

核酸检测

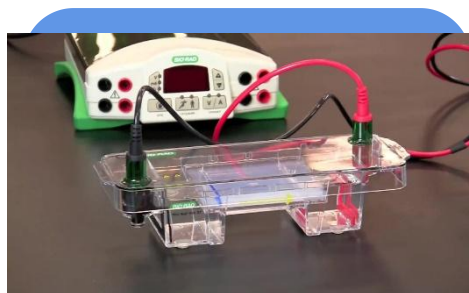
郑玉玺

15915751625

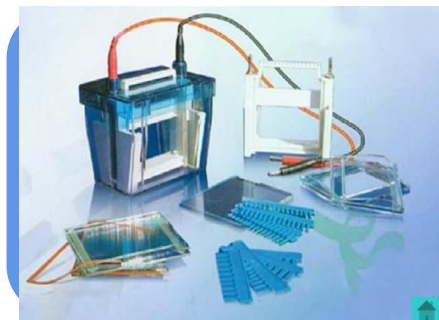
核酸检测的方法



1、紫外分光光度法



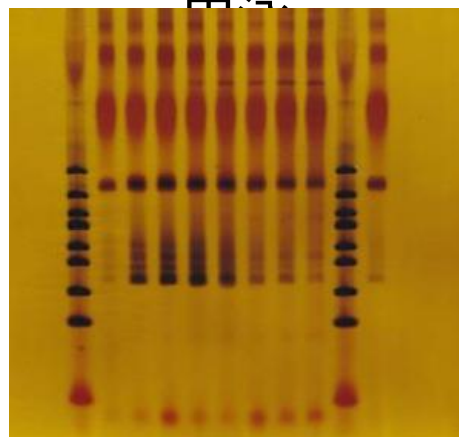
2、琼脂糖凝胶电泳



3、变性凝胶电泳



4、脉冲场凝胶电泳



5、聚丙烯酰胺凝胶电泳



6、荧光定量PCR

1、紫外分光光度法

- ✓ DNA的吸收峰在260nm
- ✓ 蛋白质的吸收峰在280nm



标准DNA溶液(1 $\mu\text{g/ml}$)

$A_{260}=0.02$

紫外分光光度
法能不能区分
DNA和RNA?

$A_{260}=1$, 双链DNA含量为50 $\mu\text{g/ml}$ 。
单链DNA与RNA含量为40 $\mu\text{g/ml}$
单链寡核苷酸含量为33 $\mu\text{g/ml}$

1、紫外分光光度法

✓ 核酸的纯度：260nm和280nm处读数的比值 (A_{260}/A_{280})

260nm和230nm处读数的比值 (A_{260}/A_{230})

✓ 纯净的核酸比值在 A_{260}/A_{280} **1.8~2.0** (DNA 1.8; RNA 2.0)

纯净的核酸比值在 A_{260}/A_{230} **>2.0**

✓ 如果比值在1.6及以下，则说明样品中有蛋白质或其他杂质污染

核酸	蛋白质	碳水化合物
A_{260}	A_{280}	A_{230}

1、紫外分光光度法



2、琼脂糖凝胶电泳

- ✓ 电泳 (electrophoresis)：依据分子或颗粒所带电荷、形状、大小等不同，因而在电场介质中移动速度不同，从而达到分离的技术。
- ✓ 琼脂糖凝胶电泳：以琼脂糖凝胶作为支持物，借助琼脂糖凝胶的分子筛作用，核酸片段因其分子量不同，电泳移动速度有差异而分离。
- ✓ 核酸是两性电解质，在pH 3.5时，为正电荷；pH 8.0~8.3时，为负电荷。

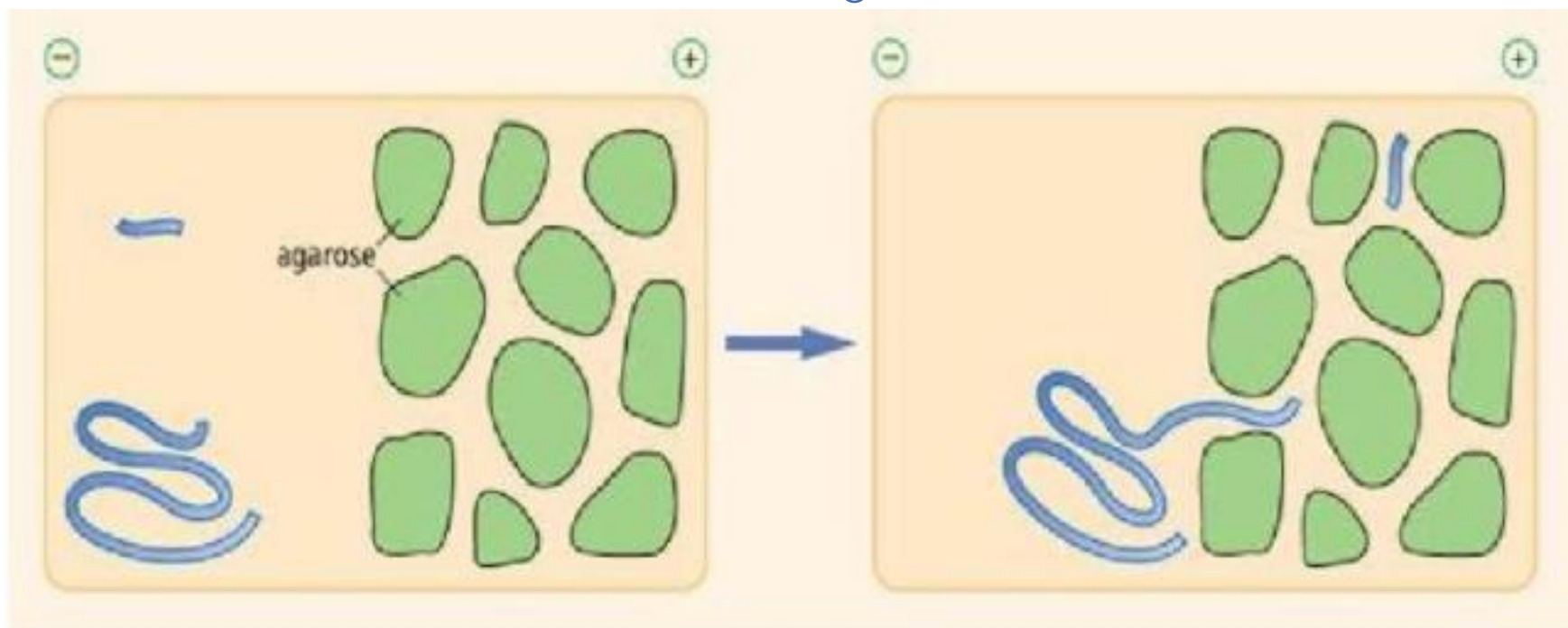


琼脂 (Agar)：石花菜及其他红藻类植物中提取出来的一种线状高聚物

2、琼脂糖凝胶电泳

✓ DNA分子的大小

分子量大的DNA
片段和分子量小的
DNA片段，谁
跑的更快、更远？



DNA片段迁移距离与碱基对的对数成反比

2、琼脂糖凝胶电泳

✓ 琼脂糖浓度

凝胶浓度 (%)	线性DNA长度 (bp)
0.5	1000~30000
0.7	800~12000
1.0	500~10000
1.2	400~7000
1.5	200~3000
2.0	50~2000

