

实时定量 PCR 探针 (Real-time PCR Probes)概述

实时定量 PCR (qPCR)的优势

- 实时检测 PCR 反应过程
- 精确计算出每个循环的 PCR 产物量
- 扩增和检测同时进行
- 消除后续 PCR 的干扰

在实时定量 PCR 反应中，杂交探针与插入染料如 SYBR Green 相比是更好的选择。荧光标记探针可以提高实时定量 PCR 结果的效率、灵敏度和特异性。而且定量 PCR 可以在一个反应里同时检测多个目标基因。

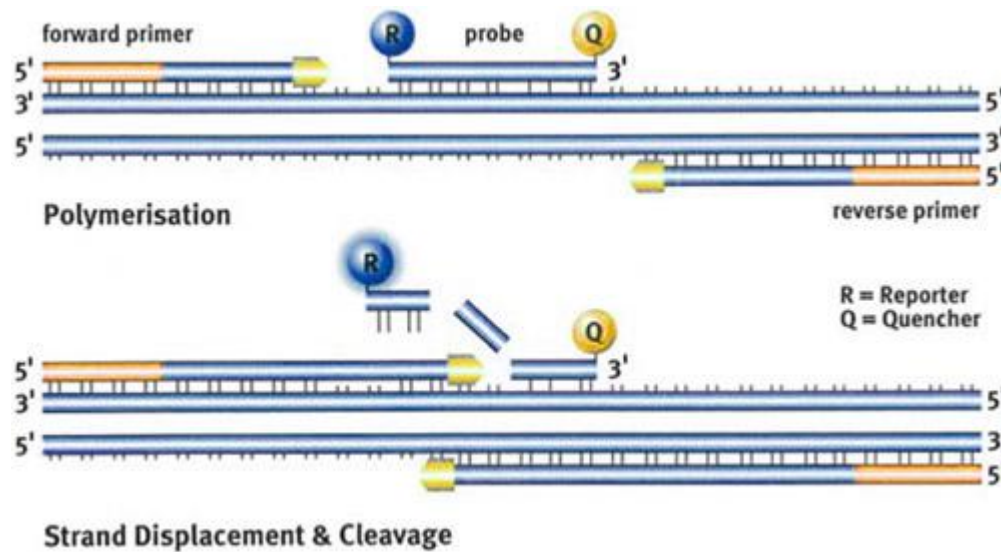
实时定量 PCR 的应用

- 基因表达分析
- 转基因检测和定量
- 病原体检测和定量
- 基因型/ SNP 分析
- 突变检测

多重 PCR 分析的优点

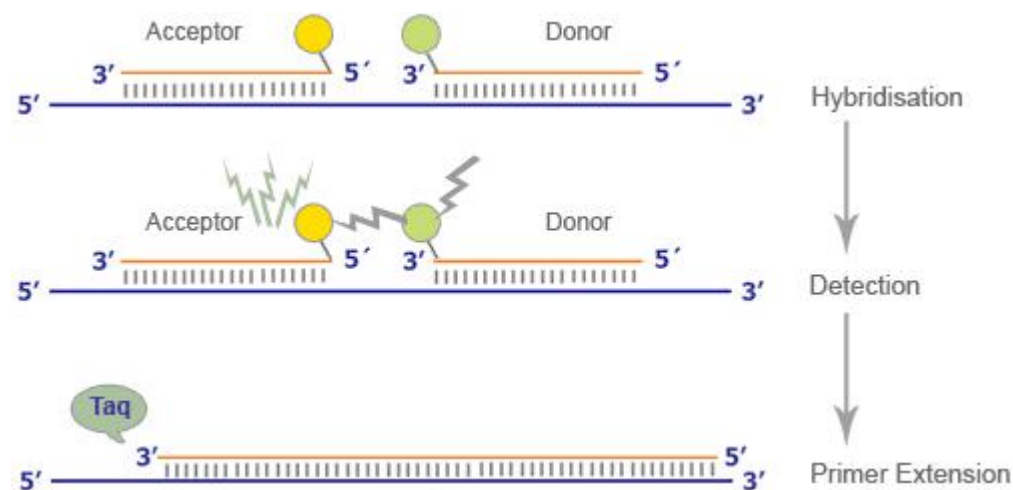
- 省钱省时省力
- 所需样品量少
- 消除移液误差
- 可以在一个反应里设置内部对照
- 便于筛选

