCCACCCCTATATATATG
```

```
TTCAAATTTCTTCAAAAAGAGGGGAG  
GTGATTACATACAAATCGGAGGTGCCTA  
TTTGTCATACTACATTTGCACCTATGTTT  
GATGAGAGAGAAAATGTGTGT
```

```
TTTGCTAAACAAGGTTTTATAAAATAGTTG  
AAATAATAGAAAACAACTAAAATGAAAAT  
TATTACTTAACAAATAGTTTTTAAGAATTAT  
AATAAAGATATCTTATAATTATTGTATGACT
```

```
ACGGTTTTTTTGACTCATGTAGATGGATC  
AGAGTTTATTGACGGCGTGCACTATTTTT  
TTTTATTTGTTGTCCATGCAATAAGTGTA  
TATTCATTTCCACTTGTTTGAGTGGGGT
```

相对定量实例—实验步骤



1. 确定对照样品及内参基因

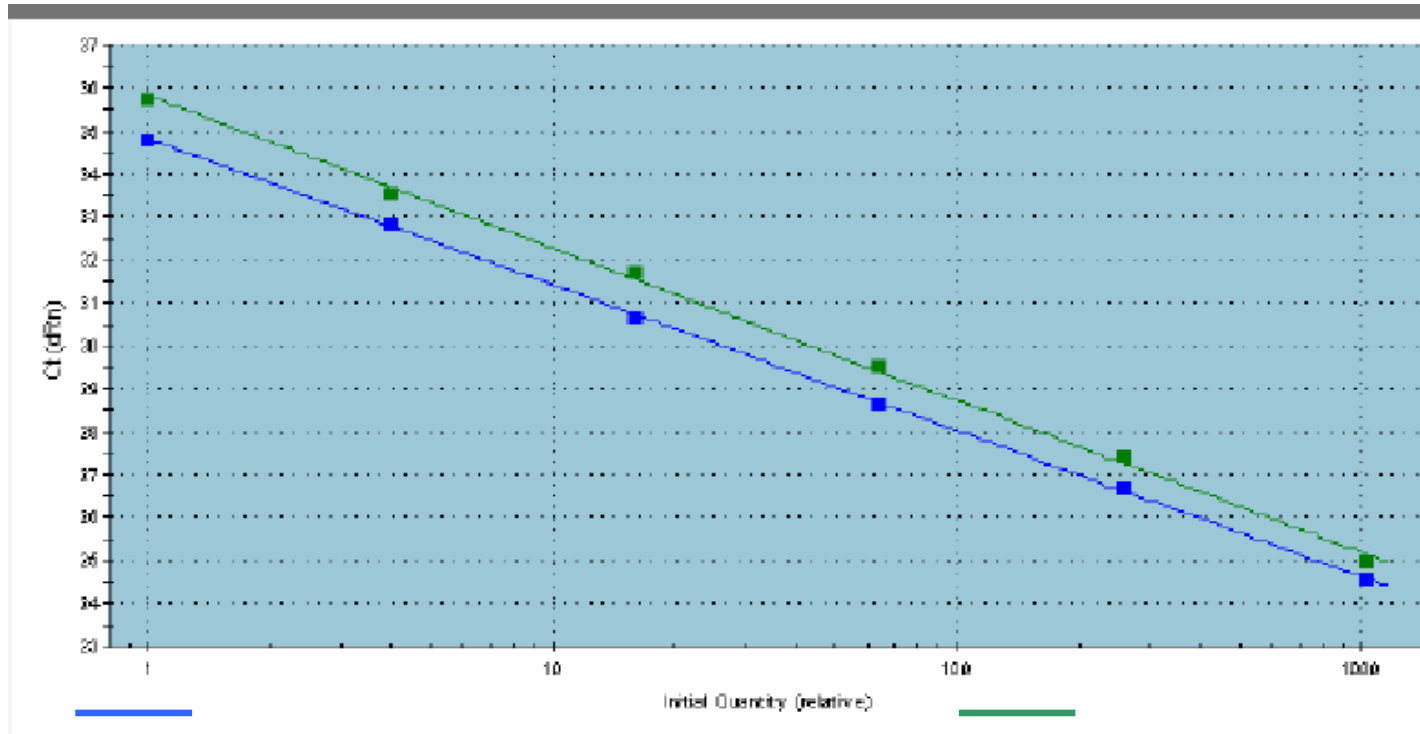
确定对照样本 (Calibrator)

多个样本比较情况下，其中之一作为对照样本，其它所有样本中目的基因的表达都相对于对照上调或下调。

确定内参基因 (GAPDH或 β -actin)

