

荧光定量 PCR 技术基本原理与实验策略的研究

历曼嘉

中国医科大学, 辽宁 沈阳 110122

摘要: 荧光定量 PCR 技术作为一种重要的分子生物学工具, 近年来在生物医学研究、疾病诊断、病原体检测及遗传学研究等领域得到了广泛应用。本文综述了荧光定量 PCR 技术的基本原理, 包括其基于 DNA 扩增的指数增长特性以及荧光信号的实时监测方法。进一步探讨了该技术在不同应用场景下的具体应用案例, 如病原体载量的快速测定、基因突变筛查及基因表达水平的定量分析。通过对比传统 PCR 方法, 强调了荧光定量 PCR 在灵敏度、特异性和定量准确性方面的显著优势。此外, 还讨论了影响荧光定量 PCR 结果准确性的关键因素, 并提出了优化实验条件的策略。本研究旨在为相关领域的研究人员和临床工作者提供一个全面了解荧光定量 PCR 技术的平台, 促进其在更多领域内的深入应用与发展。

关键词: 荧光定量; PCR; 技术

DOI: 10.63887/fns.2025.1.1.14

引言

在 HBV 感染人体时, 它的遗传物质 DNA 会首先进入到人体细胞中。所以如果我们能检测出体内的 HBV-DNA 含量, 那么我们就可以判断是否感染 HBV。想检测 DNA, 可以先用 PCR 技术扩增, 然后把扩增后的 DNA 进行凝胶电泳检测, 把结果与对照组进行对照, 就可以判断是否感染。但这种常规 pcr 有一个弊端, 我们在实验课上都做过这个实验, 耗时很长。那么有没有更高效, 更快捷的方式, 能应用到临床上对病原体感染的检验呢? 答案是肯定的。让我们一起来看看实时和荧光两个词的含义。

“实时”意味着我们能够在 PCR 反应进行的过程中, 实时监测反应的进程; “荧光”则是利用荧光信号来指示 PCR 产物的数量变化^[1]。这两个特点的结合, 使得荧光定量 PCR 技术与普通 PCR 技术相比, 具有了独特的优势。实时荧光定量 PCR 技术通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时监测, 从而实现对起始模板的定量分析, 这一创新让核酸检测进入了一个全新的阶段。

在荧光定量 PCR 反应的第一步和第二步, 与普通 PCR 是完全相同的。第一步是高温变性, 在 94℃-96℃ 的高温条件下, 双链 DNA 解旋成为两条单链, 这一过程破坏了 DNA 双链之间的氢键, 就像将紧密缠绕的绳子解开一样, 为后续的反应做好准备。第二步是低温退火, 温度降至 55℃-65℃, 引物与单链 DNA 模板按照碱基互补配对原则特异性结合。引物是一段人工合成的短单链 DNA, 其序列与目标 DNA 两端的序列互补, 就如同“导航员”, 引导 DNA 聚合酶找到需要复制的起始位置^[2]。

到了第三步, 荧光定量 PCR 展现出了与普通 PCR 的关键区别。除了引物, 在 DNA 单链上还结合了一个特殊的分子——荧光探针。荧光探针和荧光染料都能够与模板 DNA 互补, 并结合到模板 DNA 上, 它们的作用是指示扩增产物的增加情况。其中, 荧光探针主要有 TaqMan 探针、分子信标、FRET 探针等类型, 荧光染料主要有 SYBR Green 等。接下来, 我们着重深入了解一下 TaqMan 探针是如何发挥作用的。

TaqMan 探针的结构非常巧妙，它的 5' 端连接着一个荧光报告基团，我们简称为 r 基团，这个基团能够发出荧光信号；3' 端则连接着一个荧光猝灭基团，它的作用是猝灭 5' 端发射的荧光。在 TaqMan 探针保持完整状态时，r 基团发出的荧光信号会被 q 基团吸收，就像光被黑洞吞噬一样，我们无法检测到荧光信号。但是，当反应进入第四步，也就是延伸阶段时，情况发生了变化。新链会从 5' 端向 3' 端延伸，DNA 聚合酶在沿着模板 DNA 合成新链的过程中，一旦识别到与模板 DNA 结合的 TaqMan 探针，它的 5' -3' 外切酶活性就会发挥作用。DNA 聚合酶就像一个“分子剪刀”，将处在 DNA 5' 端连有 r 基团的核苷酸水解下来。这样一来，r 基团和 q 基团分离，猝灭基团失去了对荧光报告基团的抑制作用，荧光探针便能够发出荧光。

