

Real-Time PCR 的原理與應用

張惠如

2015/10/20

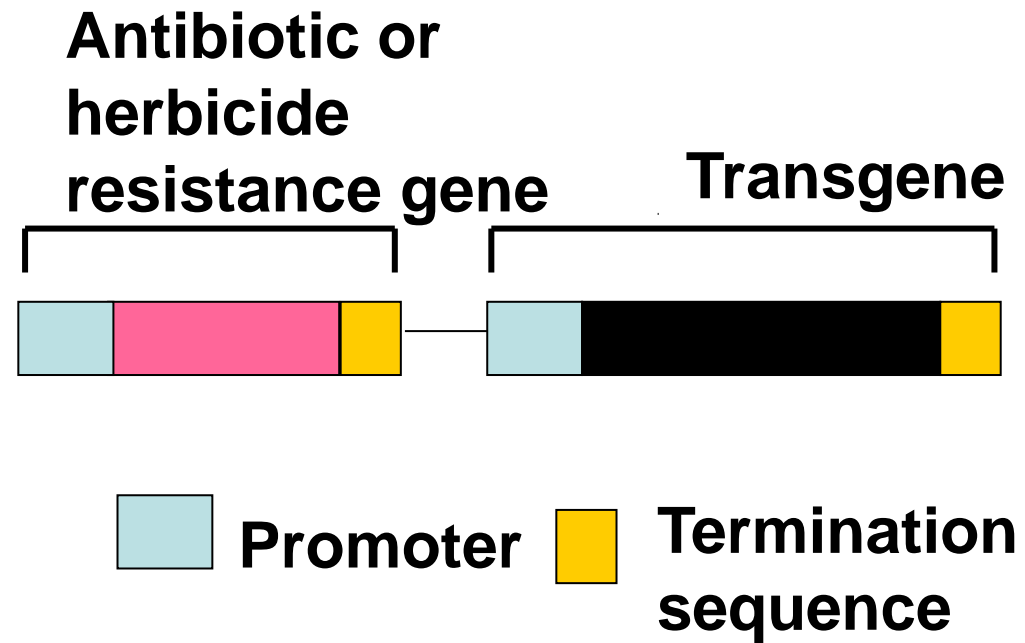
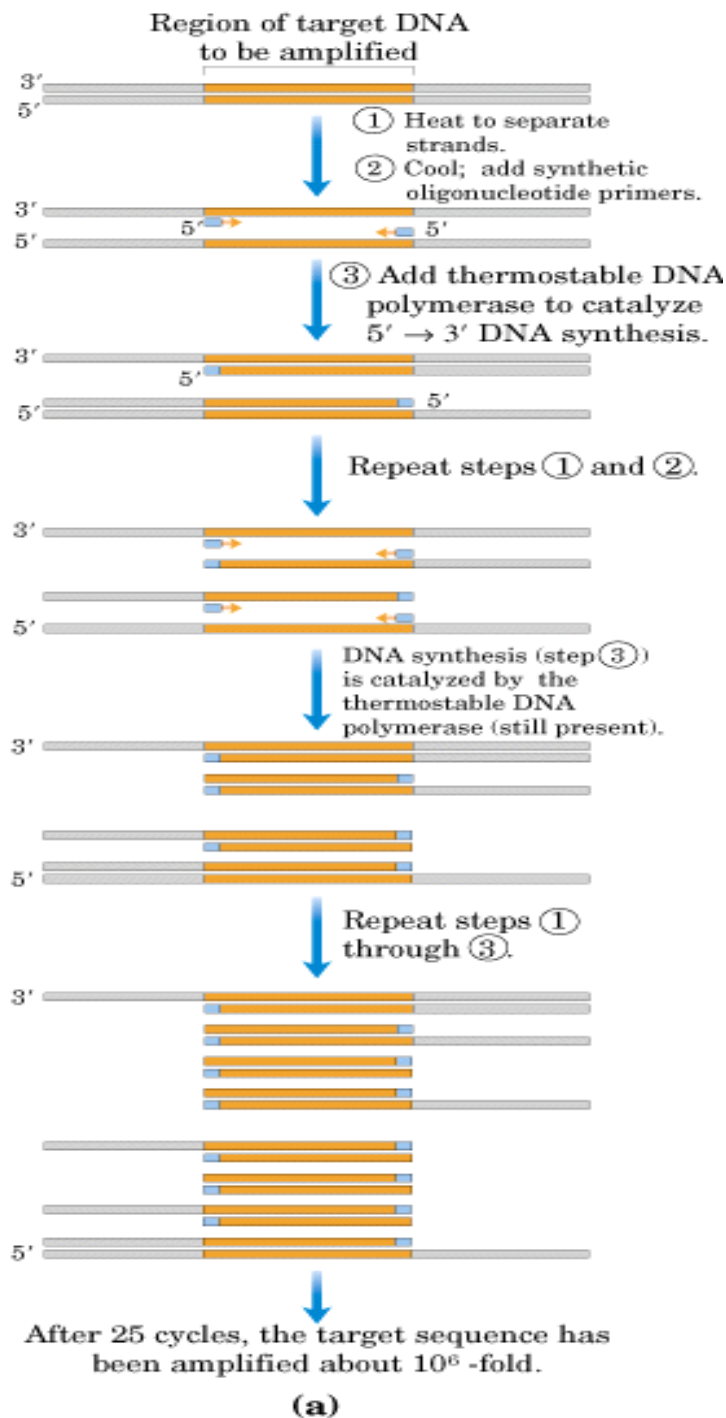
前言