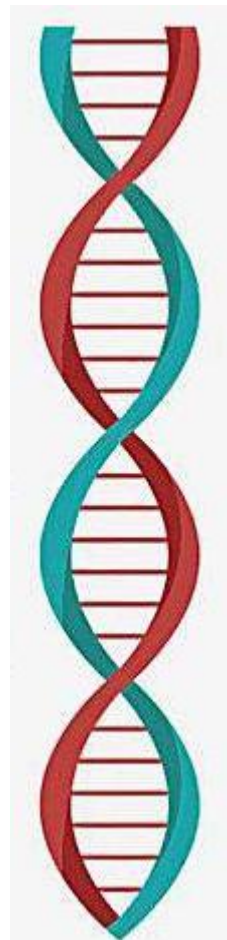
琼脂糖凝胶电泳可区分相差100bp的DNA片段

2、琼脂糖凝胶电泳

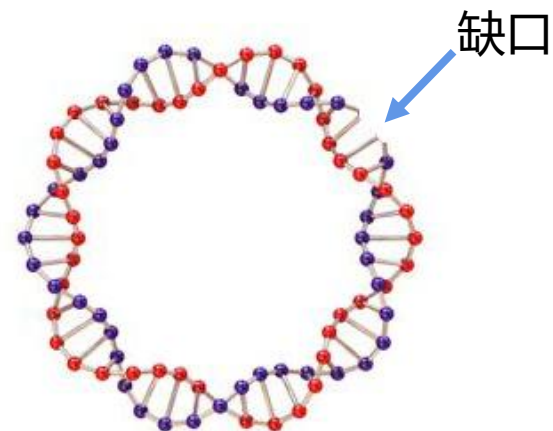
✓ DNA分子构象



超螺旋共价闭合环状DNA (cccDNA)



线状DNA



开链环状DNA

2、琼脂糖凝胶电泳

✓ 缓冲液系统

用水可以做缓冲液吗？

缓冲液系统	组成	pH
TAE	乙酸盐、EDTA	8.0
TBE	硼酸盐、EDTA	
TPE	磷酸盐、EDTA	

此时DNA
片段朝哪一
极跑？

2、琼脂糖凝胶电泳

✓ 上样缓冲液 (6X loading buffer)

✓ 作用:

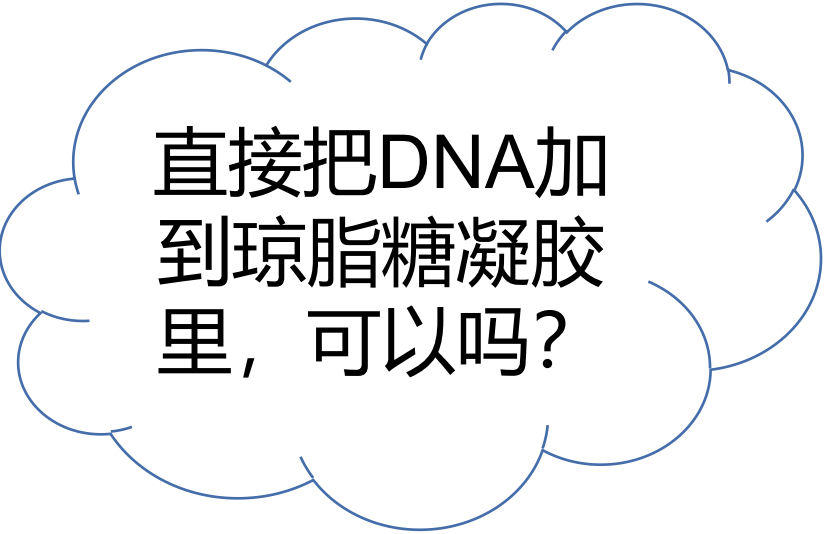
① 使DNA可以沉降到孔下, 不会飘出;

② 指示作用

✓ 组成:

① 紫蓝色: 溴酚蓝

② 二甲苯青



直接把DNA加到琼脂糖凝胶里, 可以吗?

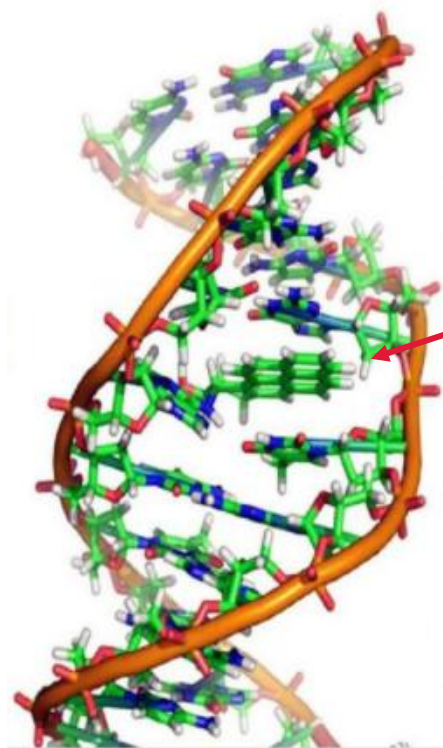
2、琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖浓度 (m/v)				
	0.6%	1.0%	1.4%	2.0%
溴酚蓝	1kb	0.6kb	0.2kb	0.15kb
二甲苯青		2kb	1.6kb	



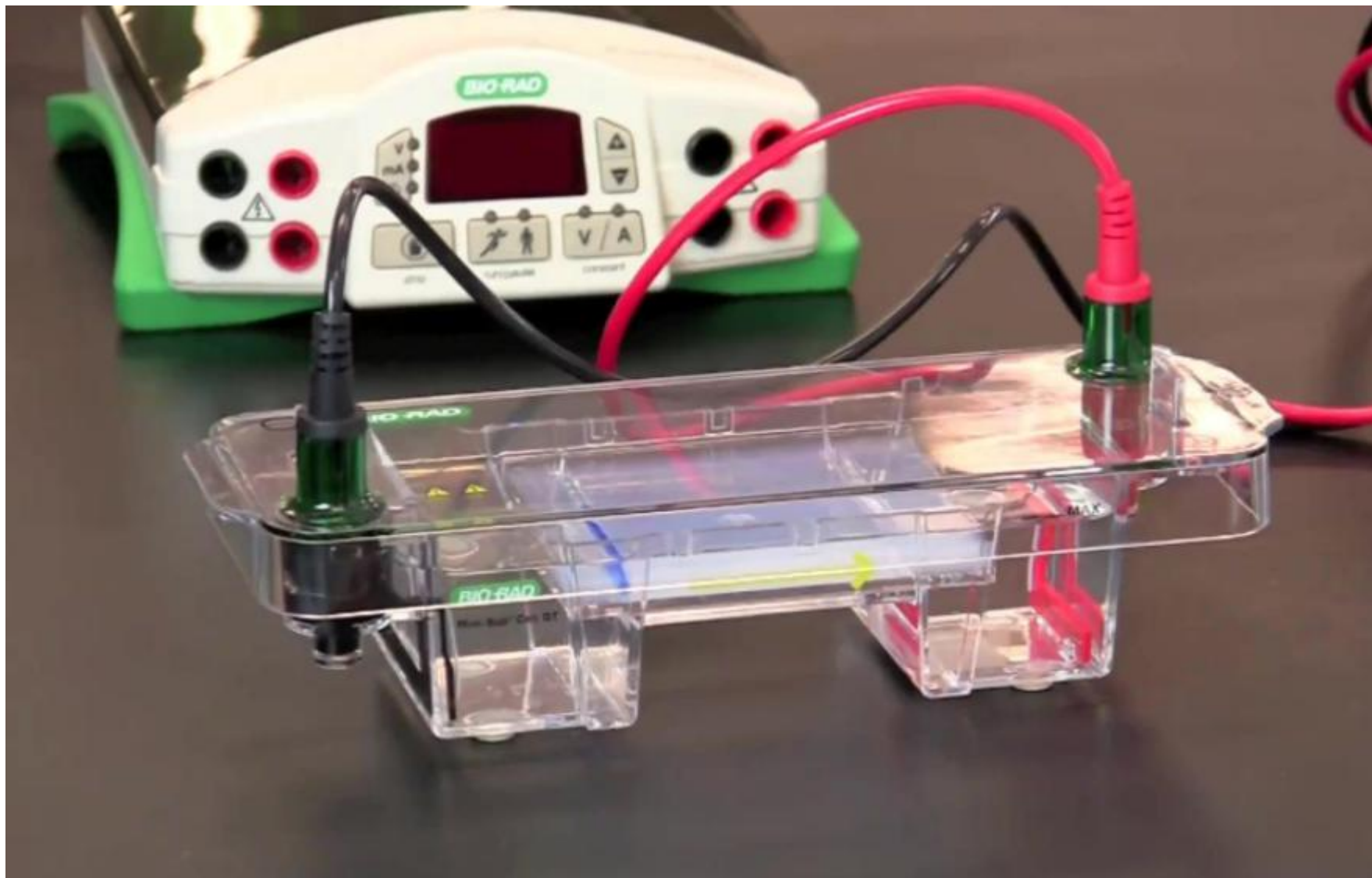
2、琼脂糖凝胶电泳

- ✓ 溴化乙锭 (EB)：芳香族荧光化合物，高度灵敏的嵌入性荧光染色剂，是一种核酸染料，用于琼脂糖凝胶电泳中核酸染色，具有诱变性。
- ✓ EB在302nm紫外光透射下，激发放射出橙红色信号，可用于观察或拍照。

