

基于 Mastercycler ep *realplex* 的梯度 与 Impluse 功能实现 对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验的高效优化

摘要

众所周知，目前实时荧光定量 PCR 实验设计主要分为探针法与 SYBR Green I 染料法。当选择探针法时，能检测 PCR 中的特异性扩增产物，而不受非特异性扩增产物的影响，因而被广泛应用于 mRNA 和以 RNA 为基因组的病原体的定量。一条有效的荧光探针需要具备很高的保守性、合适的 GC 含量和长度、以及合适的熔解温度 (T_m)，这使探针设计的难度极大提高。另外，探针合成的费用昂贵，并且还需要针对不同的基因来设计不同的探针，因而在一定程度上限制了特异性探针的使用。

与荧光探针不同，SYBR Green I 是一种双链 DNA 结合染料，只要有合适的引物与模板，SYBR Green I 可以实现任何目的基因的实时定量。但是，SYBR Green I 对双链 DNA 的结合是非特异性的，因此，PCR 中的非特异扩增产物，特别是引物二聚体，就会产生荧光信号并严重干扰对目的基因的定量。这也就是为什么对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验体系尤其需要优化的原因。

实现对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验的高效优化在本质上就是努力提高 PCR 反应的特异性，Eppendorf 最新 Mastercycler ep *realplex* 荧光定量 PCR 仪的梯度功能与 Impluse 功能，从仪器的角度高效灵活的促进 PCR 的优化过程，是 SYBR Green I 染料法荧光定量 PCR 的得力助手。

Mastercycler ep *realplex* 的与 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验的优化

如何正确地选择引物的退火温度对于 PCR 反应的结果与效率至关重要。一直以来，虽然有许多软件提供各式算法去估计该温度值，但是在现实的实验中能否精准地确定该参数却是随机的。

Mastercycler ep *realplex* 的梯度功能旨在 96 孔 PCR 样品槽上按 12 列的方式提供一个相对宽的温控范围，即最多可

以在一次 PCR 反应中实现 12 种不同的温度。如果你选择的是 Mastercycler ep *realplex* 铝制样品槽，梯度温控范围为 1-20，如果是银制样品槽，梯度温控范围为 1-24。

为了展示 Mastercycler ep *realplex* 的梯度功能的易用性，更重要的是显示其对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验优化的重要性，我们用实验进行验证。

应用梯度功能的荧光定量 PCR 实验方案

准备包括 RealMasterMix 荧光定量 PCR 试剂、SYBR Green I 与引物的反应体系，用于扩增 球蛋白基因序列片段。在 Mastercycler ep *realplex* 银制的样品槽上设定梯度退火温度，温控范围 24 (44-68) 见图 1，PCR 程序为：95 2 分钟预变性，三步 95 15 秒、44-68 30 秒、68 60 秒 循环 40 次，反应结束后加熔解曲线分析。

对于梯度设定的 12 种不同的退火温度，每个温度条件下准备三个重复管，每管加 5 ng 人基因组 DNA 作为模板，并准备一个空白对照 (NTC)。

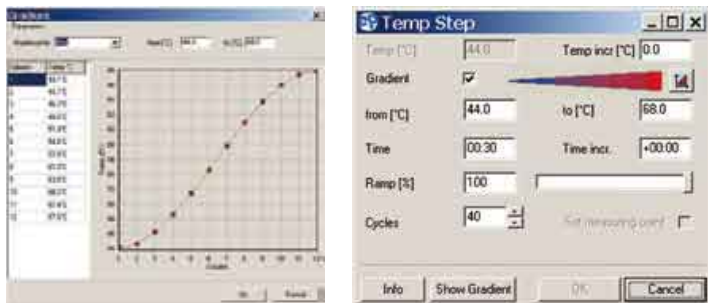


图 1: 在 Mastercycler ep realplex 软件上设定梯度退火温度梯度功能在 96 孔 PCR 样品槽上按 12 列的方式显示一个连续变温范围，并符合三组回路的技术特点

