

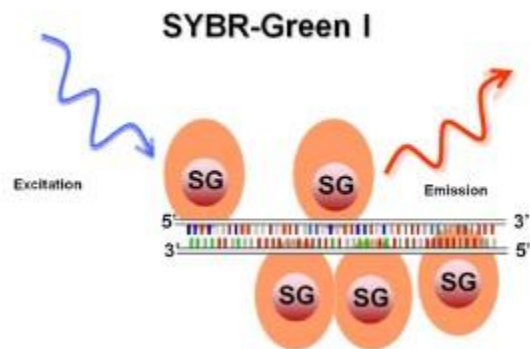
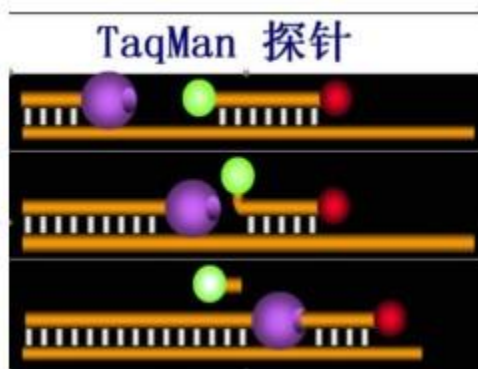
## 荧光定量 PCR 方法之如何选择

### ——探针法优于染料法

荧光定量 PCR 又称 qPCR，是一项非常常见的分子生物学实验技术。荧光定量 PCR 荧光为基础对核酸进行定量分析，其应用非常广泛，可以用于检测基因的表达量（RNA 的丰度），验证表达谱芯片或转录组测序的数据，确定病原体的载量，对片段的拷贝数（CNV）进行分析，对基因进行分型等等。

大部分研究者主要的应用是对基因的表达量进行测定，其原理为通过监控反应体系中荧光强度的变化，记录检测荧光达到阈值时的循环数（Ct 值）。从理论上说，起始模板量和 Ct 值密切相关，因此我们通过判读 Ct 值从而对样本进行定量。

在进行荧光定量 PCR 时，从技术和产品来说，我们往往会有许多选择，尤其是方法的选择，对最终结果的准确性至关重要。荧光定量 PCR 从方法上来说可以分为染料法和探针法两种。



### 染料法

在国内，染料法一般采用 DNA 染料 SYBRGreen I，染料法使用简单，成本也相对较低，因此会有很多国内研究者会选择使用染料法进行后续实验。在染料法荧光定量 PCR 实验中，染料能够与双链结合，从而发光，而在游离状态下，SYBR Green I 发出微弱的荧光。所以，一个反应发出的全部荧光信号与出线的双链 DNA 量呈比列，且会随扩增产物的增加而增加。

但是染料法检测的是体系中的所有双链 DNA，因此一些非特异性扩增或者引物二聚体的出现，会极大的影响真实结果的准确性。为此，一些厂商提供 ROX 作为内部荧光参考标准，用来校正背景，但是即便如此，染料法特异性的问题依旧无法与探针法相比。另外染料法无法在同一个反应中检测多个目的片段，对于复杂序列，如果难以扩增的话，也会受到脱靶效应（如引物二聚体）的影响。在这种情况下，就需要在实验前期进行熔解曲线分析，判断扩增所得产物是否只有一种。

### TaqMan 探针法

TaqMan 探针法 PCR 扩增时，在加入一对扩增引物的同时再加入一个特异性的荧光探针。Taqman 探针为一段线性的寡核苷酸，两端分别标记一个荧光报告基团（FAM 或 Hex 等）和一个荧光淬灭基团，当探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收，PCR 仪检测不到荧光信号；当 PCR 扩增时（在延伸阶段），Taq 酶的 5' -3' 外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步，这也就是探针法定量的原理。

探针法与染料法的最大区别在于，理论上探针法中的荧光信号只来源于目标序列，也就是不受非特异性扩增及引物二聚体的影响。除此之外，人们还可以利用不同探针，在一个体系中使用不同的荧光标记同时检测多种指标，达到节省实验成本的目的。在样本量比较大的情况下，成本甚至可以低于染料法。

因此我们可以看到，在选择荧光定量实验时，探针法在特异性和准确性方面远远优于廉价的染料法，但在实际使用时，TaqMan 探针高昂的价格常常让人望而却步。目前，上海捷瑞生物工程有限公司在强大的探针合成能力的前提下，推出了探针法荧光定量 PCR 服务，以染料法的价格，享受探针法的服务，在相同的经费情况下，提高实验的准确性和特异性。