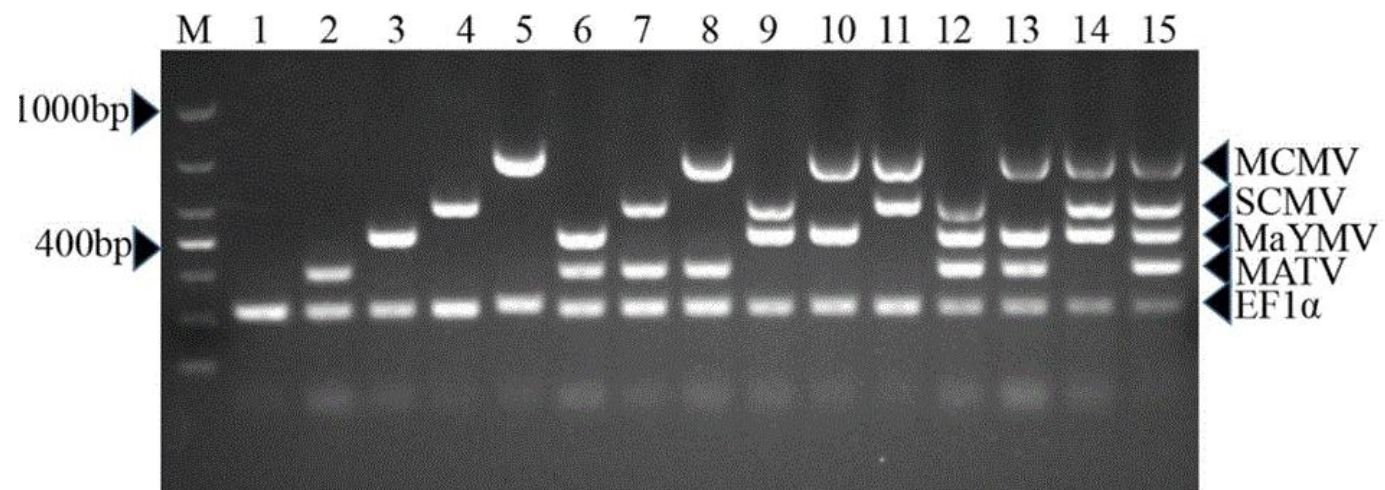
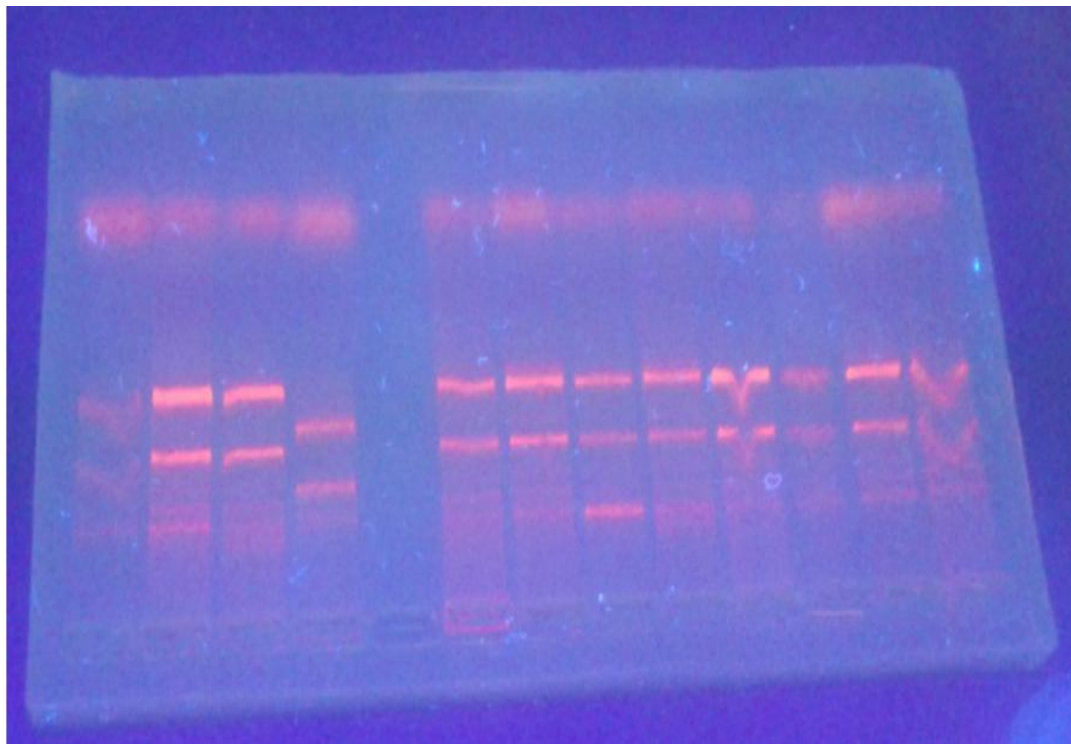