Well position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Annealing temperature (°C):	44.1	44.7	46.2	48.6	51.4	54.6	57.8	61.0	63.8	66.0	67.4	67.8
Mean C_t :	28.5	28.7	28.1	26.9	25.6	25.0	24.3	24.1	24.0	23.9	24.1	24.4
Specific PCR product:	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nonspecific PCR product:	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-

表 1: 对于梯度设定的 12 种不同的退火温度，分析对应反应体系的参数

实验结果与讨论

对照图 3 的熔解曲线分析结果，退火温度低于 48.6（对应样品槽上的第 1-3 列位置）的实验体系与空白中均出现了大量的非特异性片段扩增。值得一提的是，对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验进行熔解曲线分析是很必要的。

从表 1、图 2 的结果可以看到，特异性 球蛋白基因的扩增，由最佳的退火温度（对应样品槽上的第 7-12 列位置）到最差的退火温度（对应样品槽上的第 3 列位置）， C_t 值偏移了大约 4 个循环，从而导致不同的反应结果。

表 1 中还显示，对比样品槽上的第 10-12 列位置上不同的退火温度， C_t 值偏移了大约 2 个循环，第 10 列对应的退火温度实现的 PCR 结果最佳。纵观第 1-12 列结果趋势，由第 1 到第 10 列， C_t 值逐渐降低（特异性提高），由第 10 到第 12 列， C_t 值逐渐升高。

通过以上利用 Mastercycler ep realplex 梯度功能对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 退火温度进行优化，实现了令人满意的可靠结果。充分证明了梯度功能的灵活性与高效性，对于初步建立 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 分析尤为必要。

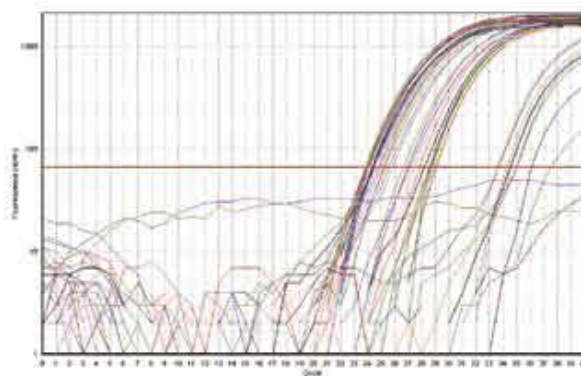


图 2: 经对数处理的 beta 球蛋白基因序列定量 PCR 扩增曲线显示梯度功能设定的不同退火温度对应的定量 PCR 扩增 C_t 值

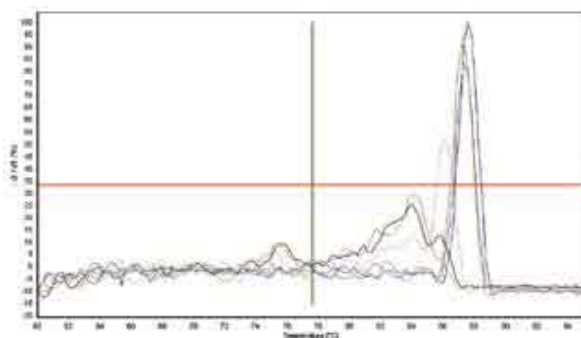


图 3: 第 3 和第 8 列的熔解曲线分析

基于 Mastercycler ep *realplex* S 的 Impluse 功能，新颖的仪器层面的热启动理念

通过优化 PCR 反应的退火温度，可以尽可能地减少体系内的非特异扩增；但是，另一个非特异扩增的易发环节即 PCR 反应由初始到第一次高温变性这一时相，对 PCR 反应特异性的破坏作用不容忽视。

原因有二：首先普通 Taq 酶在常温即有活性，在 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温的过程中，很容易在低于特异性退火温度下发生非特异性退火或引物二聚体的延伸；其次，这些非特异性扩增产物又会作为模板，在其后的正式循环中数量逐级放大。

因此，尽可能缩短 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温过程所需要的时间，不失为一种提高 PCR 反应特异性的有效手段。

基于 Mastercycler ep *realplex* S，银制样品槽的 Impluse 功能是 Eppendorf 独创的新颖的仪器层面的热启动理念，可极大地提高定量 PCR 的特异性与 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 的重复性。