在所有样本中恒定表达的已知基因，对起始模板量均一化，该内参基因可以是一个或多个。

2. 引物扩增效率确定



β -actin

$$y = (-3.397)x + 34.81$$

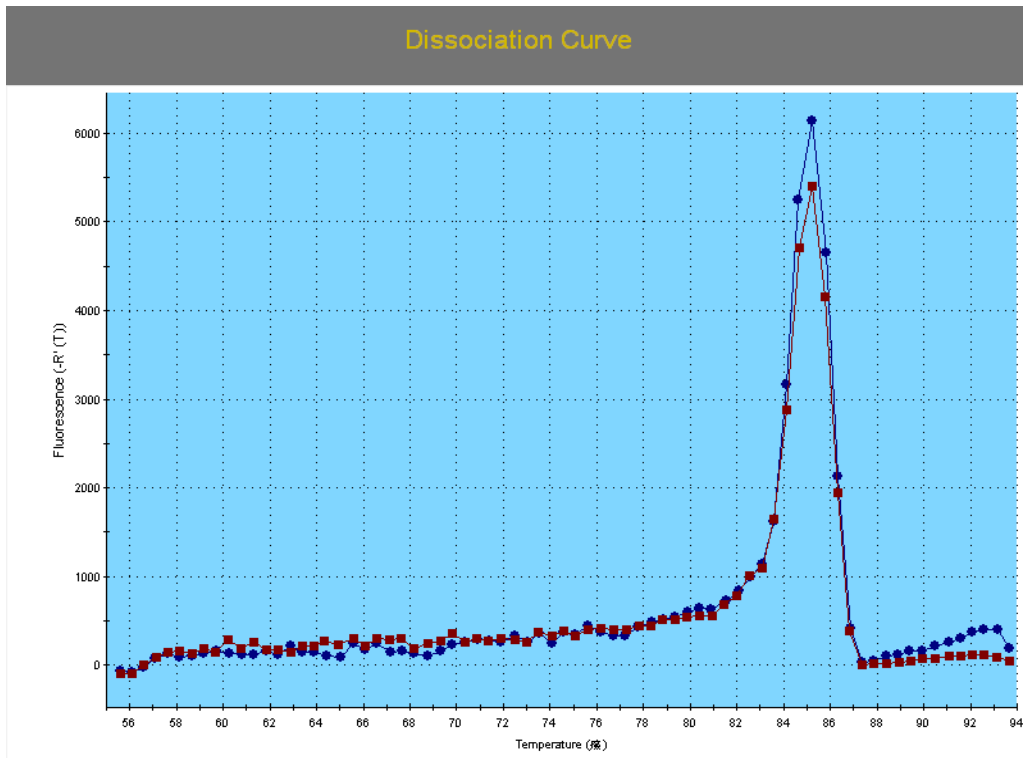
$$r^2 = 1, E=97.1\%$$

A

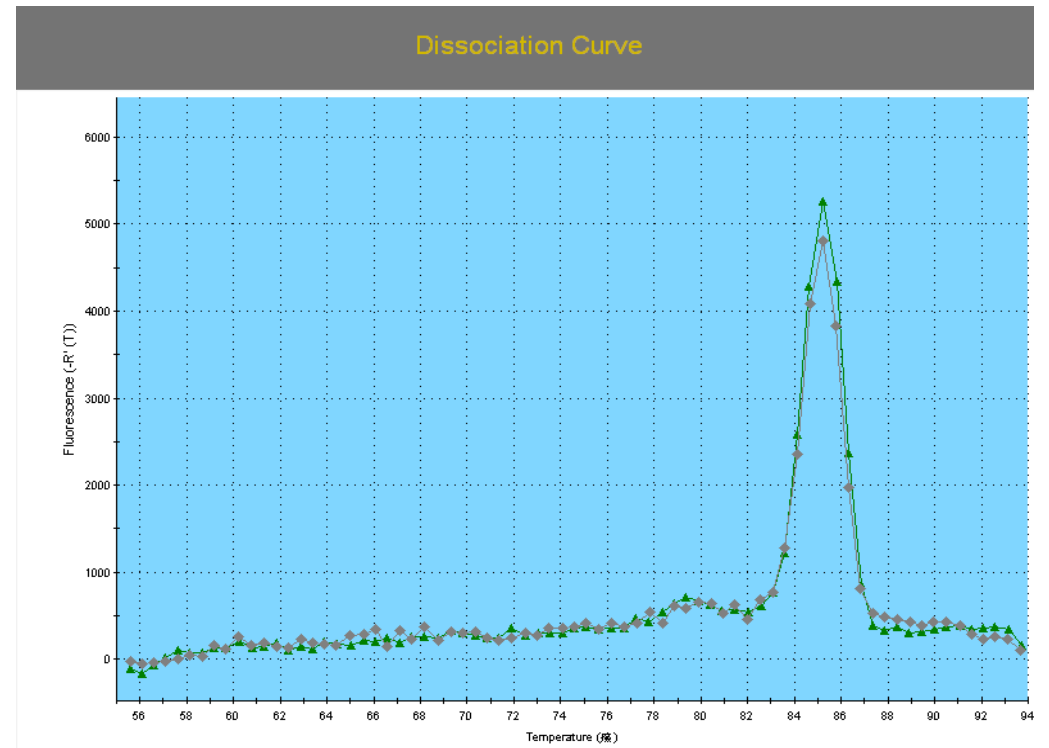
$$y = (-3.545)x + 35.81$$

$$r^2 = 0.999, E=91.5\%$$

3. 数据分析—融解曲线