扁平分子，插入DNA配对的碱基中间

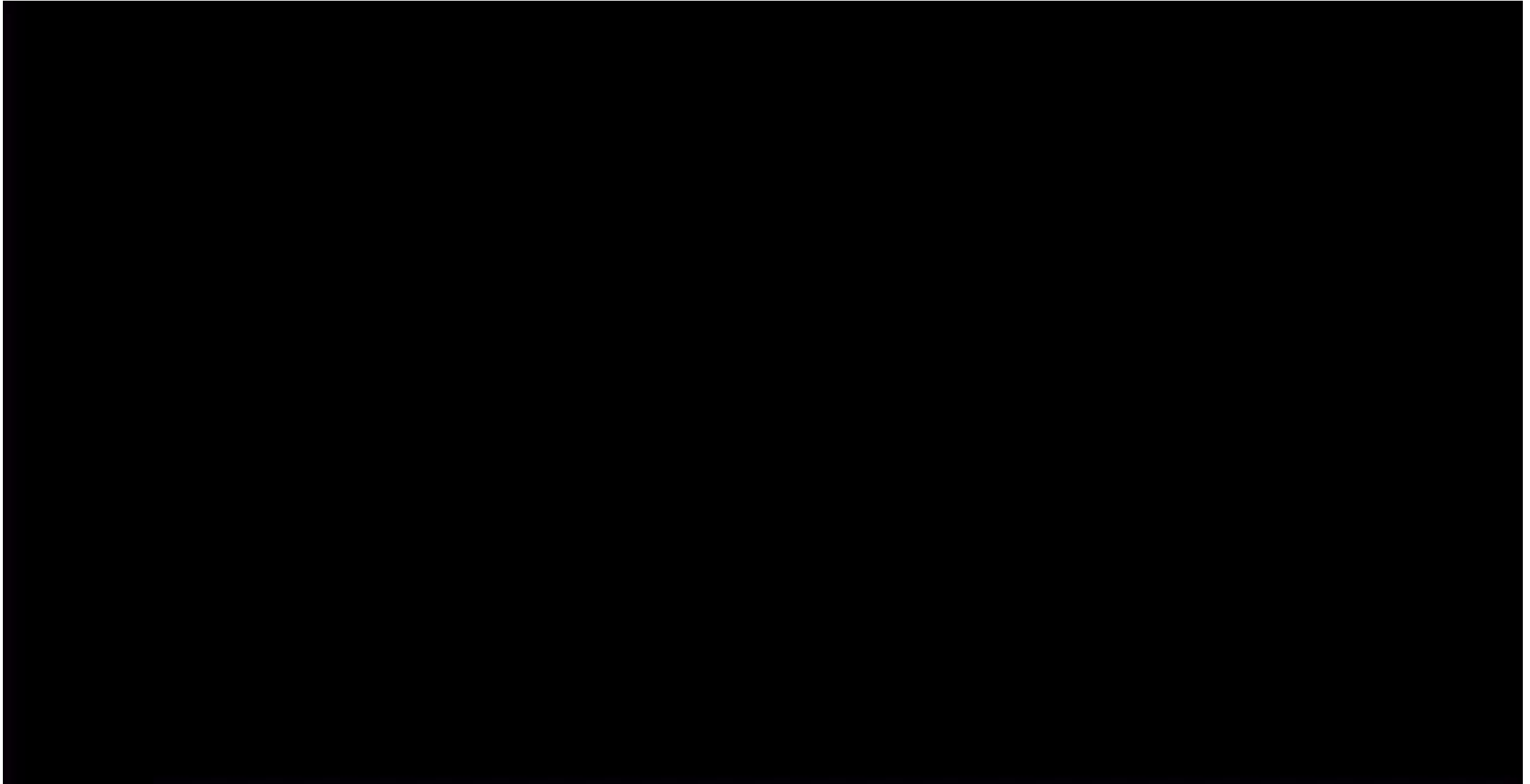
2、琼脂糖凝胶电泳



2、琼脂糖凝胶电泳



2、琼脂糖凝胶电泳

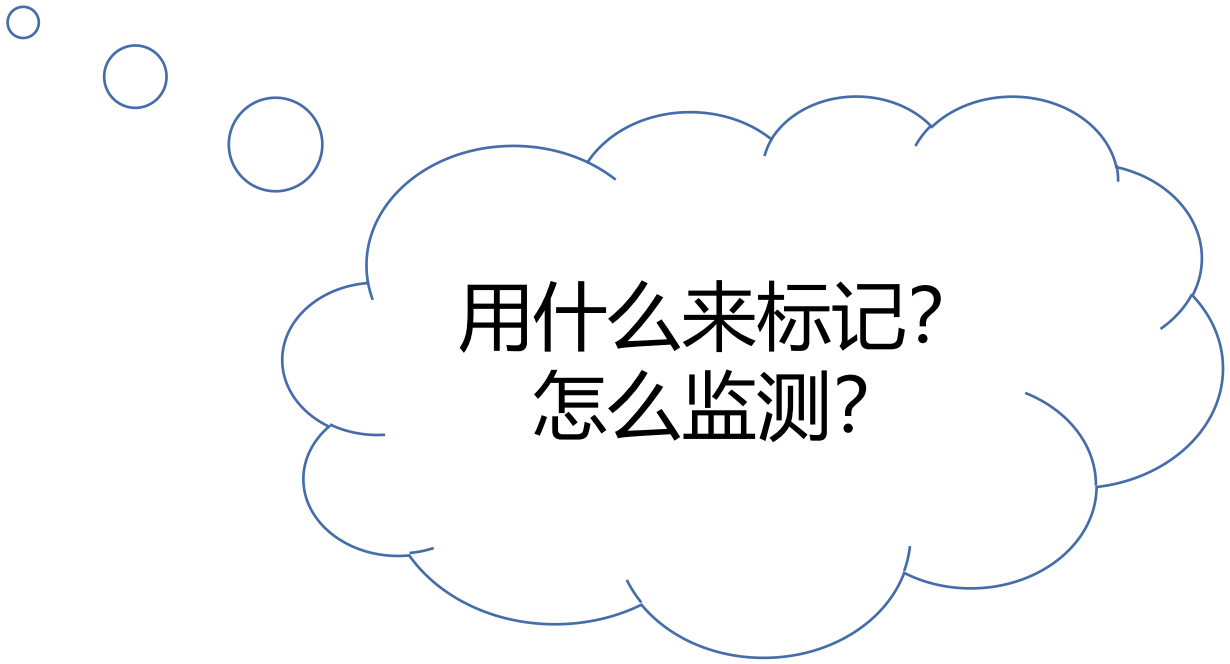


2、荧光定量PCR

新华社
XINHUA NEWS

3、荧光定量PCR

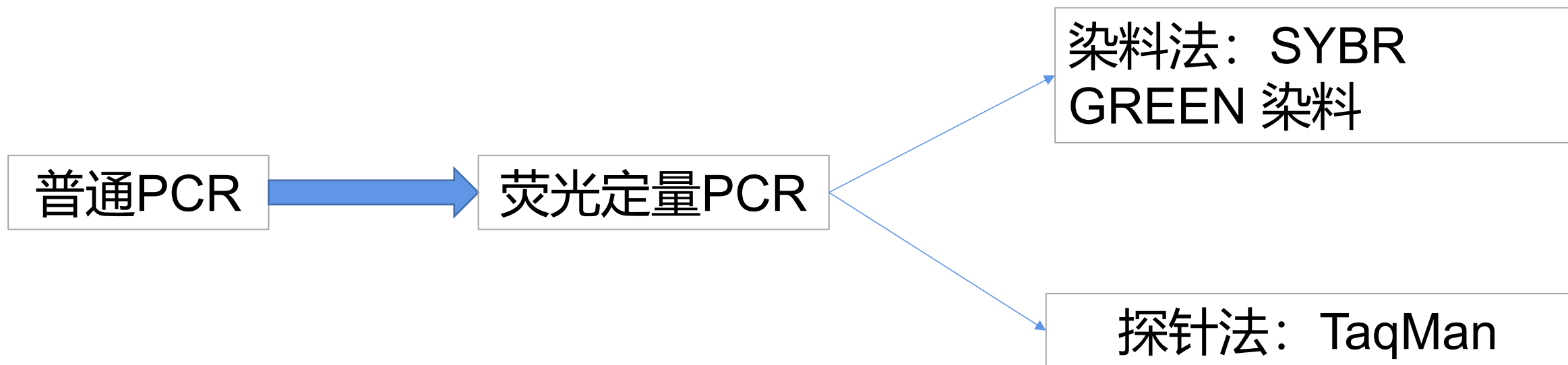
- ✓ 实时荧光定量PCR (Real-time Q-PCR) , PCR反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积, 实时监测整个PCR进程, 最后通过参照标准曲线对反应体系中未知模板进行定量分析的方法。



用什么来标记?
怎么监测?

