

1

PCR技术简介

2

实时荧光定量PCR技术原理

3

实时荧光定量PCR结果分析

4

结果报告的要点分析

5

临床基因扩增检验技术在
性病实验诊断中的应用

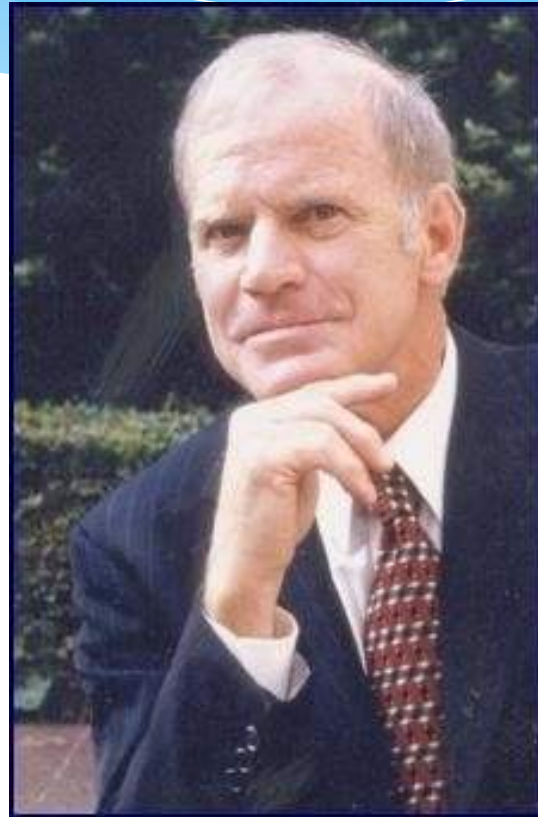
6

临床基因扩增检验管理要求

一、多聚酶链式反应

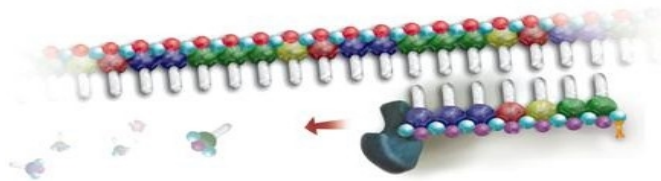
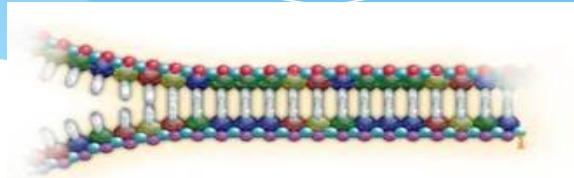
(PCR: Polymerase Chain Reaction)

- 1985年，Kary. B. Mullis教授发明了具有划时代意义的PCR技术。
- 1993年，Kary. B. Mullis因该技术的发明而获得诺贝尔化学奖。