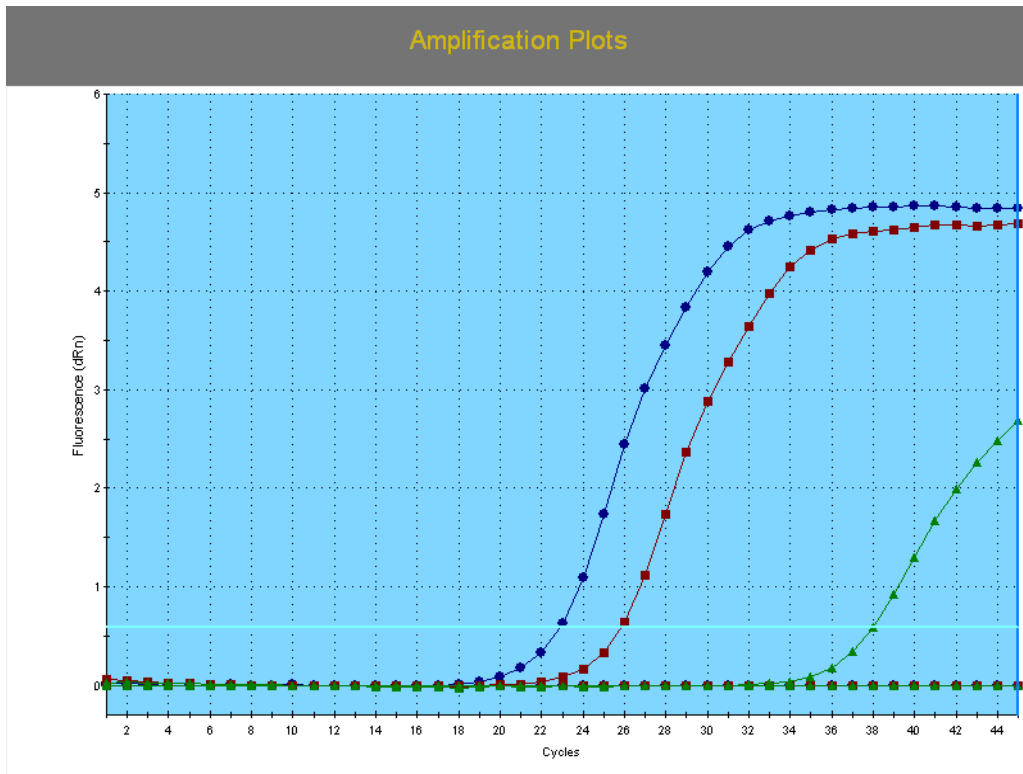


β -actin

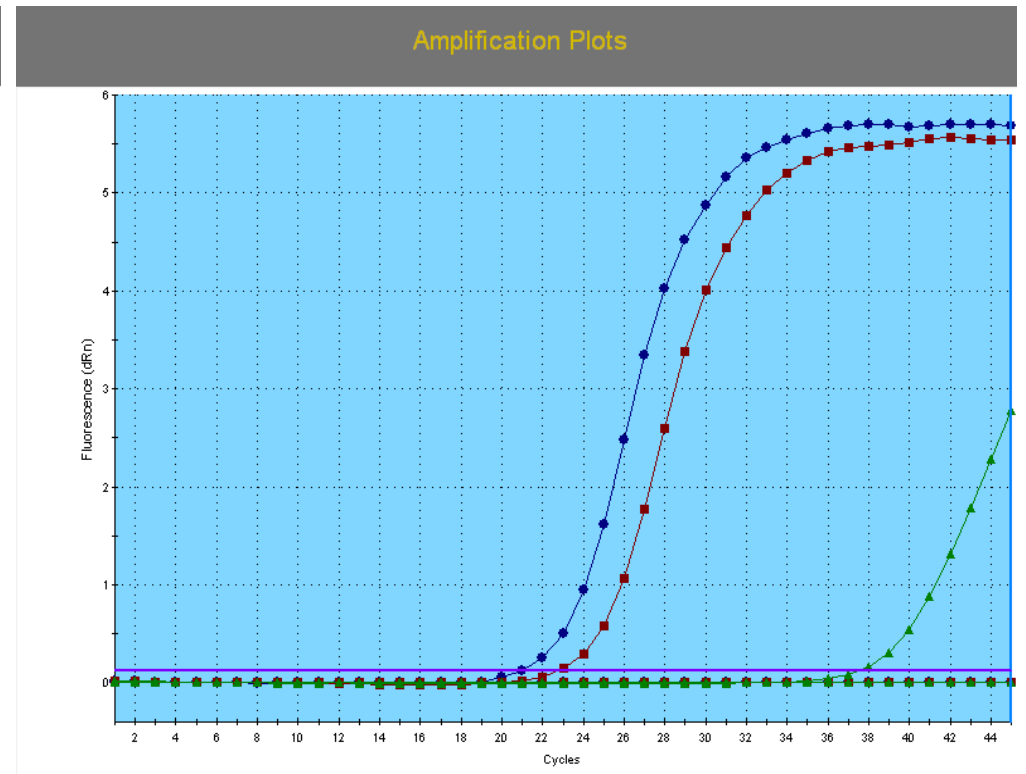


A

3. 数据分析—扩增曲线&NTC

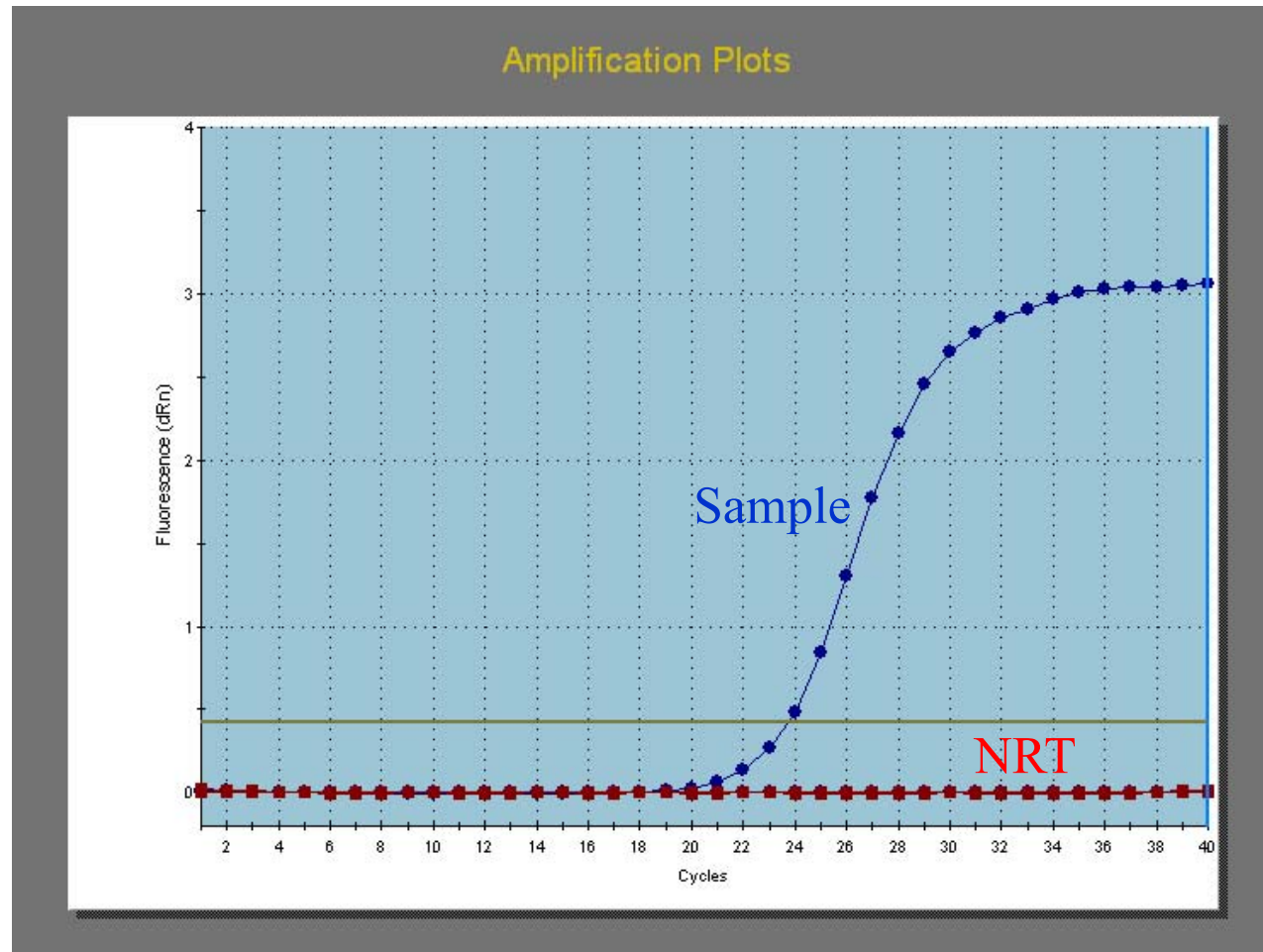


β -actin



A

3. 数据分析—NRT曲线



4. 结果计算

Template	Assay	Ct
正常组织	actin	22.88
胶质瘤组织	actin	25.86
正常组织	A	21.08
胶质瘤组织	A	22.86