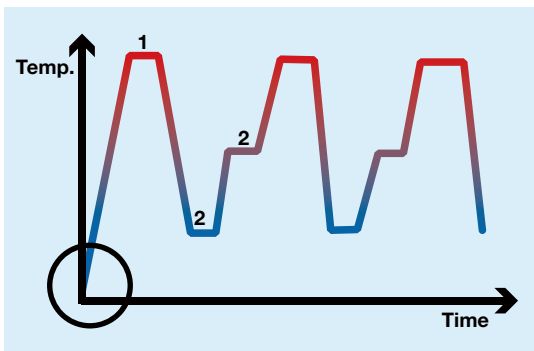


图 1：一个典型的 PCR 程序
PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温的过程中（画圈部分），很容易在低于特异性退火温度（第二步）下发生非特异性退火或引物二聚体的延伸。

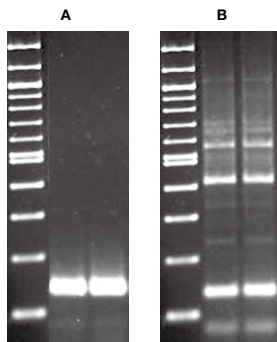


图 2：聚乙烯凝胶电泳结果
A 显示一特异性 PCR 扩增而 B 为非特异性 PCR 扩增，B 相较 A 胶片中增加的条带为非特异性扩增产物

Impluse 功能针对的正是 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温过程，原本 Mastercycler ep *realplex* S，银制样品槽的升温速度就已达 6 /S，在此基础上，Impluse 功能通过增加热源，将 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温过程的升温速度提高到 8 /S，极大地缩短该时相尤其是低于特异性退火温度下的时间，从而减小产生非特异性扩增的机会。

在 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 体系中，由于 SYBR Green I 染料对序列的非选择性，一旦非优化的体系导致非特异性扩增的出现，势必导致特异性扩增产量的下降、与 SYBR Green I 染料的结合下降，荧光信号的读取不准确。图 3 显示在 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 体系中，非特异性扩增对应于在熔解曲线分析上为特异性扩增峰以外的杂峰，这一点与传统的胶电泳相呼应，图 2。

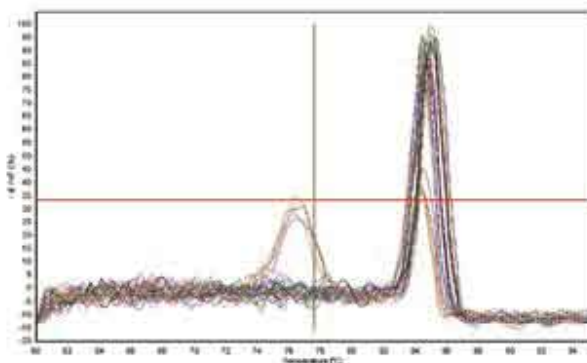


图 3：对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验进行熔解曲线分析
非特异性扩增对应于在熔解曲线分析上为特异性扩增峰以外的杂峰

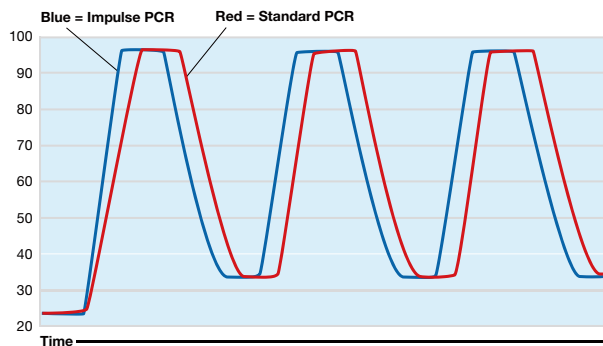


图 4：Impluse 功能选择与否的温度速率图谱
Impluse 功能选择与否的温度速率图谱分别用蓝色与红色区别，X 轴显示时间、Y 轴显示温度。Impluse 功能通过提高 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温过程的升温速度，极大减小产生非特异性扩增的机会。