- 轉基因植物 DNA 分析，主要是為了偵測轉殖基因是否存在轉基因植物染色體中，及分析轉殖基因在植物染色體中形成多少個插入數
- 最常用的技術有聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 和南方雜合分析法 (Southern hybridization) 兩種技術。

前言

- PCR 技術是利用針對轉殖基因設計好的專一性引子對 (specific primers)，增幅染色體內的目標轉殖基因
- 經過模板雙股 DNA 分離 (denature)、引子對黏合 (annealing)、DNA 合成 (synthesis) 的步驟，並重複30~40個循環的反應，利用瓊脂膠體電泳 (agarose gel electrophoresis) 觀察所增幅的 DNA 片段。

PCR之原理



PCR之優點

- 可進行大量偵測
- 較高之特異性及靈敏度
- 多種轉殖基因之偵測為可行
- 可檢驗之產品形式較多
- DNA純化方法不因檢測項目不同而有所差異，因此在樣品的前處理上較為一致
- 操作簡易較能系統化

PCR之限制

- 純化DNA程序較為複雜 (相較於ELISA)
- 產品成分不含DNA者不適之，如沙拉油、純化之大豆卵磷脂、澱粉抽出物等產品，另外加工程序可能破壞DNA，如高溫、酵素水解使結果呈偽陽性如醬油、麵包
- 根據歐盟實驗室經驗，純化DNA長度若短於400 bp，結果呈偽陽性
- CaMV 35S promoter、NOS、nptII序列會自然存在於食品中，所以其檢驗不能斷定有重組DNA的存在
- 樣品與試劑的污染，包括樣品的交互污染或之前PCR分析的殘留，會有偽陽性的結果

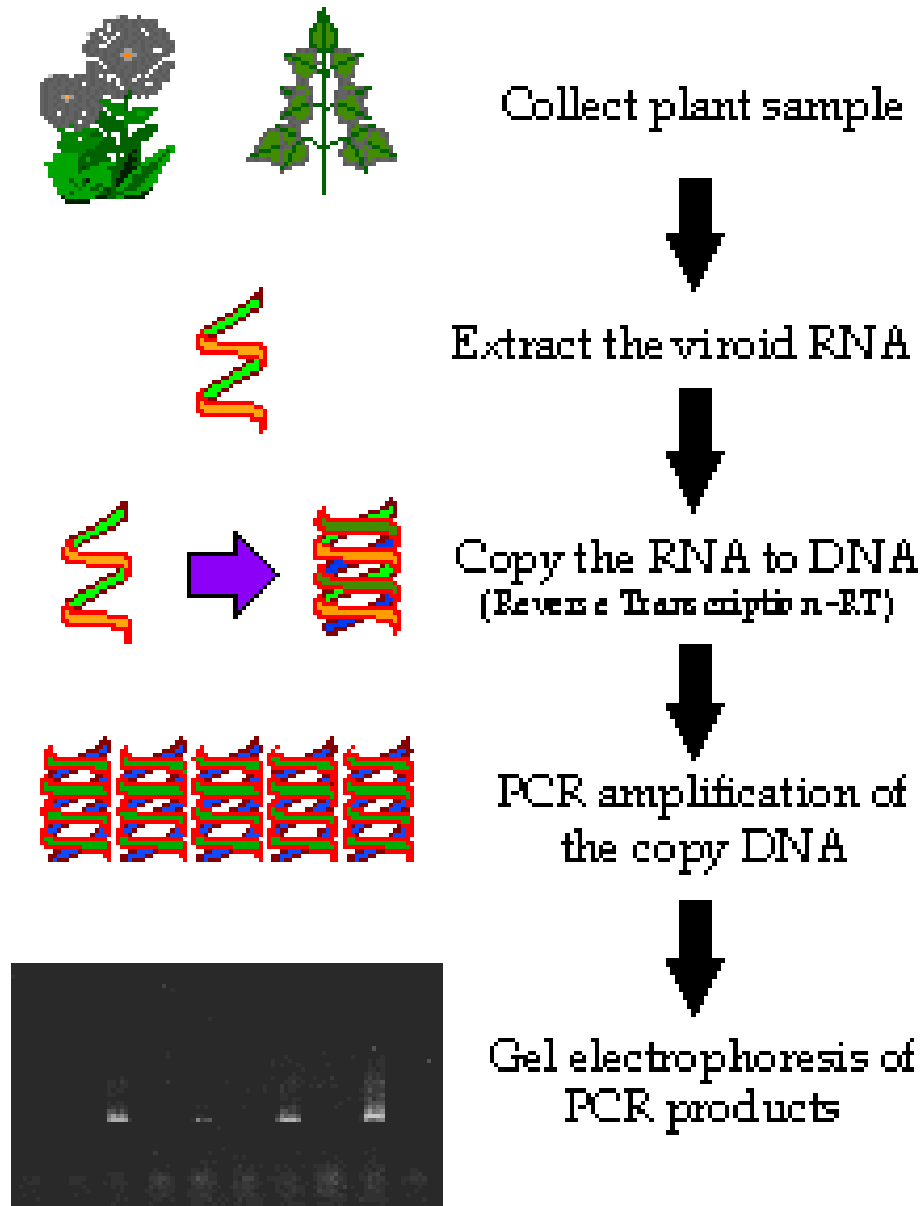
前言

- 針對轉基因植物的 RNA 進行分析，主要目的是分析轉殖基因在轉基因植物體內是否表現及表現的量如何
- 常用的分析技術包括反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 及北方雜合分析法 (northern hybridization) 兩種技術。