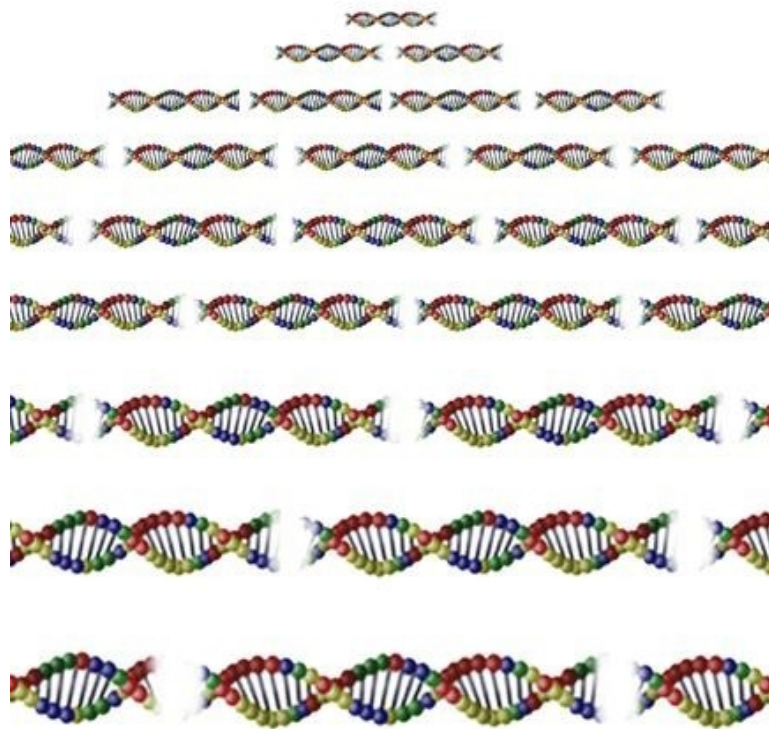


PCR反应过程

- * 93 °C~98 °C 变性：加热使双链DNA变为单链。
- * 37 °C~65 °C 退火：降温使引物和互补模板在局部形成杂交链。
- * 70 °C~75 °C 延伸：耐热DNA聚合酶按5'→3'方向催化以引物为起始点的延伸反应。



