

Contents

1

实时荧光定量PCR原理

2

实时荧光定量PCR的方法介绍

Click to add title in here

3

实时荧光定量PCR的应用

实时荧光定量PCR定义：

- √ 在**PCR**反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号累积实现了实时监测整个**PCR**进程，对起始模板进行定量分析的方法。

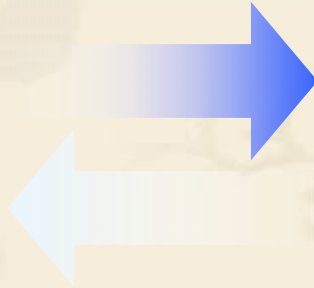
与普通PCR的区别

普通PCR技术

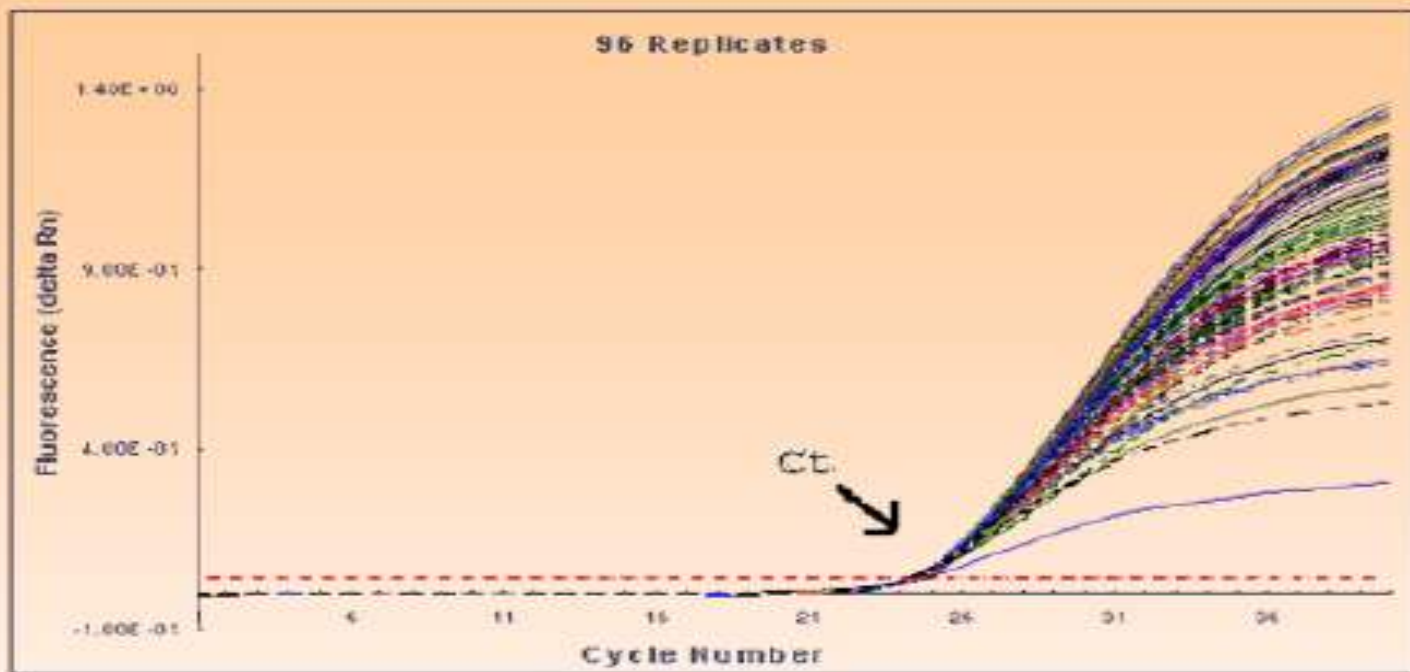
在PCR结束后对终点产物进行定量分析。

实时定量PCR技术

实时检测PCR扩增，在扩增的指数期对起始模板进行定量。



纵轴：荧光信号量