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

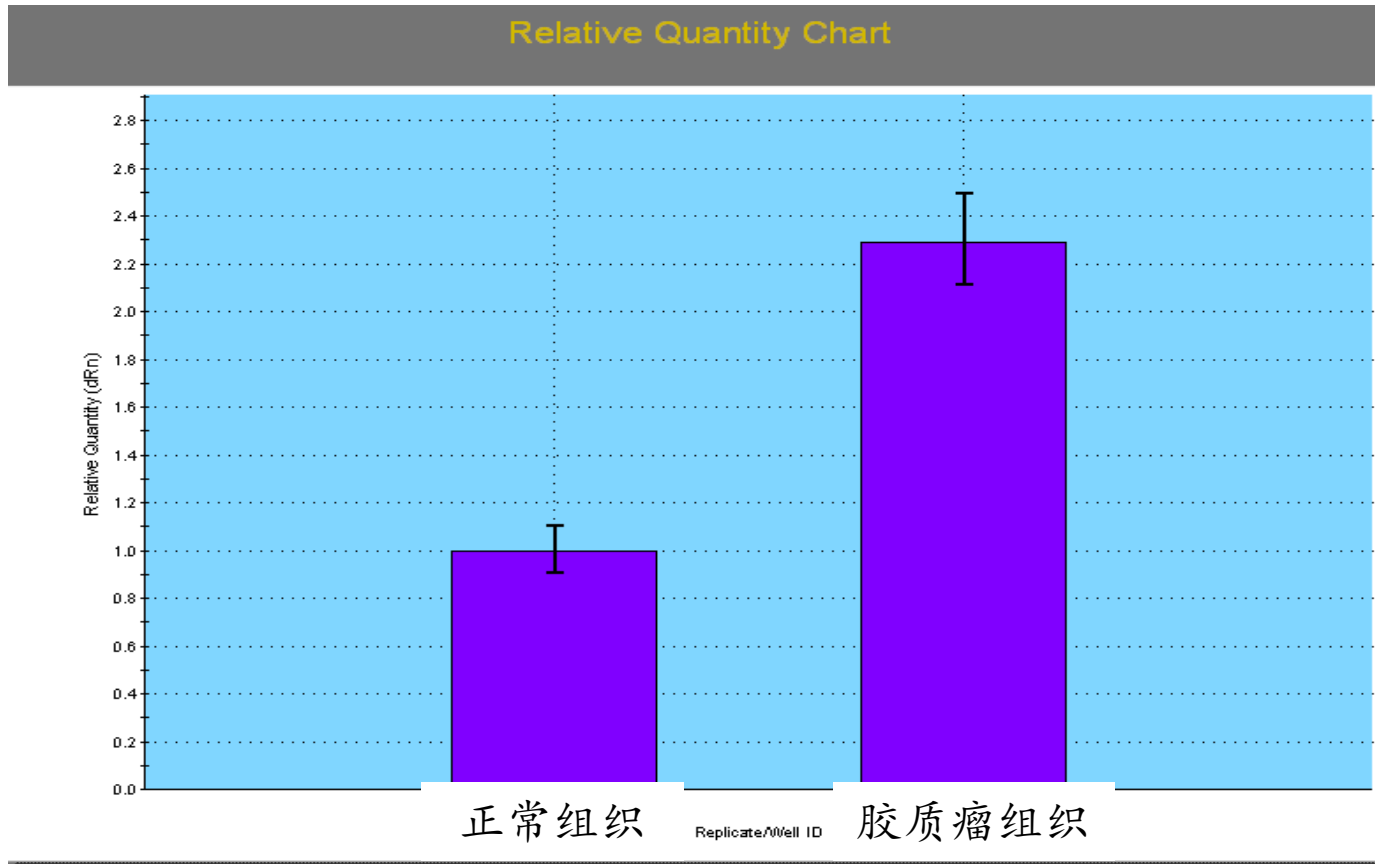
$$\begin{aligned}\Delta Ct (\text{试验样品}) &= Ct (\text{试验样品, 目的基因}) - Ct (\text{试验样品, 内参基因}) \\ &= 22.86 - 25.86 = -3\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\Delta Ct (\text{对照样品}) &= Ct (\text{对照样品, 目的基因}) - Ct (\text{对照样品, 内参基因}) \\ &= 21.08 - 22.88 = -1.8\end{aligned}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{试验样品}) - \Delta Ct (\text{对照样品}) = (-3) - (-1.8) = -1.2$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(-1.2)} = 2.30$$

5. 得出结论



胶质瘤组织中A基因表达量比正常组织中高2.30倍