双标探针的原理



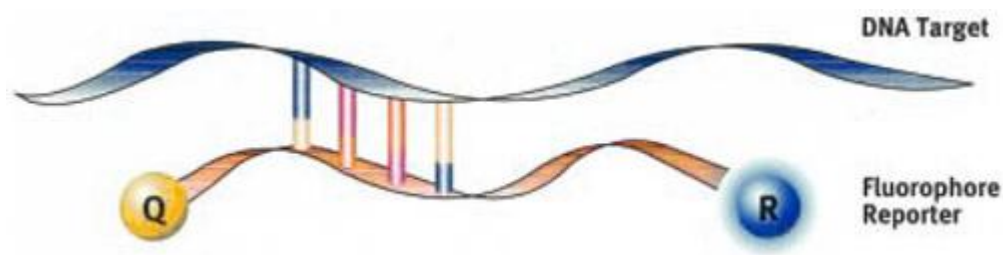
PCR 扩增时，在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针。该探针为一线性的寡核苷酸，两端分别标记一个荧光报告基团和一个荧光淬灭基团，探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收，PCR 仪检测不到荧光信号；PCR 扩增时（在延伸阶段），Taq 酶的 5' — 3' 外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步，这也是定量的基础所在。

荧光共振能量转移(FRET)技术的原理



两条线性寡核苷酸探针，其中一条的 3' 端标记荧光激发基团，另一条的 5' 端标记荧光检测基团，在无靶序列的情况下，两条探针分开，无法进行能量的传递，这样荧光仪不能检测到荧光信号；而当有靶序列时，即在 PCR 的退火阶段两条探针与靶序列结合，使得两条探针上的荧光基团可以进行能量的传递，这样荧光仪就可以检测到荧光信号，荧光信号的强弱代表了靶序列的多少。

分子信标的原理



分子信标技术是在同一探针的两末端分别标记荧光基团和淬灭基团，为一种标记荧光的发夹探针。在未与模板发生杂交前该探针分子呈发夹结构，结合在其两端的荧光基团距离上接近，产生能量转移效应，不发生荧光。当该探针与模板杂交，使荧光基团与淬灭荧光基团彼此在空间上产生足够的分离，荧光基团脱离了淬灭基团的影响，从而产生可被检测到的荧光。荧光的强度与溶液中模板的量成正比，因此可用于 PCR 定量分析。

下表列出的是最常用的荧光基团及与之匹配的淬灭基团

Spectral Properties Table

Dye	Color	Max. EX (nm)	Max. EM (nm)	Compatible Quencher
6-FAM	Green	492	515	BHQ-1, TAMRA
JOE	Orange	520	548	BHQ-1, TAMRA
TET	Orange	521	536	BHQ-1, TAMRA
HEX	Pink	535	556	BHQ-1, TAMRA
TAMRA	Rose	556	580	BHQ-2
Cy3	Red	552	570	BHQ-2
ROX	Red	587	607	BHQ-2
Cy5	Violet	643	667	BHQ-2, BHQ-3

由于 NED，VIC，PET 等荧光素的专利归 Perkin Elmer 公司所有，所以我们推荐以下可替代的荧光素：

Dye	Excitation	Emission
VIC	538	554
HEX	535	556
NED	553	575
TAMRA	556	580

PET	558	595
Redmond RED	579	595
LIZ	638	655
CY5	646	662
Texas Red	583	603
Cy3.5	588	604
ROX	586	610
Cy3.5	588	604

实验中常用的淬灭基团

使用无荧光的淬灭基团可以提高实时定量 PCR、多重 PCR、FRET 实验中的灵敏度。

Dabcyl – Dark Quencher 400–550 nm

分子信标推荐使用 Dabcyl 淬灭基团。它在抑制蓝色至绿色发射光谱的各种荧光染料时非常有效，但是不适合淬灭发射光谱大于 480nm 的荧光素。

淬灭范围： 400-550 nm

最大吸光值： 453 nm

摩尔消光系数： 32.000 M⁻¹ cm⁻¹

分子量： 399.2 g/mol

BHQ1 – Dark Quencher 480-580 nm

BHQ1 是 Biosearch Technologies 公司的黑洞淬灭基团之一，对于双标探针、分子信标和 FRET 探针非常有效，对绿色至黑色发射光谱中的所有染料都有极好的光谱重叠效应。