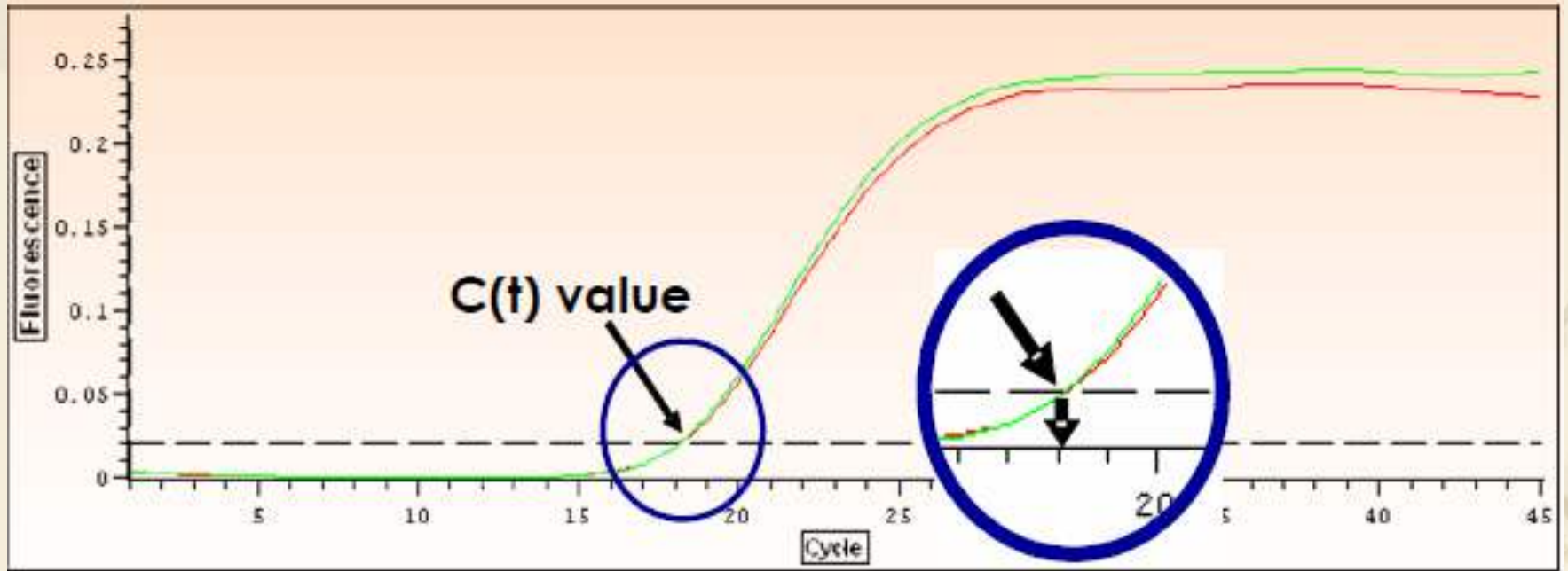
横轴：PCR反映循环数

相同模板进行96次扩增，终点处产物量不恒定；Ct值则极具重现性。

Ct值

Ct值的定义：

扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环数。此时扩增是呈对数期增长。



定量PCR的数学原理

- 理想的PCR反应： $X=X_0*2^n$
- 非理想的PCR反应： $X=X_0(1+Ex)^n$

n: 扩增反应的循环次数

X: 第n次循环后的产物量

X_0 : 初始模板量

Ex: 扩增效率

在扩增产物达到阈值线时:

$$X_{Ct} = X_0(1+Ex)^{Ct} = M \quad (1)$$

X_{Ct} : 荧光扩增信号达到阈值强度时扩增产物的量。

在阈值线设定以后,它是一个常数,我们设为M

方程式(1)两边同时取对数得:

$$\log M = \log X_0(1+Ex)^{Ct} \quad (2)$$

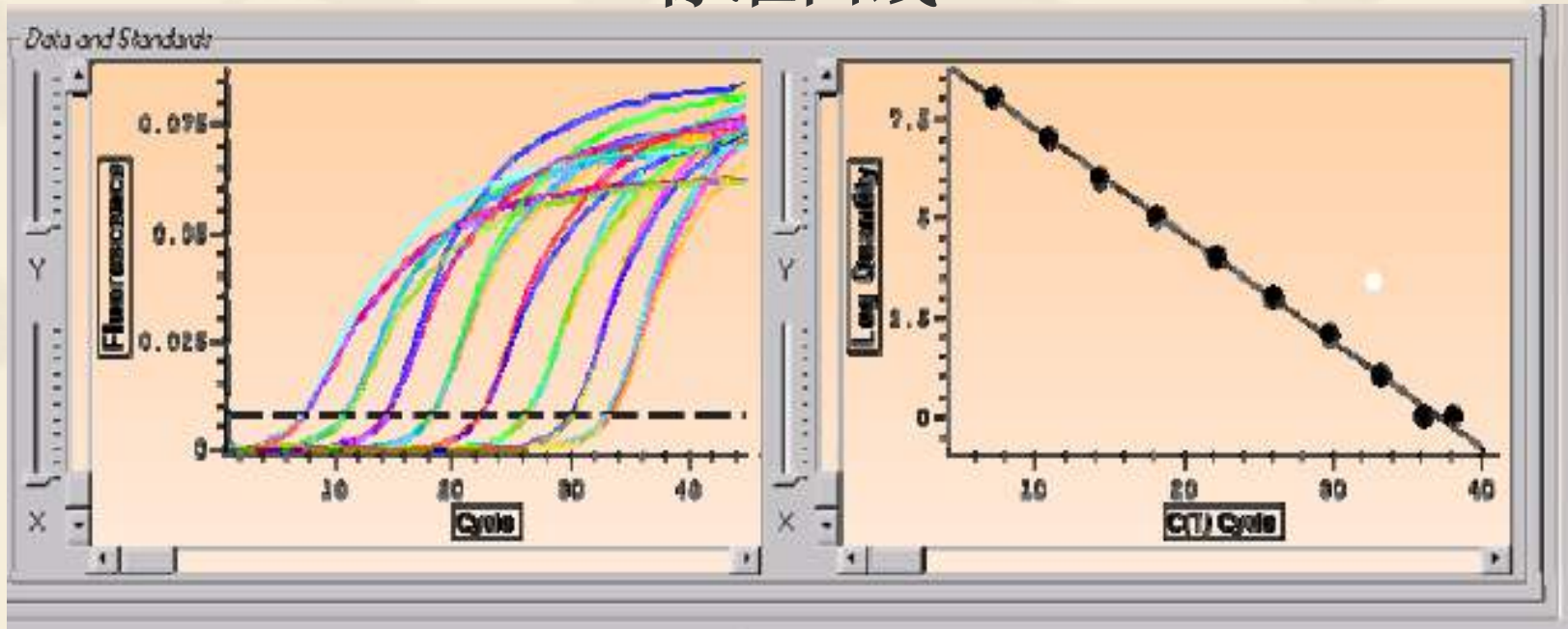
整理方程式(2)得:

$$\log X_0 = -\log(1+Ex) * Ct + \log M \quad (3)$$

最后结论:

Log X_0 与 Ct 呈线性关系, 根据样品扩增的 Ct 值就可计算出样品中所含的模板量。

标准曲线



Log起始拷贝量与**Ct**呈线性关系，通过已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线，根据样品**Ct**值，就可以计算出样品中所含的模板量。

实时荧光定量PCR的方法介绍

DNA 产物的荧光标记

非特异性荧光标记:

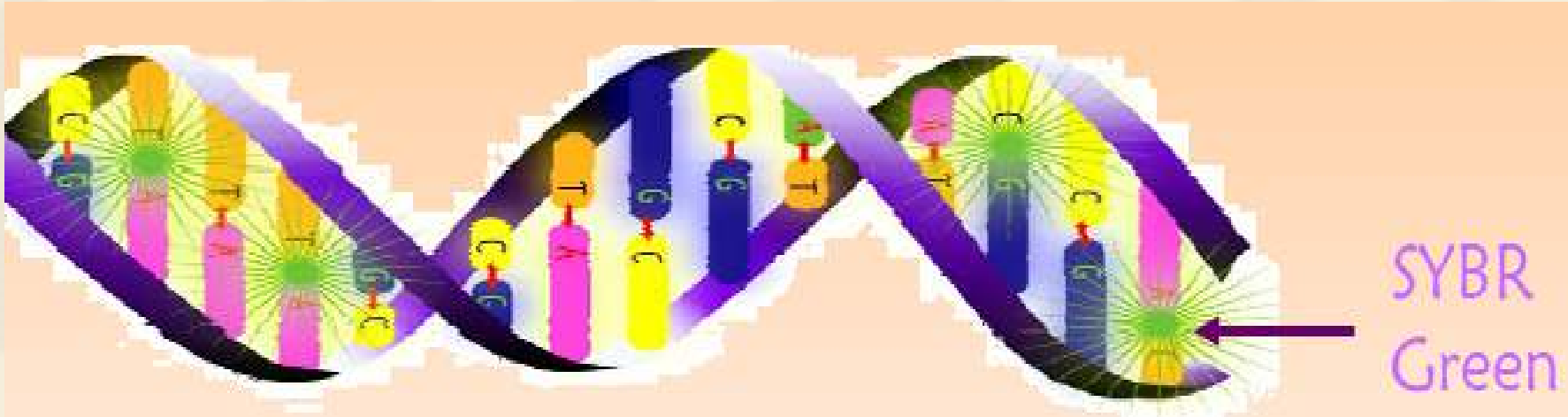
1、SYBR Green

特异性荧光标记:

2、TaqMan

3、Molecular Beacon

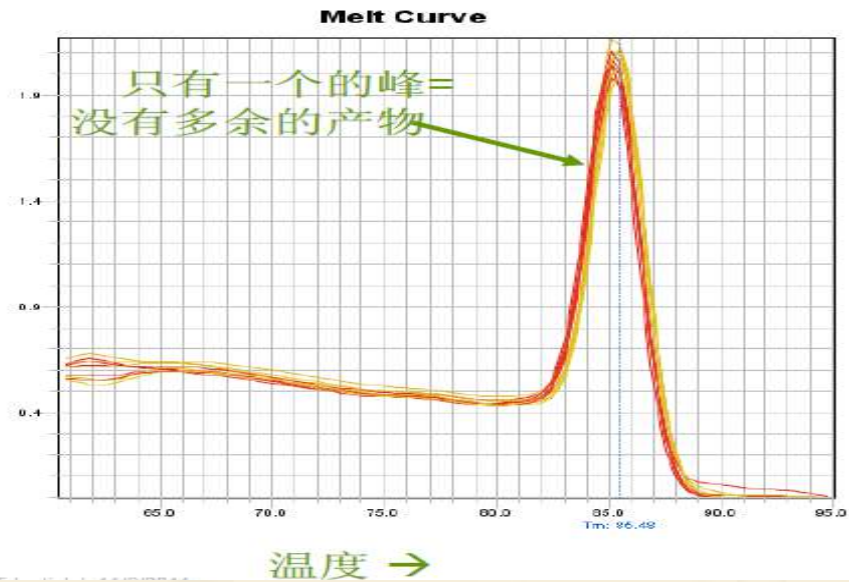
SYBR Green法工作机理



1. SYBR Green只有和双链DNA结合后才发荧光。
2. 变性时，DNA双链分开，无荧光。
3. 在延伸结束阶段采集荧光信号。
4. SYBR Green也能和非特异的双链DNA结合发光，所以必须在反应结束时做熔解曲线分析。

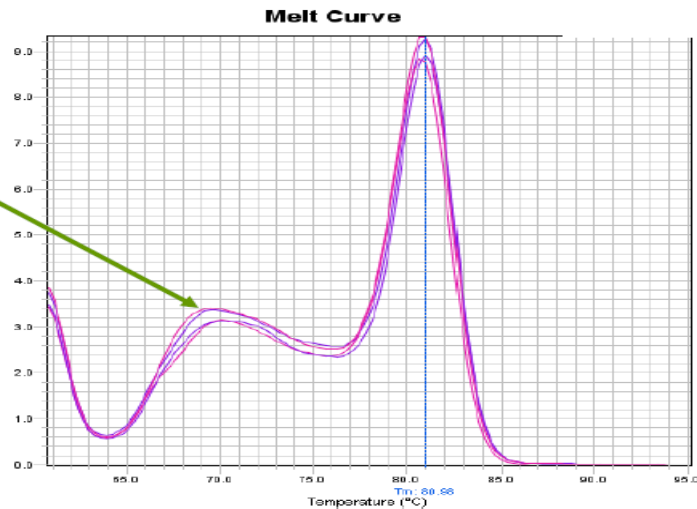
QPCR 熔解曲线分析

↑
荧光



融解曲线分析，单一峰，无非特异性荧光，定量准确

可能是引物二聚体



融解曲线分析，出现杂峰其他产物出现非特异性荧光，因此定量不准确

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/427043054162010004>