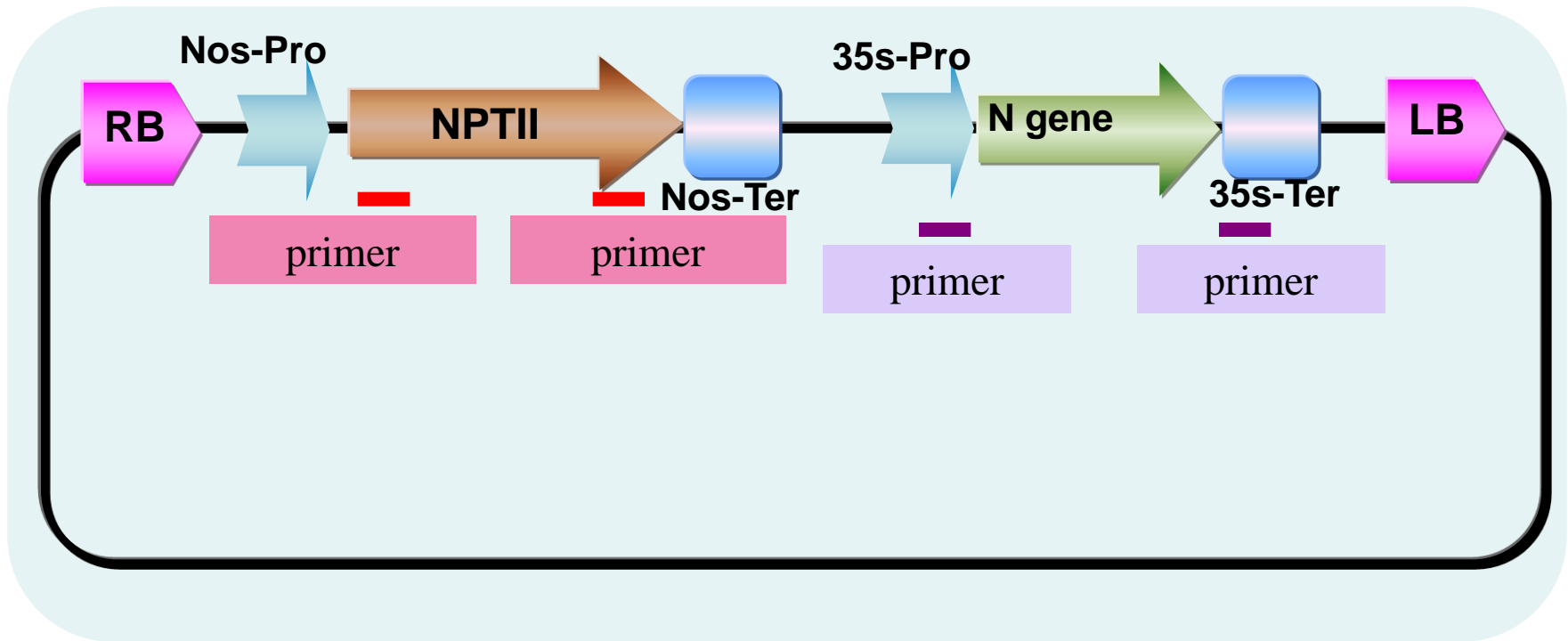
前言

- RT-PCR 與 PCR 原理類似，同樣是用來增幅特定的核酸片段，差別在於 RT-PCR 較 PCR 在增幅前多了一個反轉錄 (reverse transcription) 的步驟
- 利用反轉錄酶 (reverse transcriptase, RNA-dependent DNA polymerase) 的特性，使 RNA 在反轉錄的過程中先被反轉錄成互補股 DNA (complement DNA, cDNA)，cDNA 在接下來的 PCR 過程中再被大量增幅
- RT-PCR 除了具有與 PCR 相同的優缺點外，當基因表現的量少或是總量 RNA (total RNA) 純化的效率太差時，都可能導致偽陰性結果的發生。