以 HBV-DNA 检测为例，每一个 HBV-DNA 分子就好比一个“敌人的堡垒”，而每一个 TaqMan 探针就像是潜伏在堡垒附近的“信号兵”。当 PCR 反应启动，每复制一次 HBV-DNA，对应的 TaqMan 探针就会被 DNA 聚合酶“激活”，释放出荧光信号，如同发射出一个信号弹。随着 PCR 循环次数的不断增加，目的基因片段会呈指数规律增长。从数学角度来看，假设起始模板数量为 N_0 ，经过 n 次循环后，理论上的 PCR 产物数量 $N=N_0 \times 2^n$ ，而荧光信号强度也会呈指数规律增长，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。在整个反应过程中，通过连接着反应体系的电脑，我们可以实时监控荧光信号的变化情况。随着反应的进行，最终我们会在电脑屏幕上看到一条 S 型曲线^[3]。这条 S 型曲线具有重要的生物学意义，它代表着样本中存在目标基因，也就意味着 HBV 感染阳性。曲线的起点（即荧光信号开始显著增强的循环数，Ct 值）与起始模板的数量密切相关，起始模板量越多，Ct 值越

小，反之则越大，通过标准曲线，我们还能够准确计算出样本中 HBV-DNA 的具体含量。

为了让大家对荧光定量 PCR 技术的优势有更直观的认识，我们来看一些相关的实验数据和文献研究。有一项针对荧光定量 PCR 和普通 PCR 的 HBV-DNA 检出率对比实验，研究人员选取了 200 份疑似 HBV 感染的临床样本，分别采用两种方法进行检测。结果显示，普通定性 PCR 检测出 HBV-DNA 阳性样本 85 份，而荧光定量 PCR 检测出阳性样本 112 份，且能够精确测定每份样本中病毒 DNA 的拷贝数。这一结果与我们前面所讨论的荧光定量 PCR 技术的原理和优势是完全相符的。普通 PCR 只能通过凝胶电泳检测是否存在目标 DNA，无法对其进行定量分析，且检测灵敏度相对较低，容易出现漏检情况；而荧光定量 PCR 不仅能够检测到目标 DNA 的存在，还能够对其进行高精度的定量分析，检测的灵敏度和准确性都大大提高。

在动物学研究中，该技术可以用于监测动物疫病的发生和传播。比如，在禽流感疫情防控中，科研人员可以利用荧光定量 PCR 技术快速检测禽类样本中是否携带禽流感病毒，并准确测定病毒的含量。通过对不同地区、不同禽类群体的定期监测，能够及时发现病毒的变异情况和传播趋势，从而及时采取有效的防控措施，防止疫情的扩散。

除了在病原体检测和疾病诊断方面的应用，荧光定量 PCR 技术在其他领域也有着广阔的发展前景。在分子生物学基础研究中，它可以用于基因表达分析，帮助科研人员了解不同基因在细胞生长、发育、分化等过程中的表达调控机制。例如，在研究胚胎发育过程中，通过荧光定量 PCR 技术检测不同阶段关键基因的表达水平，能够揭示胚胎发育的分子机制。在干细胞研究中，检测干细胞分化过程中特定基因的表达变化，有助于了解干细胞的分化路径和调控网络^[4]。

在农业领域,该技术可用于转基因作物的检测,确保转基因产品的安全性和合规性。随着转基因技术在农业中的广泛应用,对转基因作物的检测变得尤为重要。荧光定量 PCR 技术能够准确检测转基因作物中特定外源基因的存在及其拷贝数,判断转基因成分是否符合相关标准^[5]。

在法医学领域,荧光定量 PCR 技术能够对微量生物样本进行 DNA 分析,为案件侦破提供有力的证据支持。在一些犯罪现场,可能遗留的生物样本非常微量,如血迹、毛发、皮屑等,传统的检测方法难以准确分析。而荧光定量 PCR 技术凭借其高灵敏度和特异性,能够从这些微量样本中扩增出足够的 DNA 进行分析,通过与嫌疑人的 DNA 样本进行比对,为案件侦破提供关键线索。

随着科学技术的不断发展,荧光定量 PCR 技术也在持续改进和创新。一方面,新的荧光探针和荧光染料不断被研发出来,这些新型探针和染料具有更高的灵敏度、更强的特异性和更稳定的性能,能够进一步提高检测的准确性和可靠性。例如,一些新型的荧光探针采用了特殊的化学修饰,能够降低背景荧光信号,提高检测的信噪比;新型荧光染料具有更宽的激发和发射光谱范围,可以实现多重荧光检测,在一个反应体系中同时检测多个目标基因。