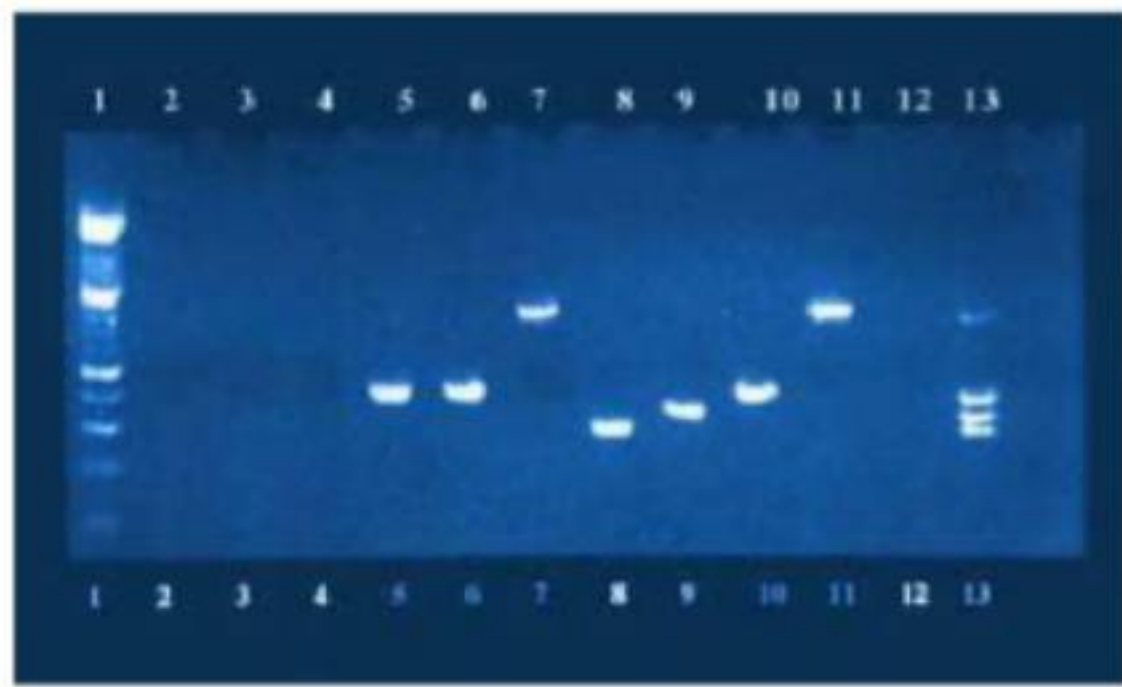
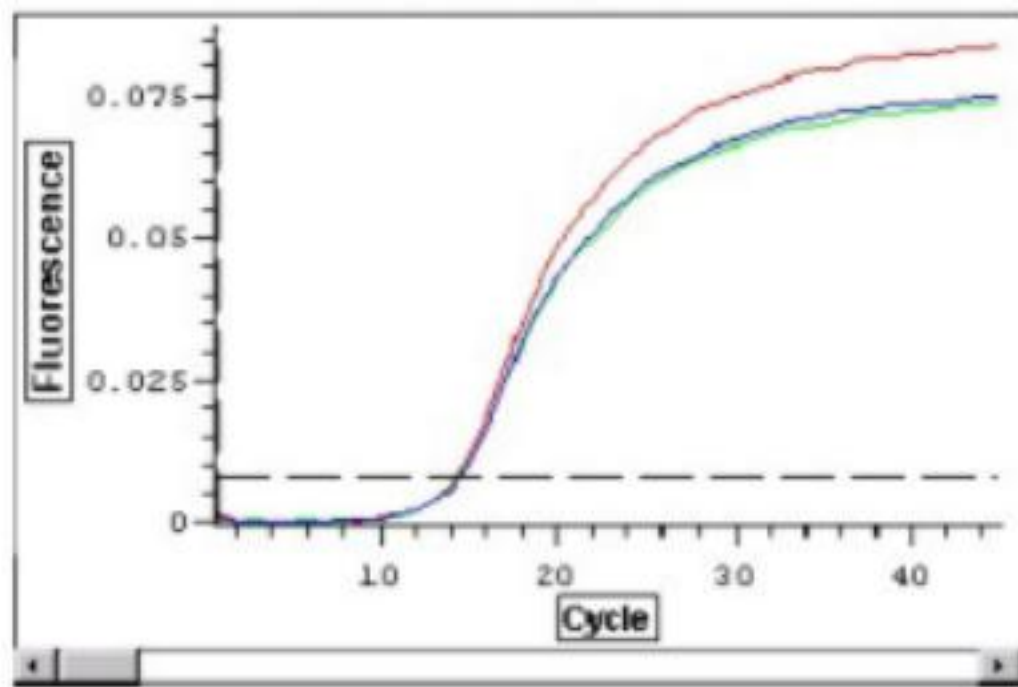
3、荧光定量PCR

✓ 荧光定量PCR建立在普通PCR基础上



3、荧光定量PCR

- ✓ 普通PCR：借助电泳技术，对扩增反应的终产物进行半定量及定性分析
- ✓ 定量PCR技术：利用荧光信号的变化适时检测PCR扩增反应中的每一个循环扩增产物量的变化，最终精确对起始模板进行定量分析



3、荧光定量PCR

定量PCR

灵敏度高，可达到
常规PCR的10倍

高精确度

安全省时

常规PCR

只能进行半定量或定性分析

不安全易污染

费时费力

3、荧光定量PCR

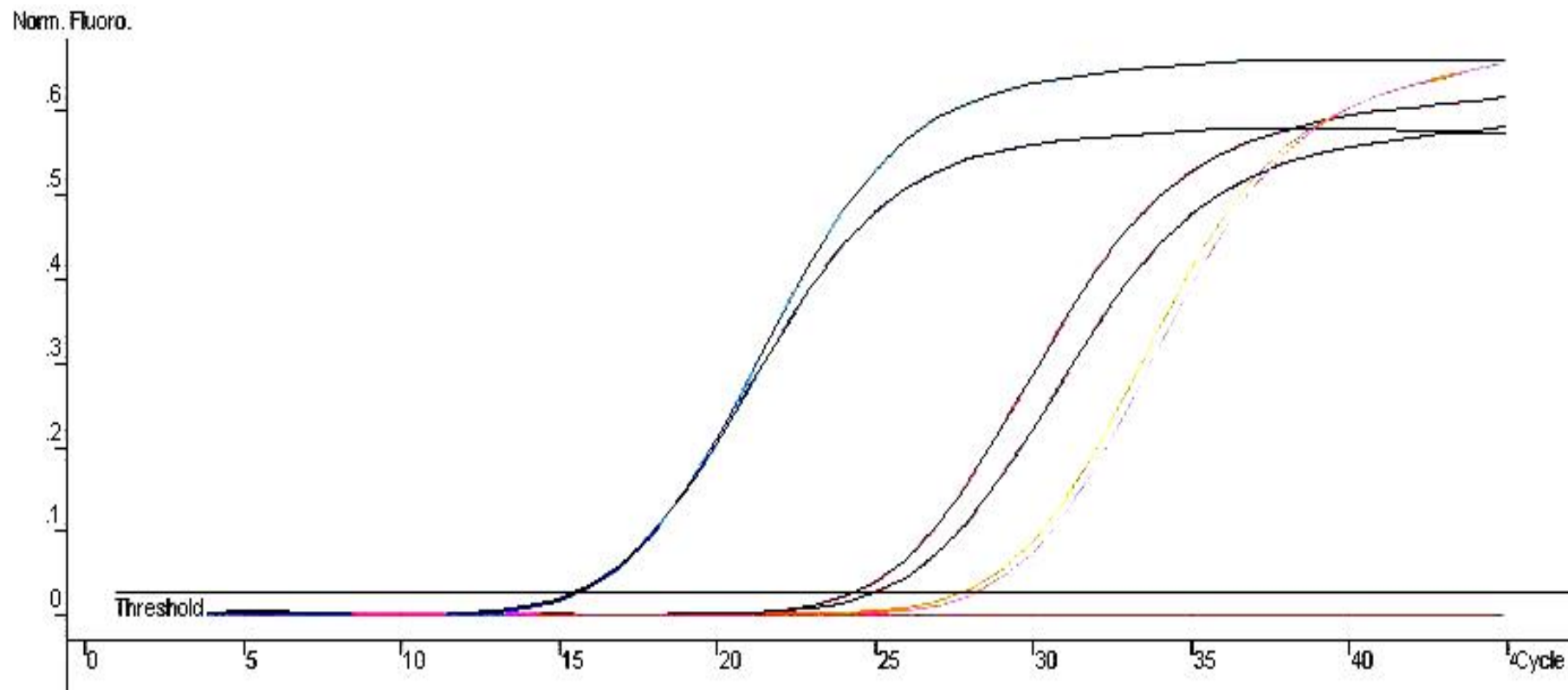
3个概念：

- 增长曲线 (primary curve)
- 荧光阈值 (threshold)
- CT 值(Cycle Threshold)