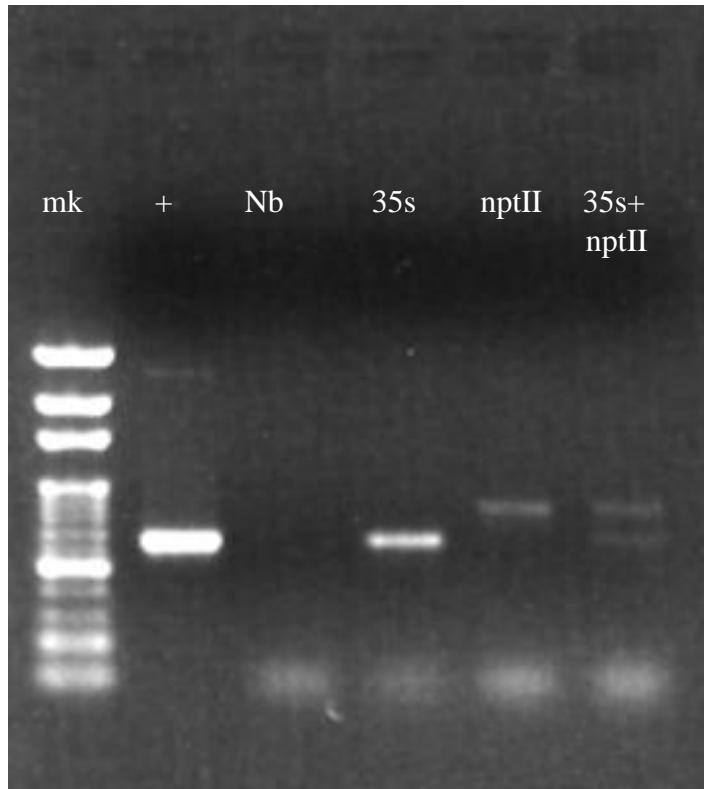
THE RT-PCR STEPS



Detection target



PCR Product Detection



反應後所得產物，以含0.8% Ethidium bromide的agarose gel電泳，配合適當的DNA marker，來觀察是否得到正確的產物。

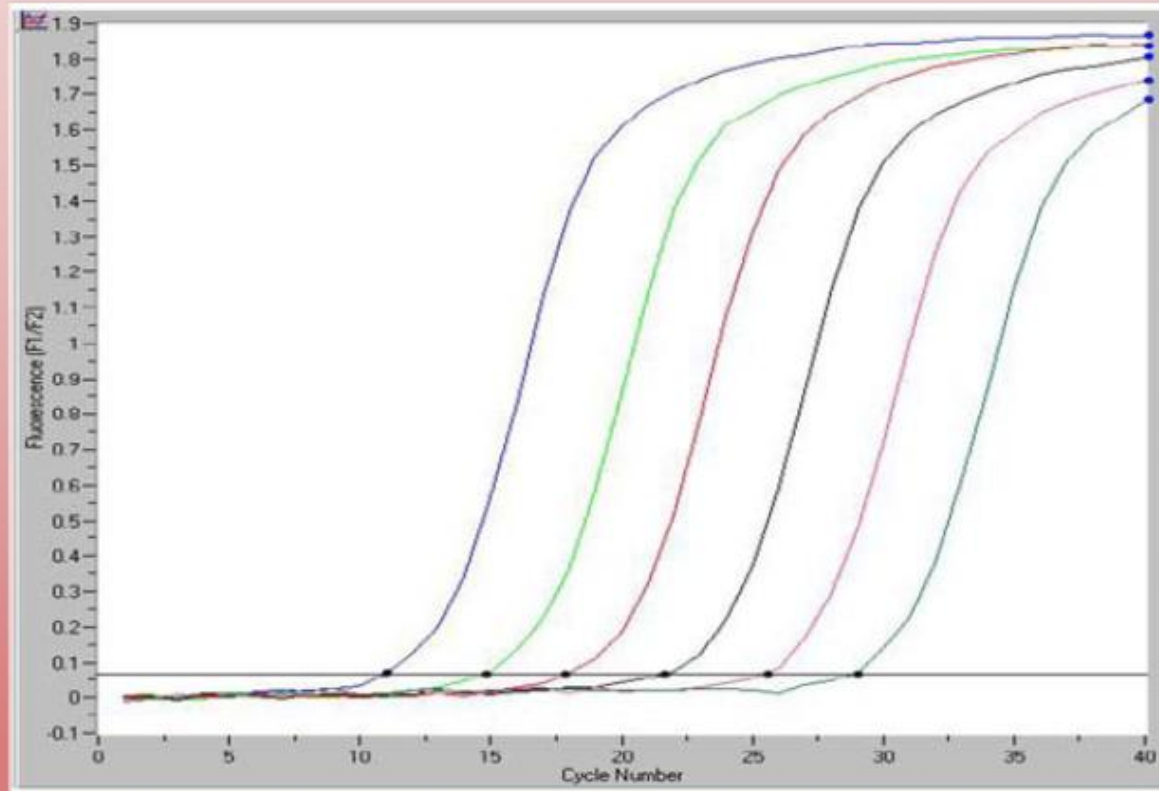
Real time PCR(Q-PCR)

- Real-time PCR 或稱Quantitative PCR (Q-PCR)是一種藉著PCR操作協助定量DNA or RNA (進行RT-PCR) 濃度的方法。
- Real-time PCR跟傳統PCR不同之處在於前者可經由光學系統去監測反應中產物量(螢光物質)的變化而反應在電腦上，後者則必須等反應結束後再進行洋菜膠體電泳分析。
- 目前Real-time PCR螢光系統可大致分為「非探針型」及「探針型」。