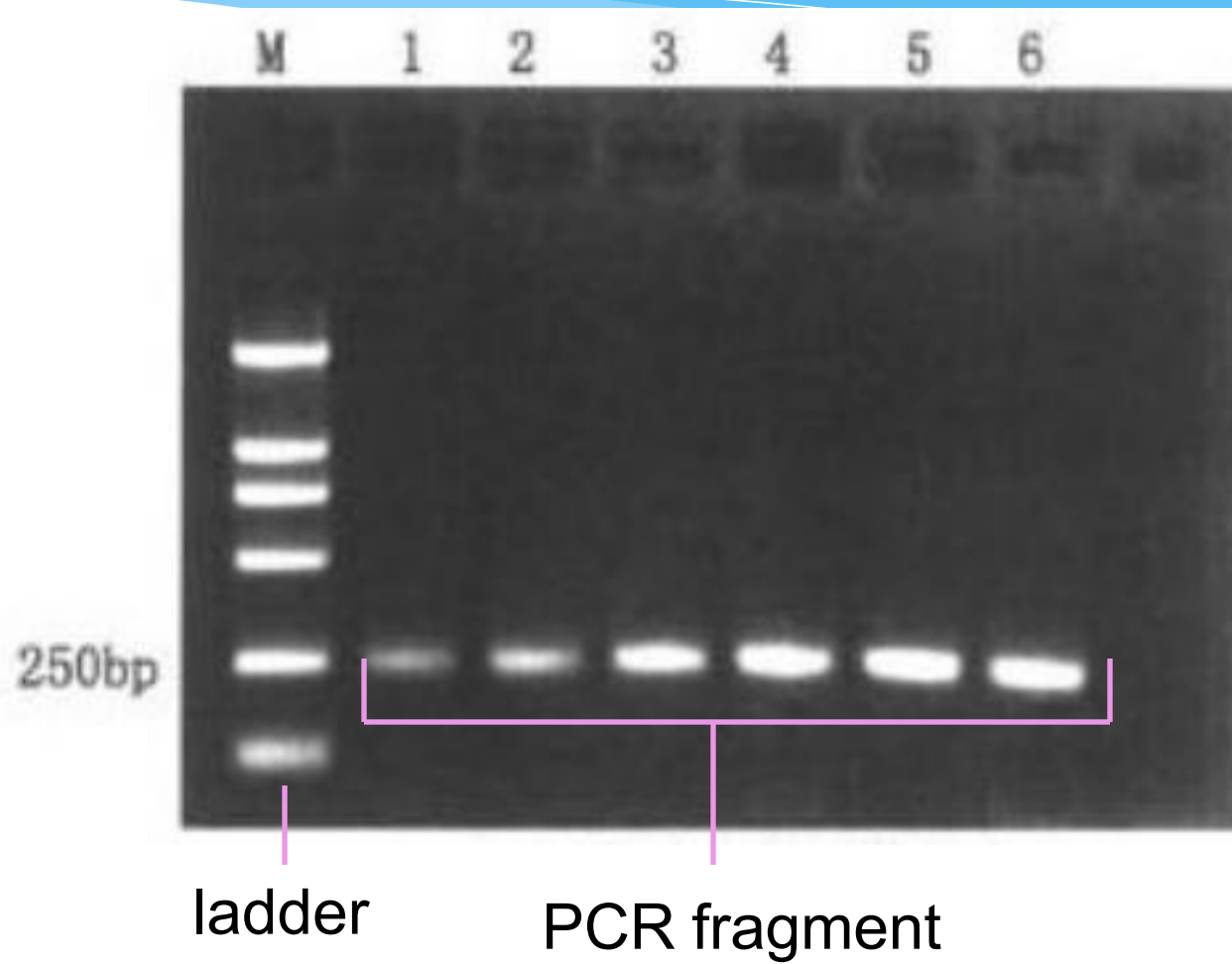
PCR技术原理



循环次数	DNA的链数
1	2^1 2
2	2^2 4
3	2^3 8
10	2^{10} 1024
20	2^{20} 1,048,576
30	2^{30} 1,073,741,824 10亿

PCR特点：高效扩增、忠实复制

PCR产物的电泳检测和分析



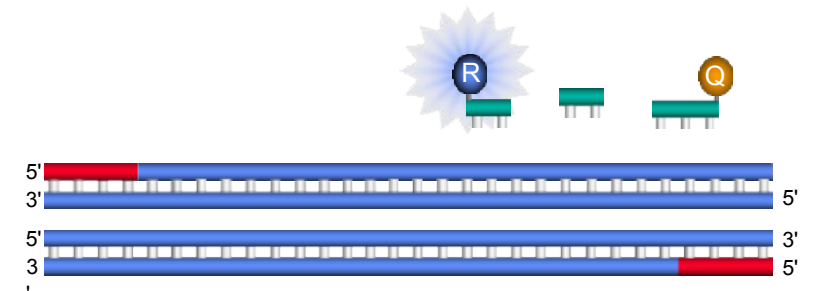
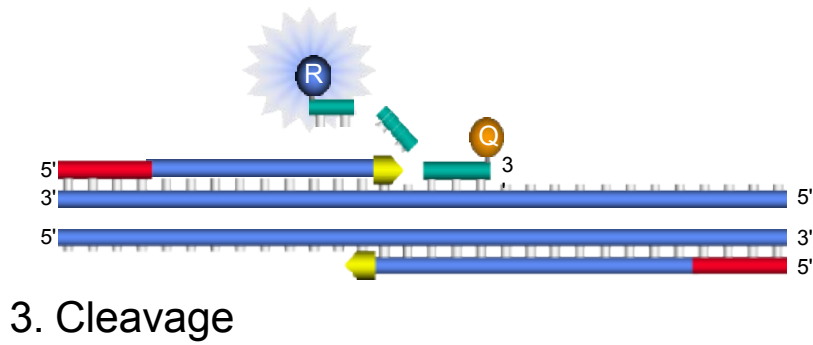
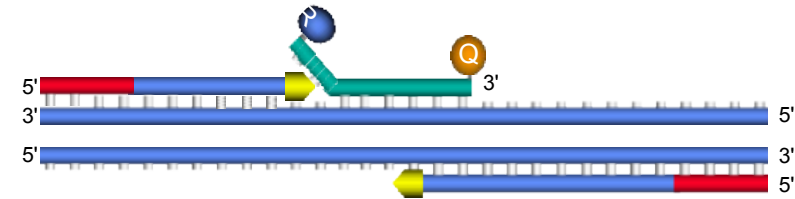
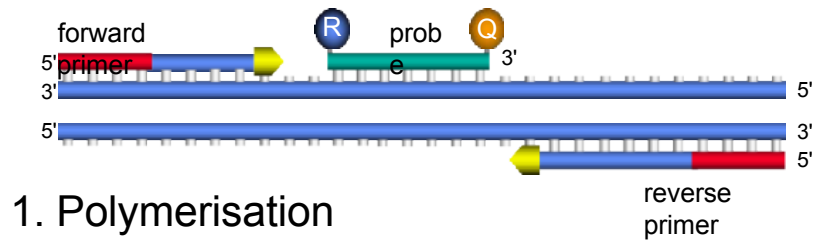
二、实时荧光定量PCR