3、荧光定量PCR

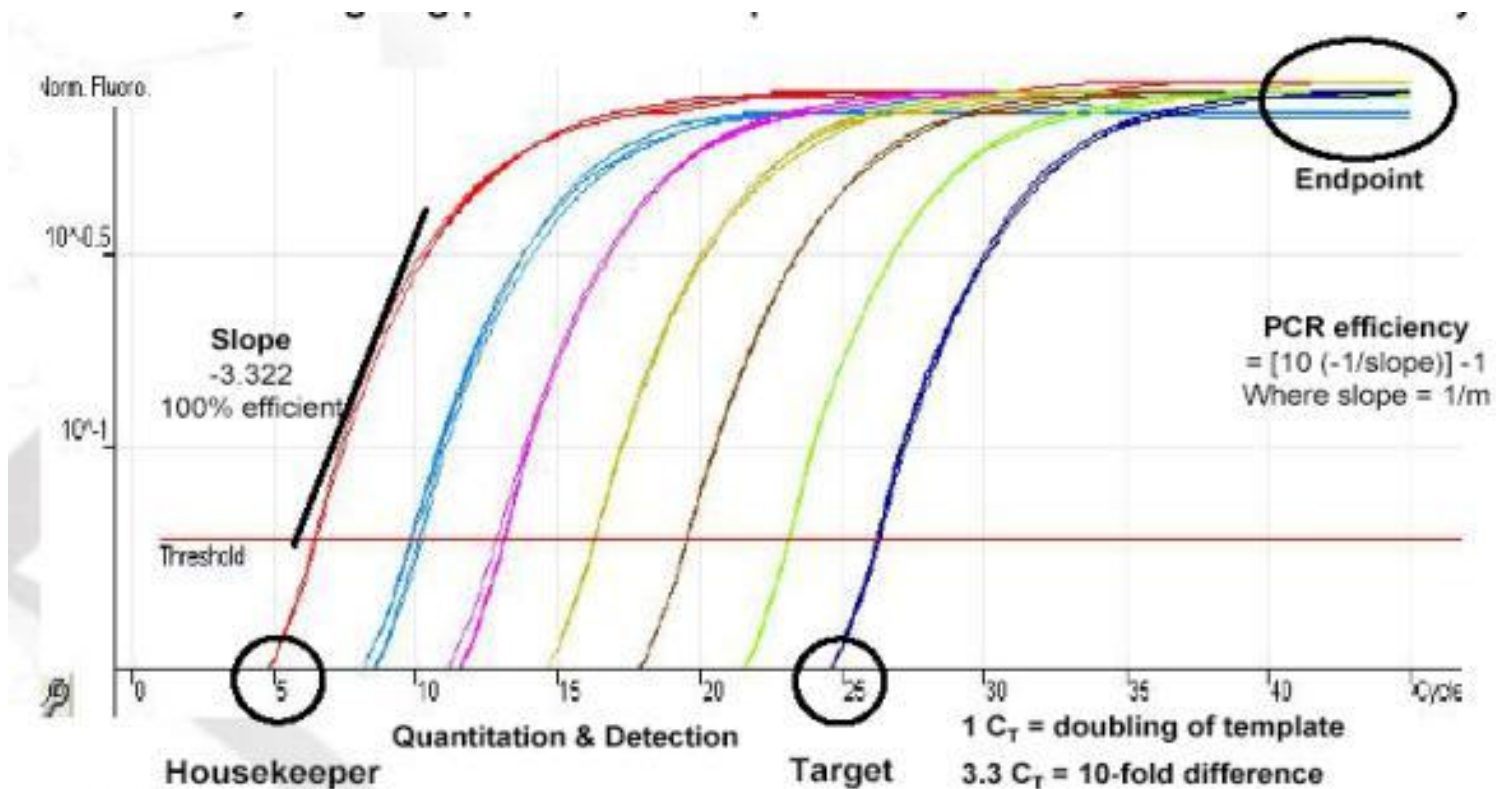
增长曲线 反映荧光强度与循环数的对应关系



3、荧光定量PCR

荧光域值 (Threshold) 的设定

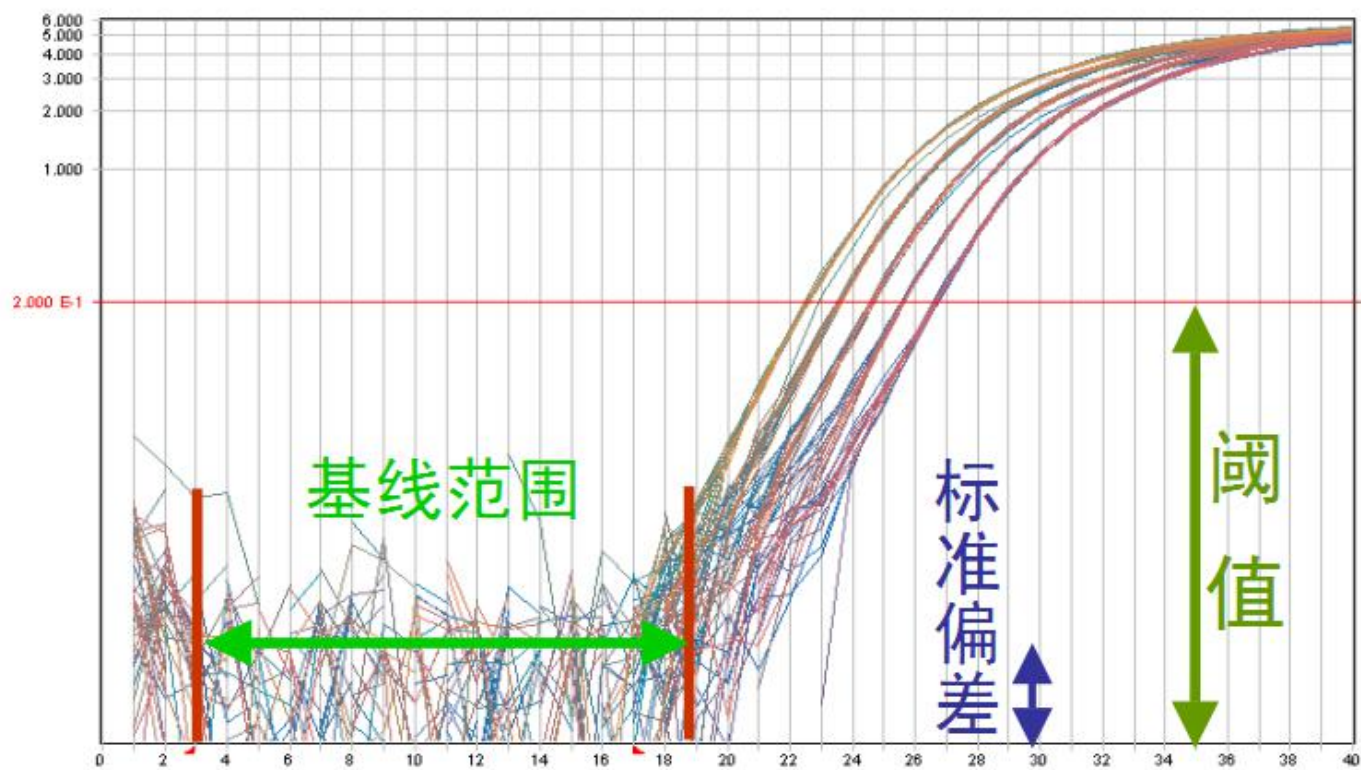
域值： PCR扩增信号进入相对稳定对数增长期时的荧光值。



3、荧光定量PCR

Ct值：C代表Cycle，t代表threshold。

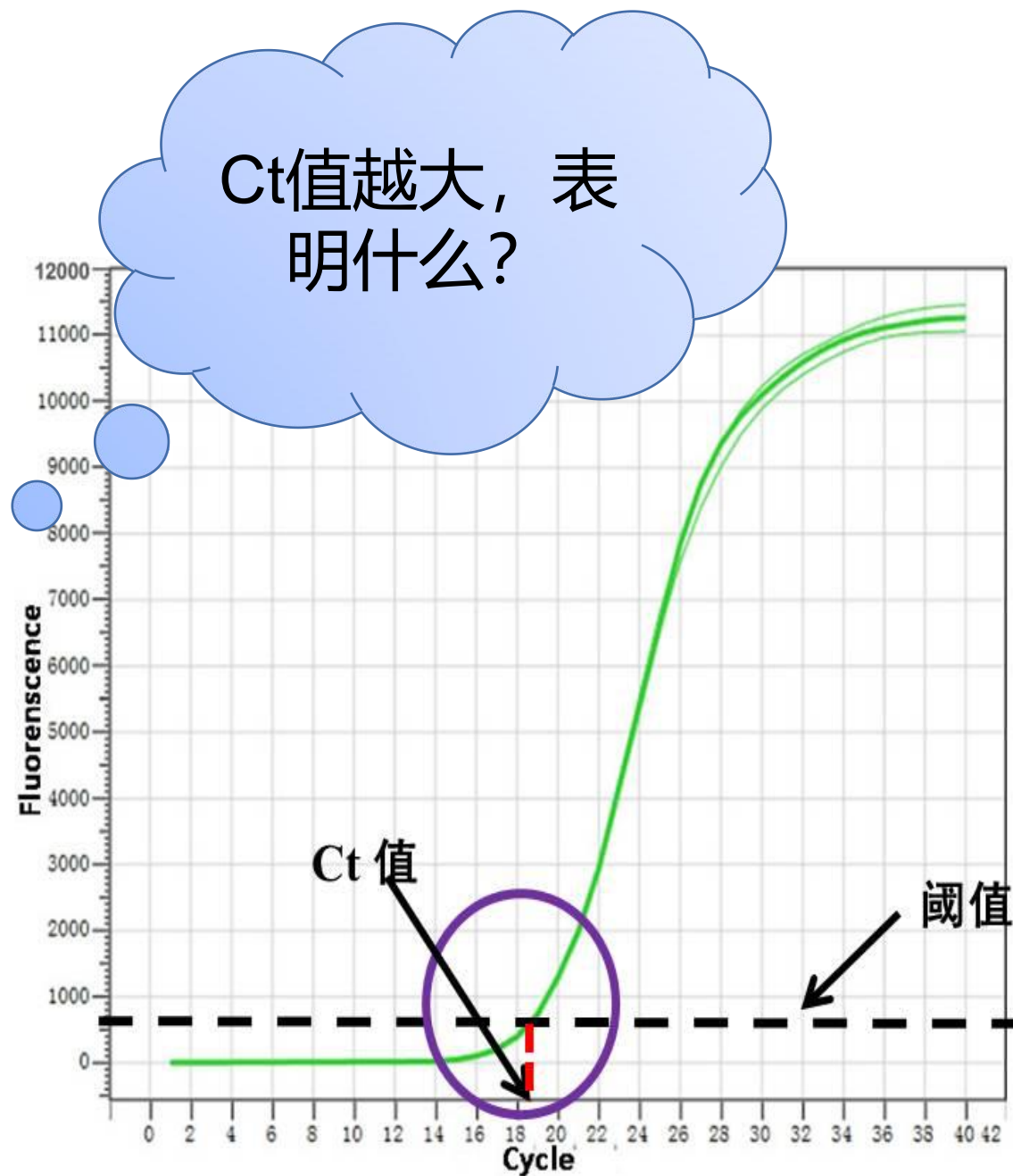
Ct值的含义是：每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。



3、荧光定量PCR

✓ Ct值与起始模板的关系

- ① 各模板的Ct值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，Ct值越小。