淬灭范围: 480-580 nm

最大吸光值: 534 nm

摩尔消光系数: 34.000 M⁻¹ cm⁻¹

分子量: 491.5 g/mol

BHQ2 – Dark Quencher 520-650 nm

BHQ2 是 Biosearch Technologies 公司的第二个黑洞淬灭基团。BHQ2 能高效应用于 5'端带荧光的双标探针、分子信标和 FRET 探针，有效发射光谱是由深绿色至橙色。

淬灭范围： 520-600 nm

最大吸光值： 544 nm

摩尔消光系数 91.000 M⁻¹ cm⁻¹

分子量： 493.5 g/mol

TAMRA – Fluorescent Quencher 520-600 nm

TAMRA (Tetramethylrhodamin)是一种可以用作双标探针及分子信标的 3'端和内部淬灭基团(TAMRA-dT)的荧光染料。它的淬灭范围适合 5'端的报告基团，如 FAM, HEX, TET, JOE,

Yakima Yellow, Cy3 或者其他这个波长范围内的染料。在多重 PCR 中不推荐使用 TAMRA, 因为它的荧光特性将使淬灭基团和报告基团光谱发生重叠, 增加背景干扰。

淬灭范围: 520-600 nm

最大吸光值: 544nm

摩尔消光系数: $91.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

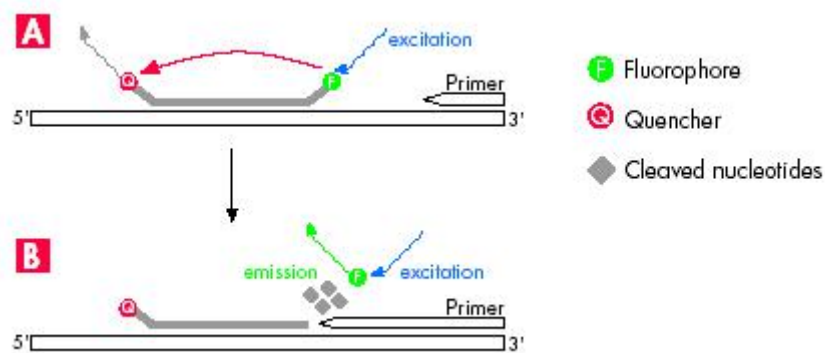
分子量: 612.7 g/mol

双标探针和 5'核酸酶试验引物的设计准则

双标探针 (荧光淬灭探针或称 FQ 探针) 在其 5'端和 3'端分别有一个荧光报告和淬灭基团。利用 Taq DNA 聚合酶 5'-3'的核酸外切酶活性, 这些探针可以用于定量 PCR 体系。靶序列的特异性探针和特异性的 PCR 引物同时使用, 设计的该探针在上下游 PCR 引物的范围内退火。在 PCR 的延伸阶段, Taq DNA 聚合酶 5'-3'的核酸外切酶活性将荧光报告基团从探针上切割下来。随着 PCR 循环数的增加, 游离报告基团的数量不断的增加, 实时检测从游离荧光基团上释放的荧光信号, 从而对靶序列进行定量分析。

在设计这些双标探针的时候需要谨记以下几个要点。

1. 探针的结合位置很重要, 先设计好探针再设计 PCR 引物。
2. 探针的结合位点应该靠近扩增产物的中心, 扩增产物的长度应该在 50-150bp 之间。
3. 探针的解链温度应该在 68°C 至 70°C 之间。
4. 探针的长度最少 20bp, 否则容易发生非特异性结合。
5. 尽量避免在探针的 5'端出现 dG, 因为 dG 是一个较弱的淬灭剂, 任何 dG 都要离 5'端至少两个碱基。



探针的设计标准:

G-C 含量: 30~80%

多聚碱基: 避免出现多个重复碱基, 特别是 4 个或者多于 4 个 G。

末端构成: 在末端不能出现 G。

退火温度: $68-70^{\circ}\text{C}$

DNA 链: 挑选 C 多于 G 的链。如果使用互补链, 确保 C 不存在于 3'端。

长度: 少于 30 个碱基。

设计: 淬灭基团在 3'端, 荧光染料在 5'端。

引物的设计标准:

G-C 含量: 30-80%

多聚碱基: 避免出现多个重复碱基, 特别是 4 个或者多于 4 个 G

末端组成: 3'端的 5 个碱基中不能多于两个 G 或者 C, 建议 A 出现在 3'端, 便于引物二聚体更加高效的降解。

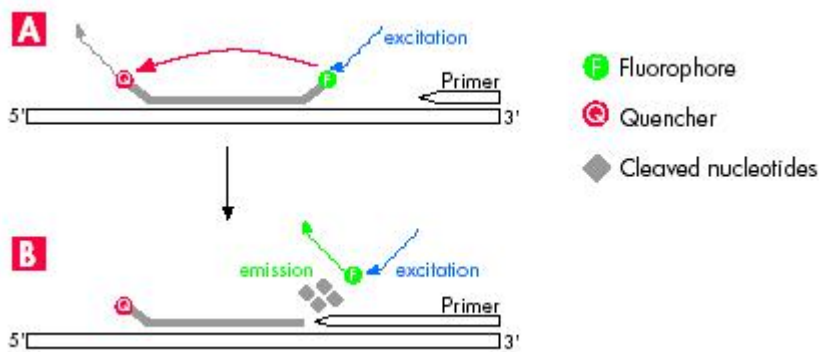
退火温度: 58-60°C

产物: 50-150 个碱基

设计: 在设计完探针之后再设计引物, 尽量紧靠探针但是不要发生重叠。其中的一条引物可以和外显子交接, 用于扩增 mRNA。

分子信标的设计原则:

分子信标的 5'端和 3'端也分别有一个荧光报告基团和一个淬灭基团。当荧光染料和淬灭基团接近的时候, 探针会形成一个发夹结构。在 PCR 中, 分子信标是特别针对目的基因设计的, 分子信标探针可以使 PCR 引物退火。在 PCR 的退火阶段, 探针和它对应的靶序列杂交, 发夹环解开后, 荧光报告基团和淬灭基团分离, 可以发出一个荧光信号。信号的强弱和靶序列的多少成正比, 通过实时监测这个信号, 可以对靶序列进行定量。为了精确检测 PCR 过程, 分子信标必须和它们的靶序列在退火阶段杂交成功, 而游离的分子信标应该继续保持封闭状态, 不会发出任何荧光。通过适当选择探针的长度和靶序列的长度, 当温度高于退火温度 7-10°C 时, 探针能够从靶序列上脱离下来, 这样的探针序列的长度就很适宜。探针与靶序列的解链温度可以用“GC 百分比”原则预测, 很多设计探针的软件包都使用这个原则。在添加茎环区序列之前, 这个预测方法只能用在探针序列的设计上。实际应用中, 探针序列的长度范围通常是 15-30 个核苷酸。



上图显示的是分子信标在实时定量 PCR 中的应用原理

A: 不和靶序列结合的时候, 分子信标呈现发夹结构。荧光报告基团和淬灭基团的紧密结合阻止了报告基团释放荧光。**B:** 在 PCR 的退火阶段, 分子信标和靶序列杂交结合, 将荧光染料和淬灭基团分离, 导致荧光染料释放信号。信号的强弱和靶序列的多少成正比, 实时监测荧光信号可以对靶序列进行定量。

- 茎环区的解链温度比退火温度高 7~10°C

- 探针的环状区需要 15~30 碱基
- 茎环区的两边长度应该在 5~7 碱基之间
- 扩增产物的长度少于 150 bp

北京赛百盛基因技术有限公司

全国统一热线: **400 666 3029**

地址: 北京市海淀区上地四街1号院2号楼202室 邮编: 100085

电话: 010-62969345/46, 010-82784296/92 传真: 010-82784290

Email: info@sbsbio.com

Http: [//www.sbsbio.com](http://www.sbsbio.com)