Real-Time PCR

基本原理：

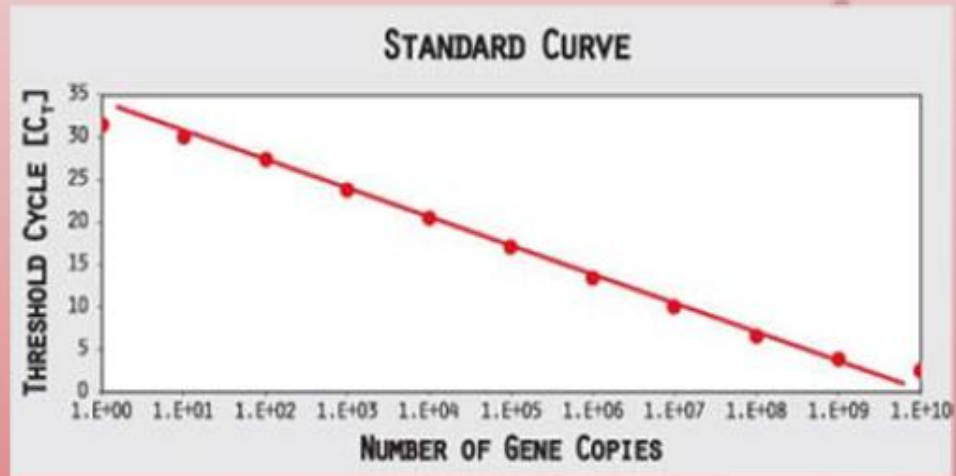
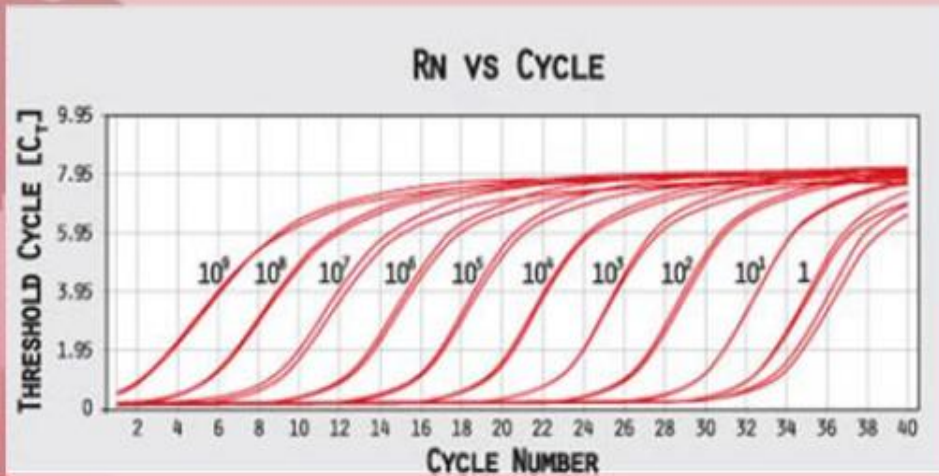
隨著PCR反應循環逐次增加時，目標DNA也隨之快速增幅，此時PCR反應液反應中之特定的螢光物質可與目標DNA結合而產生螢光，經由儀器偵測後即時將訊號資料呈現並計算。



基本原理：

目標 DNA 起始的量愈多，其螢光值愈早達到偵測之閾值 (Threshold)，此時所對應的循環數 (cycle) 稱之為 Ct 值。因此，目標 DNA 的濃度與 Ct 值成反比關係。

依據連續稀釋標準樣品的 Ct 值及已知濃度，可得標準曲線，根據此標準曲線可以推算樣品的起始濃度，達到定量測試之目的。



Real-Time PCR的應用：

1. 絕對定量 (Absolute Quantification)
2. 相對定量 (Relative Quantification)
3. 基因型鑑定 (SNP genotyping)
4. 微小RNA偵測及定量

Real time PCR 類型

- 「非探針型」的系統就是在反應中加入會與雙股DNA嵌合而釋放出螢光的物質，目前最常被使用的螢光染劑是 SYBR-green I，這種物質會嵌入在雙股DNA的小凹槽(minor groove)而釋放出可被偵測的螢光，所以當PCR產物越多時，嵌入的SYBR-green I就越多，釋放出的螢光也就越多。
- 「探針型」系統相對上就較為複雜，反應中除了要有專一性的引子對之外，另外還要在引子對之間DNA序列中找到具有專一性的片段來作為探針，如果不是目標序列來做偵測，探針就不會雜合到核酸上，之後也就不會釋放出螢光而被偵測到，所以「探針型」系統的專一性也就相對比較高。主要又分為Hydrolysis probe (TaqMan system) & Molecular Beacon

Real-time PCR

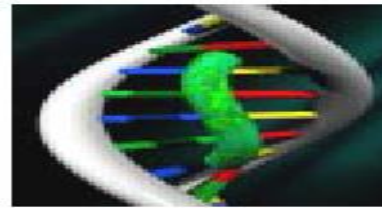
→ Detection of PCR products using fluorescent