- ② 利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线，其中横坐标代表起始拷贝数的对数。
- ③ 纵坐标代表Ct值。因此，只要获得未知样品的Ct值，即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。



3、荧光定量PCR

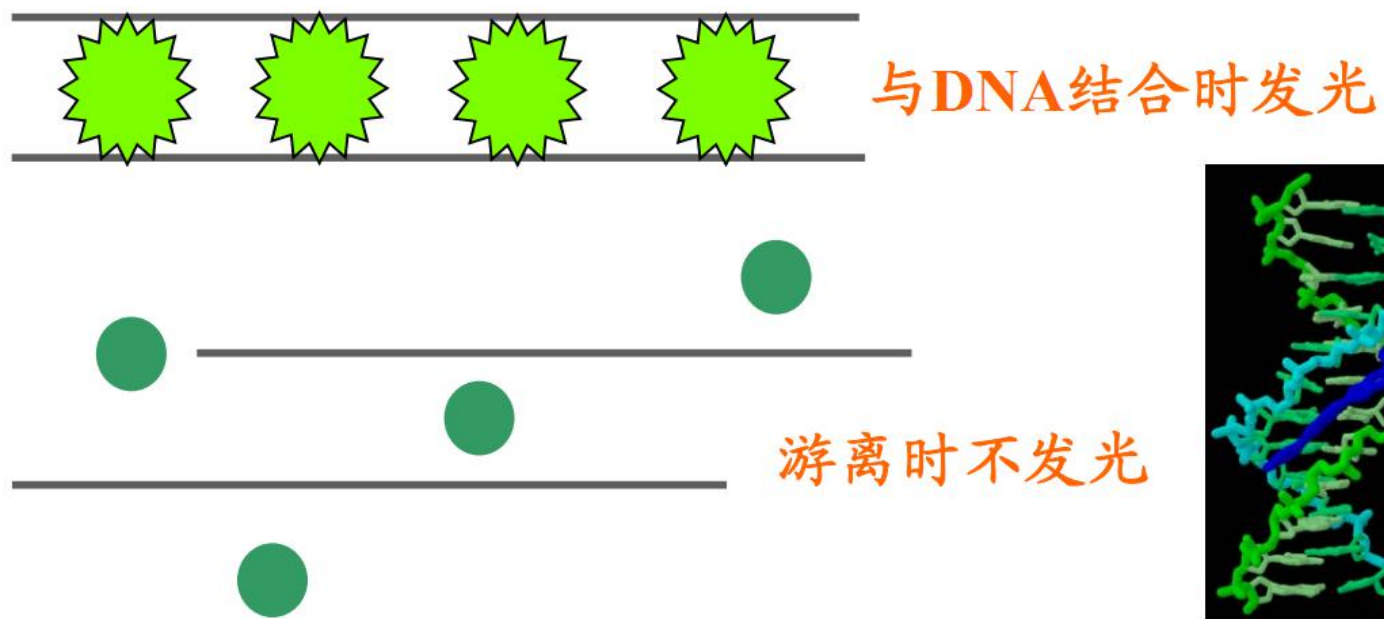
标记方法:

- ✓ 染料法: SYBR Green I
- ✓ 探针法: TaqMan

3、荧光定量PCR

✓非特异性荧光标记

•SYBR Green I是一种结合于所有dsDNA双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的原料。