(Real time Quantitative 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时监测整个PCR进程，最后通过Ct值和标准曲线对未知模板起始浓度进行定量分析的方法。

TaqMan作用机理

1. 每产生一条DNA链，就切断一条探针
2. 每切断一条探针，就产生一个单位信号
3. 信号强度与结合探针的DNA分子数成正比



4. Polymerisation completed

与普通PCR的区别

普通PCR	实时荧光定量PCR
开管操作、需要后处理、易造成污染，假阳性率高。	闭管操作、无需后处理、避免了污染，防止假阳性。
PCR结束后，对终点产物进行分析，不能定量，重复性差。	实时监测PCR扩增，在指数扩增期对起始模板进行定量，重复性好。
人工分析结果，操作复杂，存在误差。	仪器自动分析，操作简单，增加了灵敏度和客观性。

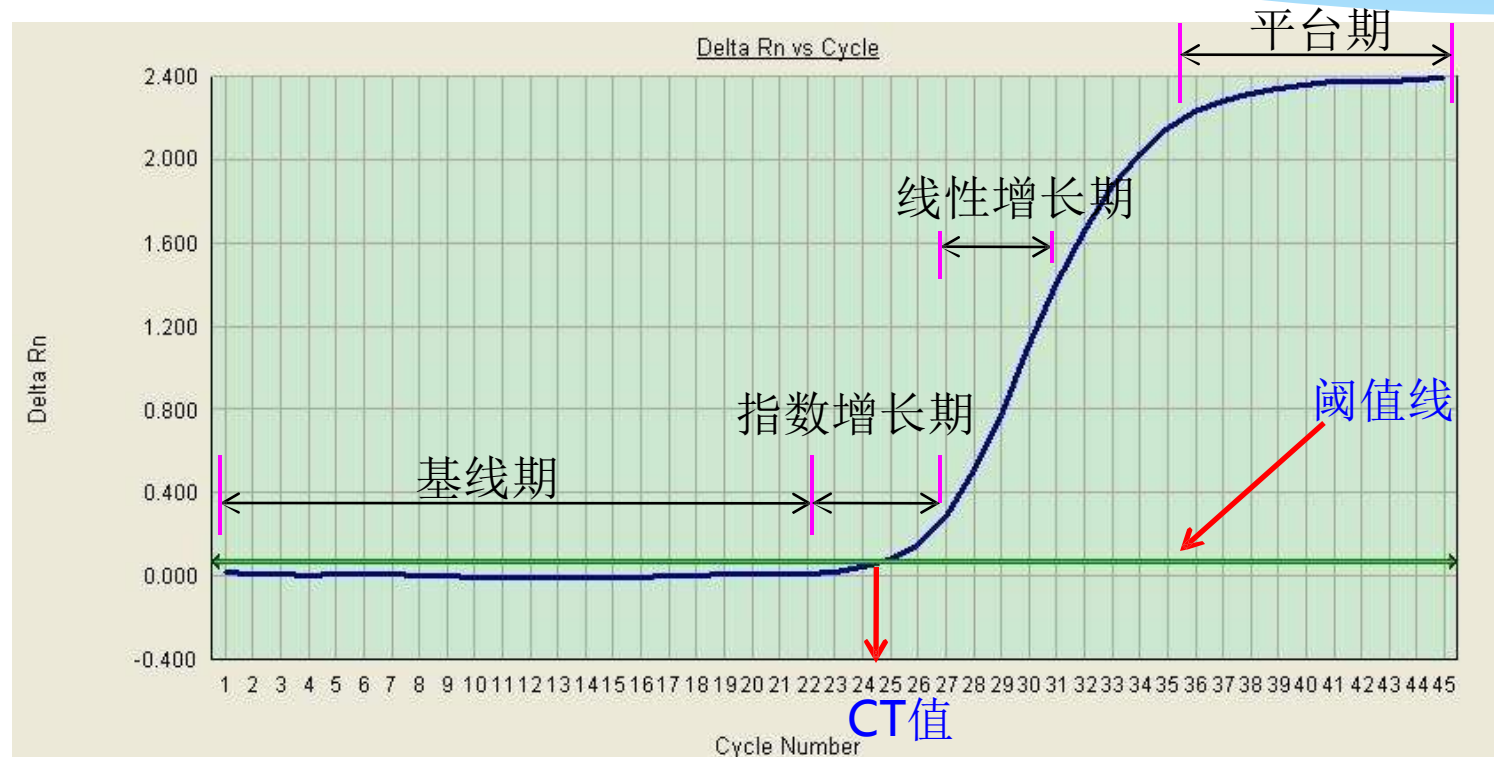
实时荧光定量PCR应用

- 病原体检测
- 转基因食品检测
- 基因表达研究
- 基因表达差异分析
- 亲子鉴定、个体识别
- 基因分型

三、实时荧光定量PCR结果分析

- 扩增曲线的认识
- 结果分析时几个基本概念

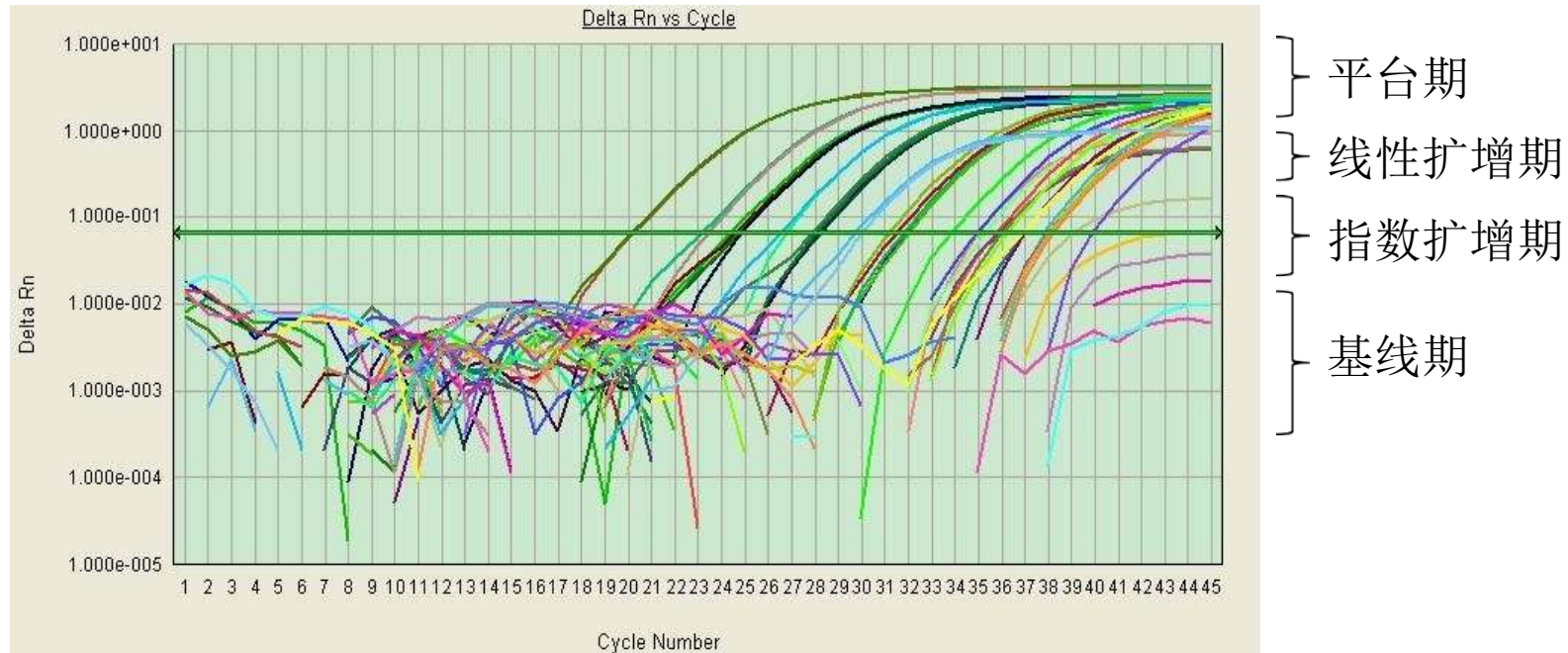
PCR扩增曲线线性图



扩增曲线线性图谱:

横坐标: 扩增循环数 (Cycle number); 纵坐标: 荧光强度 (Delta Rn)。

PCR扩增曲线对数图



扩增曲线对数图谱：

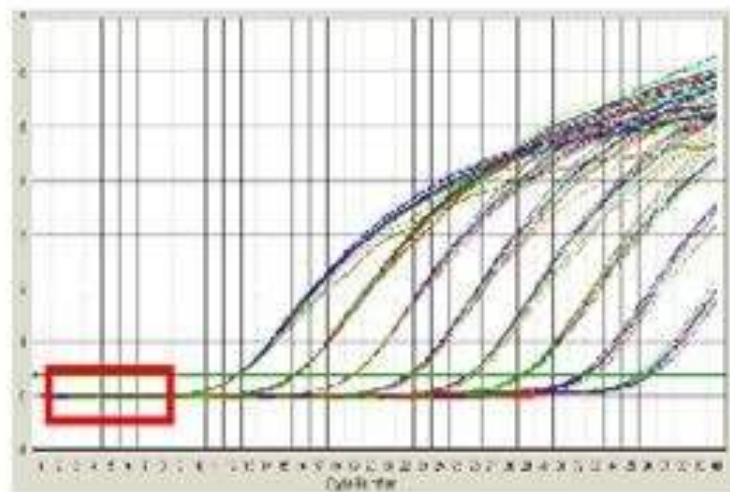
横坐标：扩增循环数（Cycle number）；纵坐标：荧光强度（Delta Rn）。

结果分析时的几个基本概念

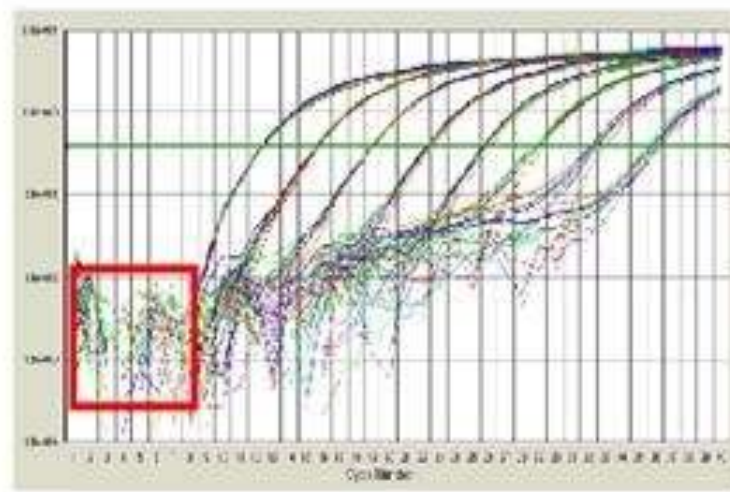
- 基线 (Baseline)
- 阈值线 (Threshold)
- Ct值 (Cycle threshold)