TaqMan



5' nuclease oligoprobes

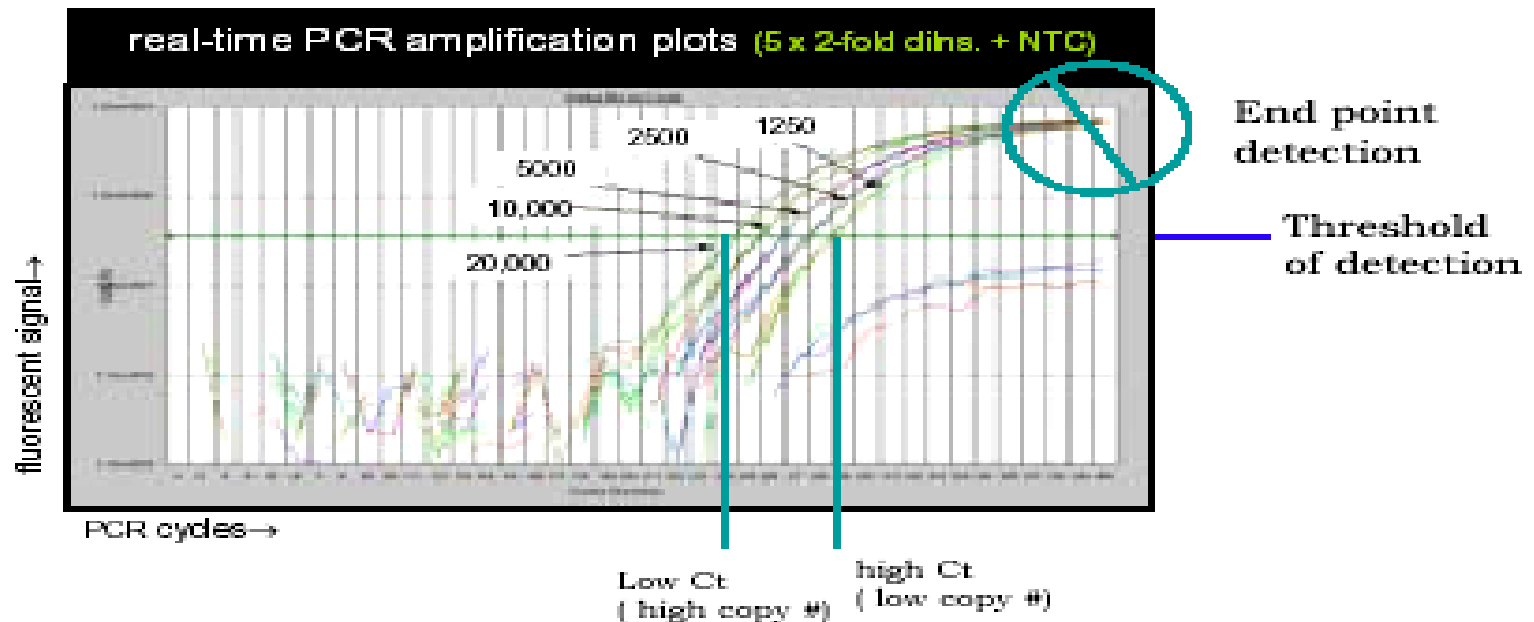
SYBR Green I



DNA-binding agents

principle of quantitative real-time PCR...

use *when* rather than *how much*

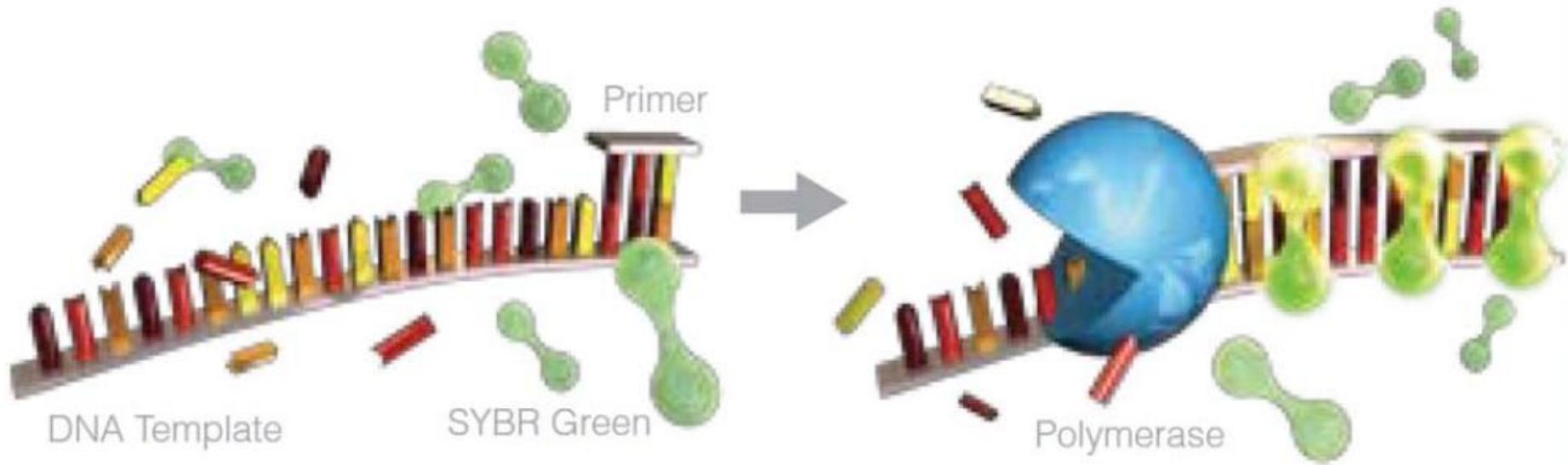


C_T = threshold cycle:

the calculated fractional cycle number at which the PCR product crosses a threshold of detection

SYBR Green dye

a highly specific, double-stranded DNA binding dye, to detect PCR product as it accumulates during PCR cycles.



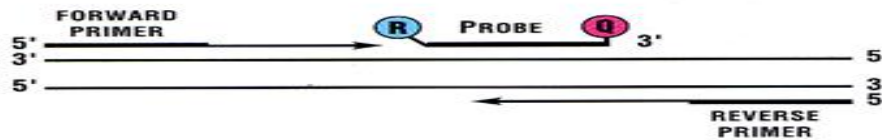
優點：不需額外合成特殊引子，方法簡單成本低，可作melting curve分析。

缺點：若PCR過程中有或有primer dimer或有非專一性PCR產物均會影響判讀。

TaqMan[®]

Fluorogenic 5' nuclease chemistry

1. *Polymerization: A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends respectively, of a TaqMan[®] probe.*



5' -- Reporter(R)
3' -- Quencher(Q)

2. *Strand displacement: When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.*