另一方面,仪器设备也在不断升级,反应速度更快、通量更高、操作更简便的荧光定量 PCR 仪相继问世,使得大规模、高通量的检测成为可能。现代的荧光定量 PCR 仪普遍采用了微流控技术,能够在微小的芯片上实现多个独立的 PCR 反应,大大减少试剂用量,提高反应效率,并且便于实现自动化检测。同时,仪器的软件系统也更加智能化,能够自动分析数据、生成报告,降低了操作人员的工作强度和人为误差。

同时,荧光定量 PCR 技术与其他技术的结合也日益紧密。例如,与微流控技术相结合,

能够实现芯片上的 PCR 反应,将整个 PCR 反应体系集成在一个微小的芯片上,不仅减少了试剂用量,还提高了反应的均一性和稳定性,便于实现自动化和高通量检测。与二代测序技术相结合,可以对 PCR 产物进行深度测序分析,获取更丰富的基因信息,为疾病的精准诊断和个性化治疗提供更全面的数据支持。通过二代测序,可以检测到 PCR 产物中的基因突变、基因重排等信息,这对于肿瘤的精准分型和靶向治疗具有重要意义。

然而,尽管荧光定量 PCR 技术具有诸多优势,但在实际应用中 also 面临着一些挑战和问题。首先,该技术对实验环境和操作人员的要求较高,需要严格的实验室条件和专业的技术人员进行操作,以避免实验过程中的污染,保证检测结果的准确性。实验室需要配备专门的 PCR 实验室分区,包括试剂准备区、样本处理区、扩增区和产物分析区,每个区域之间需要严格隔离,防止交叉污染。操作人员需要经过专业培训,熟练掌握实验操作技能和质量控制要点,任何一个环节的失误都可能导致检测结果的偏差。

其次,荧光定量 PCR 技术的检测成本相对较高,包括试剂、仪器设备的购置和维护等方面,这在一定程度上限制了其在一些资源有限地区的广泛应用。荧光定量 PCR 试剂中,荧光探针和特殊的酶等关键试剂价格昂贵,且一次实验需要消耗一定量的试剂;仪器设备的购置成本也较高,后期的维护和校准也需要投入一定的费用。这对于一些经济欠发达地区的医疗机构和实验室来说,开展荧光定量 PCR 检测存在一定的经济压力。

为应对这些挑战,科研人员和相关机构正在积极开展研究和探索。一方面,不断优化实验流程和操作规范,开发更加简便、快捷、低成本的检测方法和试剂,降低技术门槛,提高检测的可及性。例如,一些科研团队正在研发基于等温扩增技术的荧光定量检测方法,该方

法不需要复杂的温度循环,能够在恒温条件下实现核酸的快速扩增,具有操作简便、反应速度快等优点,有望应用于基层医疗机构和现场检测。同时,通过优化试剂配方,降低荧光定量 PCR 试剂的成本,提高其性价比。

另一方面,加强国际间的合作与交流,共同制定统一的检测标准和质量控制体系,提高检测结果的可比性和可信度。世界卫生组织(WHO)等国际组织正在推动建立全球统一的核酸检测标准,规范荧光定量 PCR 技术的操作流程和质量控制要点。各国科研机构和企业也在积极参与相关标准的制定和完善工作,

通过共同努力,提高荧光定量 PCR 技术的标准化水平。

结束语

综上所述,荧光定量 PCR 技术作为一种先进的分子生物学检测技术,在病原体检测、疾病诊断、科学研究等多个领域发挥着重要作用。尽管它在发展过程中面临着一些挑战,但随着技术的不断创新和完善,相信在未来,荧光定量 PCR 技术将为人类的健康和科学研究做出更大的贡献,为我们揭开更多生命科学的奥秘,为疾病的预防、诊断和治疗带来更多的希望和突破。

参考文献

- [1]张鑫,周辰刚.实时荧光定量 PCR 检测不同结核标本及其联合玻璃珠磨菌法检测的价值[J].临床和实验医学杂志,2024,23(6):637-641.
- [2]郑焕英,张官婷,柯碧霞,等.新型冠状病毒荧光定量 PCR 的 Ct 值与病毒分离的结果分析[J].病毒学报,2023,39(1):199-205.
- [3]徐媛媛,于永翔,王印庚,等.5 种主要海水养殖病原菌多重微流控荧光定量 PCR 快速检测技术的建立[J].渔业科学进展,2023,44(3):222-234.
- [4]朱悦,祁晶晶,武梦思,等.TaqMan 荧光定量 PCR 检测滑液囊支原体方法的建立及其感染鸡血液内载量测定[J].微生物学通报,2024,51(9):48-57.
- [5]张宝堂,肖洁,马晓君,等.荧光定量 PCR(qPCR)检测"漂浮型"浒苔微观繁殖体[J].海洋科学进展,2024,43(1):188.