基线

* 基线 (Baseline)：扩增曲线中的水平部分。



线性图谱

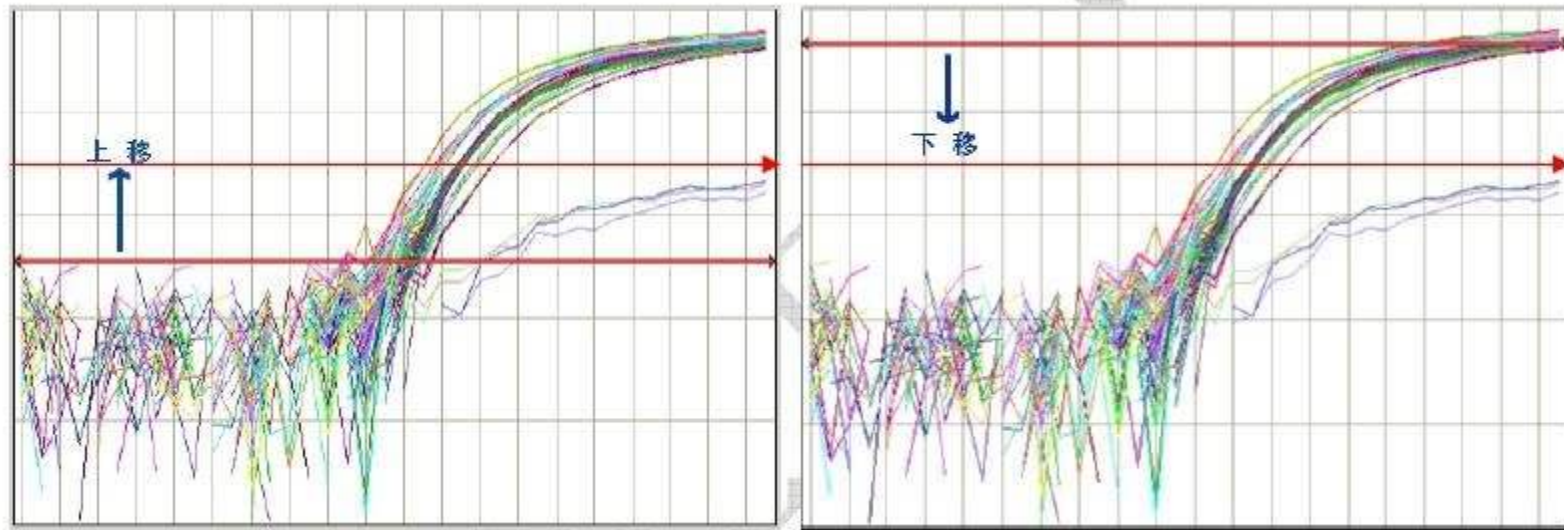


对数图谱

调整原则：如果Ct值 >18 ，不需调整，使用自动分析结果；
如果Ct值 <18 ，修改终点，再分析一次；
起点一般取3~6，终点一般取12~15。

阈值线

- * 阈值线 (Threshold)：荧光扩增曲线上人为设定的一个值，它可以设定在荧光信号指数扩增阶段任意位置上，但一般我们将荧光阈值的缺省设置是 3-15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。



手动调节阈值线的原则：要大于样本的荧光背景值和阴性对照的荧光最高值，同时要尽量选择进入指数期的最初阶段，真正的信号是荧光信号超过阈值。

Ct值

- * Ct (Cycle Threshold) 值：每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数被称为 Ct 值 (threshold value) 。
- * PCR扩增过程中，荧光信号开始由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环次数，是实时荧光定量PCR 判断阴、阳性和进行定量分析的依据。

四、结果报告的要点分析

- 报告的基本要求
- 报告结果：IU与拷贝的含义

报告的基本要求

- 检测结果的报告应准确、清晰和客观；
- 定性测定报告“阴性”或“阳性”，定量测定则以“拷贝数/ml”或“IU/ml”报告，避免二者之间的混淆；
- 每份报告应包括以下信息：标题、唯一标识、检测标本说明、标本特性和状态、标本接收日期和检测日期、检测方法、检测和审核人员签字及发出日期、参考结果或范围；
- 如对报告有效性有疑问，实验室应立即通知临床相关科室予以纠正；
- 病人要求用电话、传真或邮件报告结果时，注意保密性原则；

实验结果有效性判断标准

- * 标准曲线平滑均匀，相关系数、内参等参数的数值允许变化范围均应在试剂制造商推荐的范围内。
- * 阴、阳室内质控检测结果均处于在控状态。
- * 以上几项标准均达到要求后，当次实验有效，可以发放报告。否则，本次实验无效。