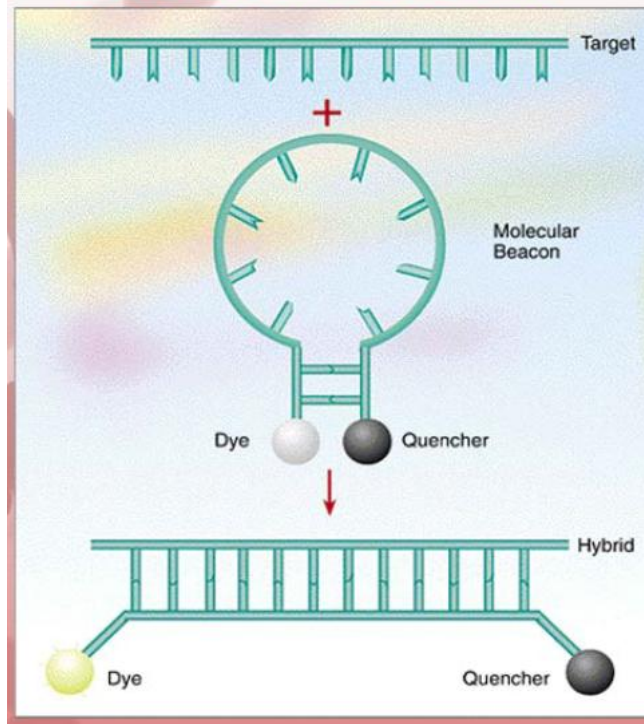
3. *Cleavage: During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.*



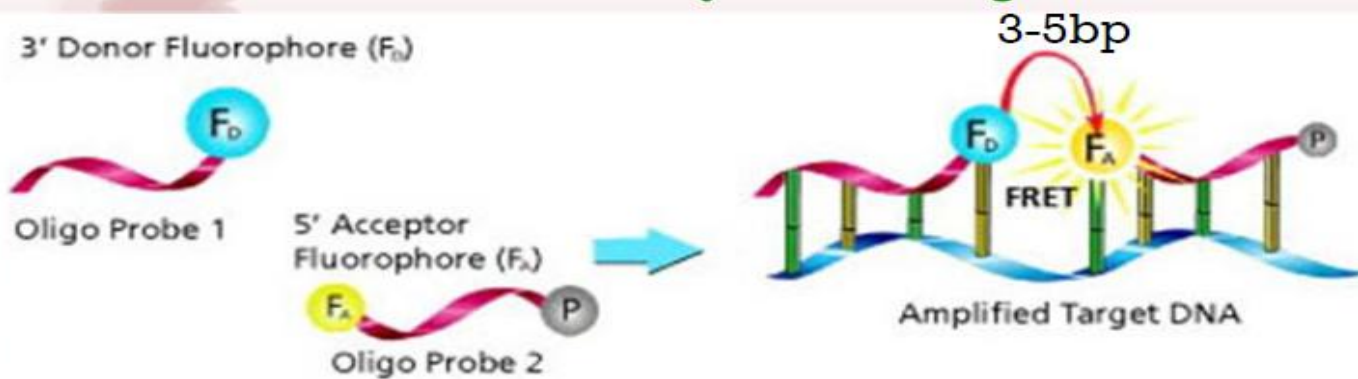
4. *Polymerization completed: Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.*



Molecular beacons



FRET-Dual labeled probe-hybridization probe

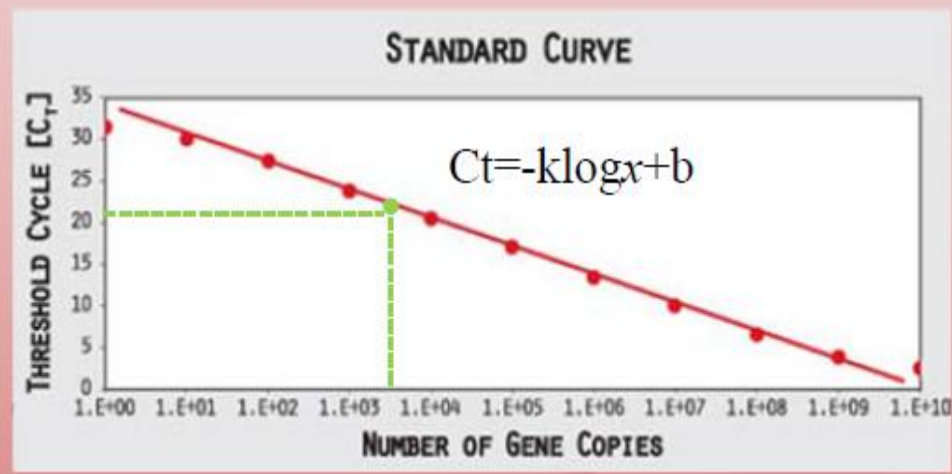
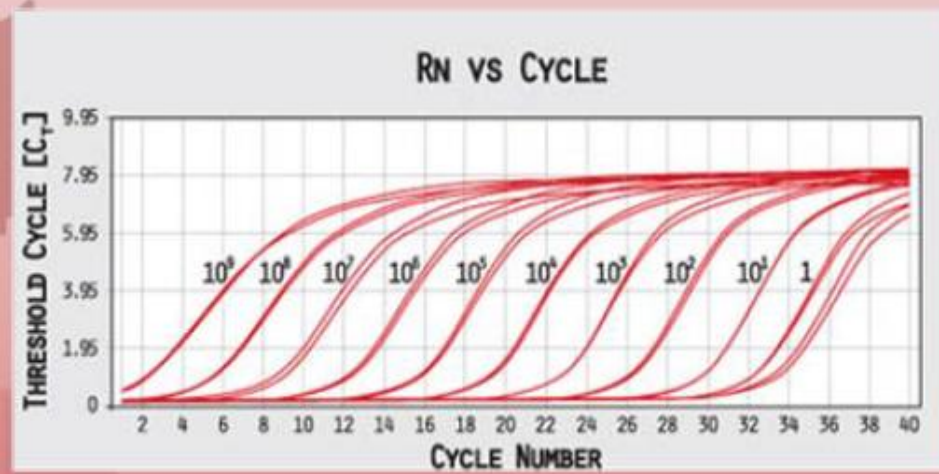