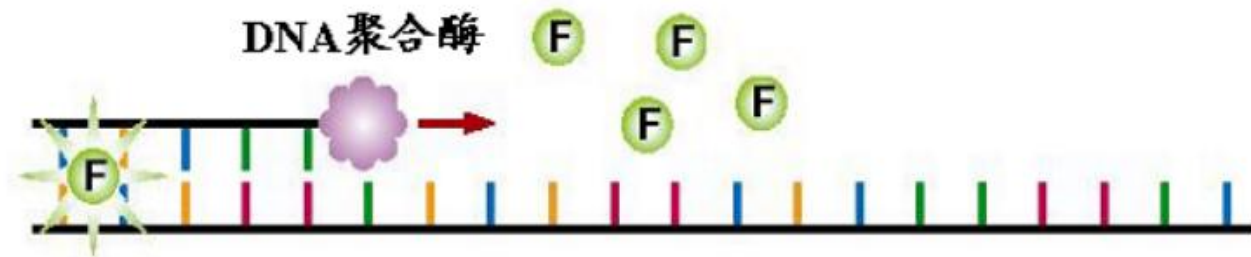


3、荧光定量PCR

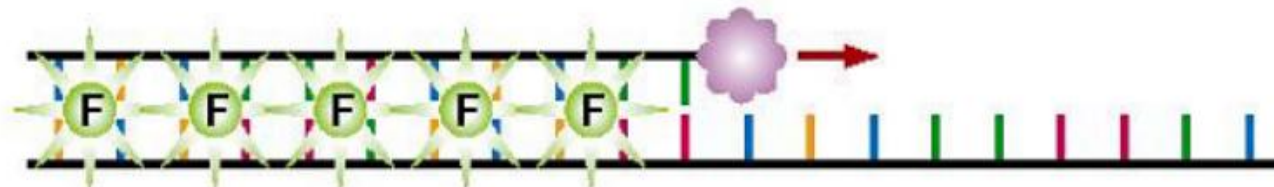
热变性



引物退火



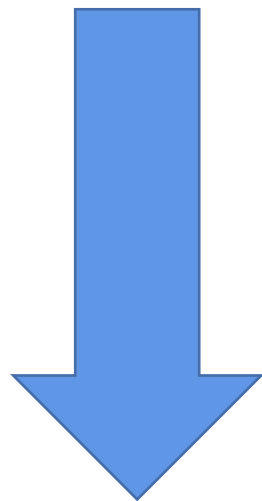
延伸反应



3、荧光定量PCR



- SYBR Green I与任何dsDNA进行结合后散发荧光
- 如果反应体系中有非特异性扩增或者引物二聚体的生成，会发生什么？

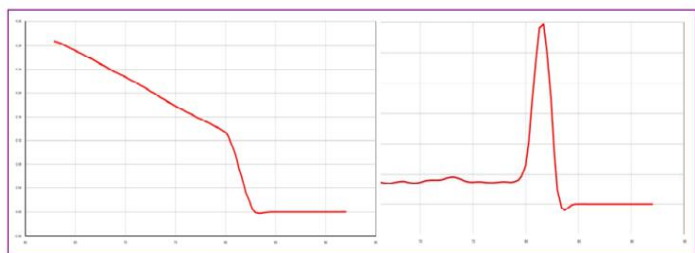


设计合适引物，防止非特异性扩增
反应结束进行熔解曲线分析

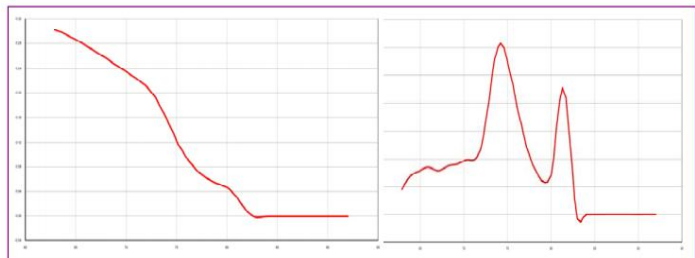
3、荧光定量PCR

• 熔解曲线

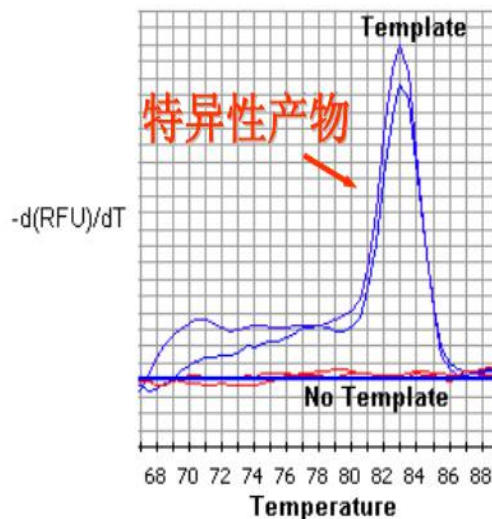
- 对PCR产物加热，随着温度的升高，双链扩增产物逐渐解链，导致荧光强度下降，到达某一温度时，会导致大量的产物解链，荧光急剧下降。
- 利用该特点以及不同PCR产物其 T_m 值的不同，因此使其荧光信号发生迅速下降的温度也不同，可通过此对PCR的特异性进行鉴定。



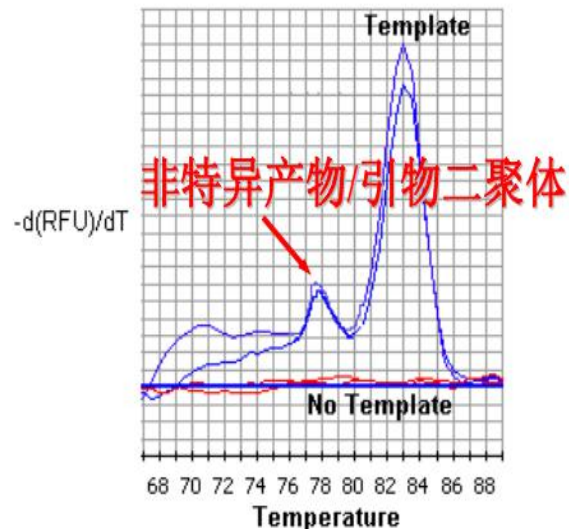
融解曲线分析，单一峰
无非特异性荧光
定量准确



融解曲线分析，出现杂峰
其他产物出现非特异性荧光，因此定量不准确



特异性产物



非特异产物/引物二聚体

3、荧光定量PCR

•优点

- (1)对DNA模板没有选择性----适用于任何DNA
- (2)使用方便-----不必设计复杂探针
- (3)非常灵敏
- (4)可做熔解曲线分析
- (5)便宜

•缺点

- (1)对引物特异性要求较高
- (2)与非特异性双链DNA结合，产生假阳性,干扰实验的准确性,尤其是分析表达量不高的基因时,这类情况尤其突出；需要不断的优化反应体系,降低非特异性扩增.

3、荧光定量PCR

✓特异性荧光标记

•Taqman探针法

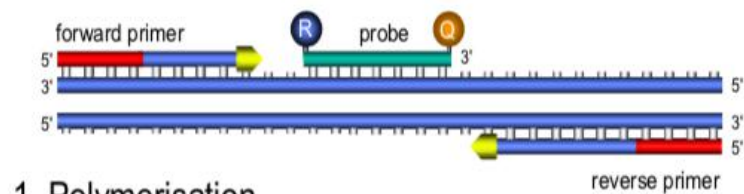
与目标序列互补



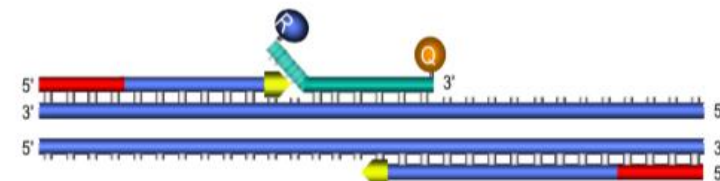
5' 端-报告基团
Reporter
3' 端-荧光淬灭基团
Quencher

- ✓ 探针完整，R所发射的荧光能量被Q基团吸收，无荧光，R与Q分开，发荧光
- ✓ Taq酶有 5'→3'外切核酸酶活性，可水解探针

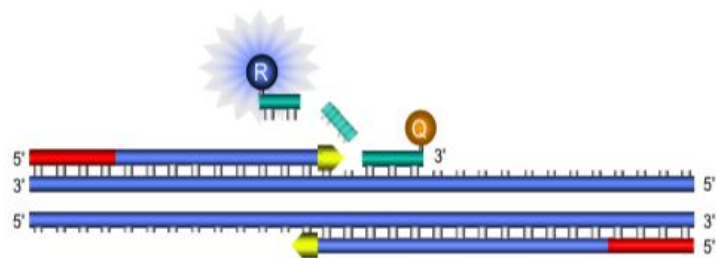
3、荧光定量PCR



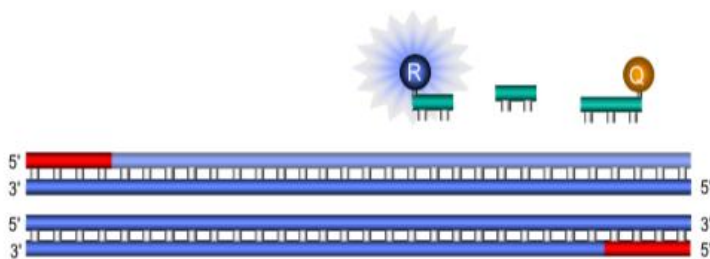
1. Polymerisation



2. Strand displacement



3. Cleavage



4. Polymerisation completed

每扩增一条DNA分子，
释放一个荧光信号，
可以在循环过程中任
一点检测荧光

3、荧光定量PCR

✓特异性荧光标记

•Taqman探针的设计原则

Probe 长度	★★	20-24bp
T _m 值	★★★★	探针的T _m 比引物高8-10℃
序 列	★	◆ 目的序列GC含量相对较高的区域设计 ◆ 整体上碱基不能过偏 ◆ 个别部分避免GC rich或AT rich (特别是3'端)避免T/C连续, A/C连续)
5'末端序列	★	探针5'末端的第一个碱基不能是G
互 补 性	★★★★	Probe内部或Probe与两条引物之间避免3base以上的互补序列
特 异 性	★★★★	BLAST检索确认Probe特异性

3、荧光定量PCR

- Taqman探针法

- 优点

- (1). 极高的特异性和准确性：由于探针法除了引物序列的特异性之外，还有探针序列的特异性，从两个方面保证了所扩增基因的特异性。

- (2). 良好的重复性

- 缺点

- (1). 目前合成价格较贵.

- (2). 不能做熔解曲线分析.

2、荧光定量PCR