IU与拷贝

- IU (international units)：国际单位，其设立的主要目的是为测定提供一个通用的标准单位；WHO在经过统计学上的数据处理后，综合多中心多方法检测所得到的数据，主观的赋予候选标准物质一个数值，其表述单位为国际单位 (IU)；
- 拷贝 (copies)：是各公司采用各自方法标准物质时，对检测结果的表述单位；
- IU与拷贝的关系：由于方法学的差异，不同方法检测同一标准物质的结果有所差别，甚至相差几倍，我们可直观的理解为，这其中的倍数关系就是不同方法间拷贝与IU的转换关系。

五、临床基因扩增检验技术在性病 实验诊断中的应用

常见性传播疾病病原体

淋球菌（NGH）

沙眼衣原体（CT）

解脲脲原体（UU）

梅毒螺旋体（TP）

单纯疱疹病毒（HSV）

乳头瘤病毒（HPV）

人类免疫缺陷病毒（HIV）

标本采集、存放及运输

样本采集、存放及运输

1. **采集:** 采集生殖道拭子标本，要求病人在采样前 2 小时内不能排尿。
 - 1.1. 男性：先清洁尿道口，将棉拭子伸入男性尿道 1cm，旋转 3—5 次获得标本，将取样后的棉拭子放入 1.0ml 无菌生理盐水中漂洗片刻，在壁上挤干后丢弃。
 - 1.2. 女性：先用棉/麻拭子将宫颈口过多的分泌物擦去，用扩阴器扩阴，再换取样棉拭子伸入宫颈，通过上皮交界处，直到看不到拭子头，旋转 10—20 秒，取出拭子，别碰到阴道的鳞状上皮，以**保证取到更多的柱状上皮标本**，将取样后的棉拭子放入 1.0ml 无菌生理盐水中漂洗片刻，在壁上挤干后丢弃。
2. **存放:**

待测样本在 2-8℃ 保存不应超过 24 小时；-20℃ 保存不超过三个月；-70℃ 以下长期保存。应避免反复冻融。
3. 运输：

采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

质量控制

- * 对于常规开展的项目应该定期进行室内质量控制。
- * 定量与定性

临床“假阳性”问题

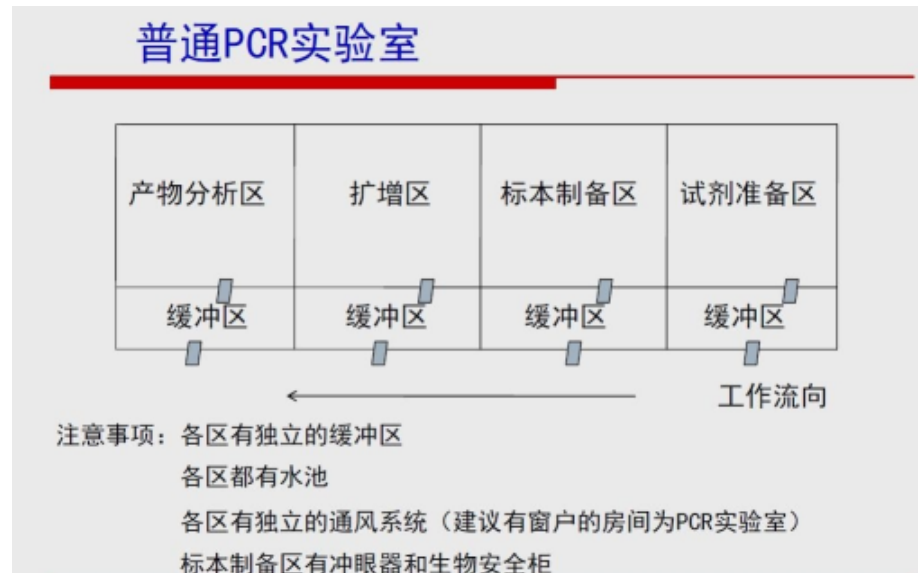
- * 病原微生物如淋球菌等经药物治疗后已死亡，但PCR仍可为阳性，故治疗结束后至少两周内不宜做PCR检测。

检验报告的问题

- * 定性项目不能发定量报告 分泌物（拭子）样本

六、临床基因扩增检验管理要求

- * [医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法.doc](#)
- * [医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则.doc](#)



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/885043214143011320>