1. Probes in solution emit low fluorescence

2. Emission through fluorescence resonance energy transfer

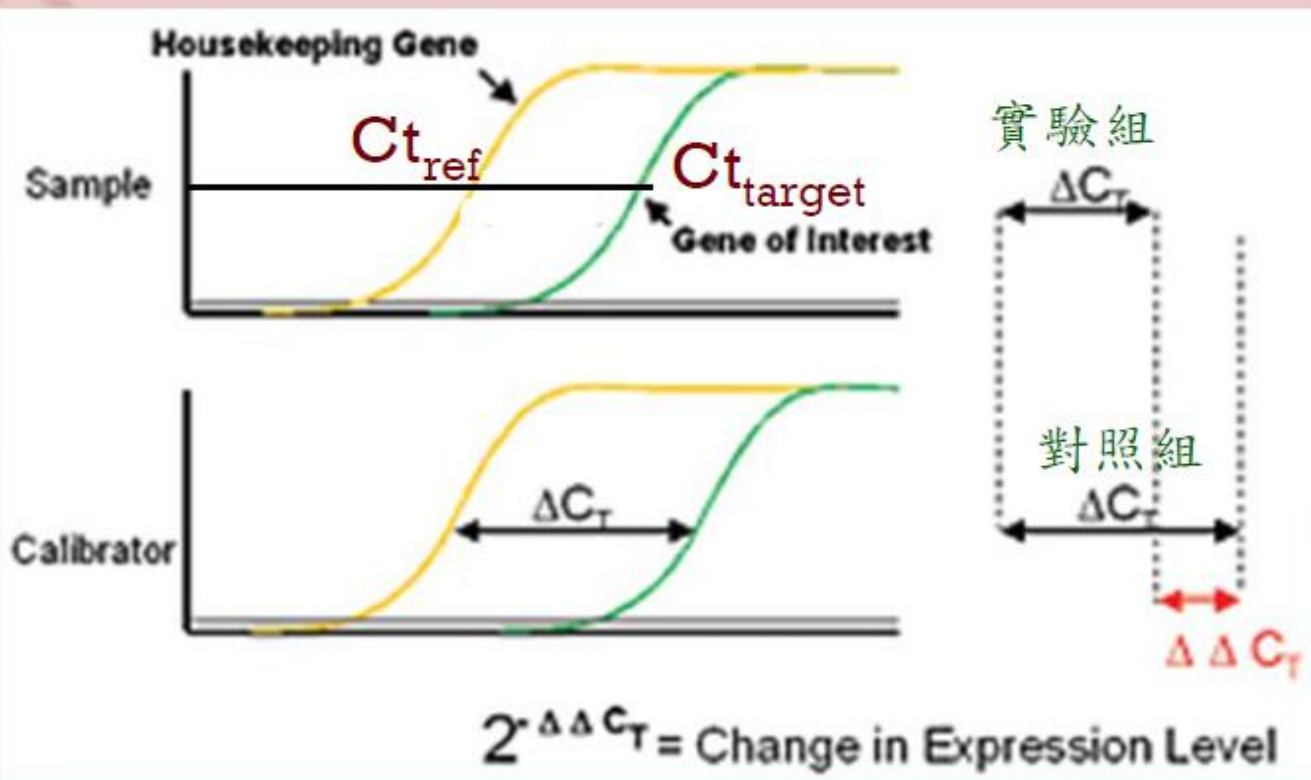
絕對定量 Absolute Quantification

用於確定未知樣本中某個核酸序列的絕對量值，也就是copy numbers



相對定量 Relative Quantification

用於測定樣本中之目標基因(target gene)在實驗組及對照組中表達的相對變化。在比較之前，同一個樣本中的目標基因需用內部對照基因(endogenous control gene)先做校正(normalization)。



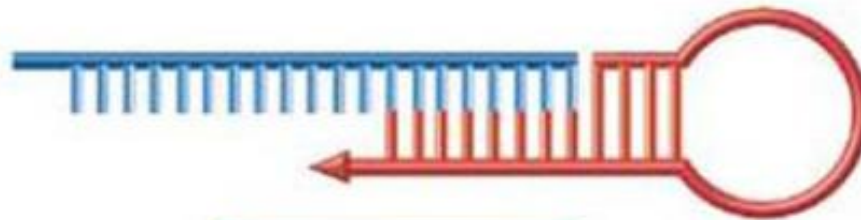
基因型鑑定

Single nucleotide polymorphisms genotyping assay

- 需用兩個帶有不同螢光物質，並針對單一鹼基變異而能辨識之探針，在**PCR**反應完成時收集數據，可用於檢測變異。
- 每個反應中需包括兩個引子和探針，可將序列放大並偵測產物序列上單核苷酸多形性位點上出現兩個可能的變異基因型
- 目標序列實際量不確定

微小RNA偵測及定量

Mature microRNA



Looped RT primer

Step 1:
Stem-loop
RT

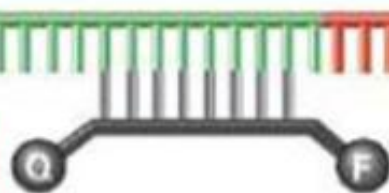


Step 2:
Real-time
PCR

Forward primer



TaqMan® probe



Reverse primer

