

# 实时定量 PCR 技术及其应用

王梁燕<sup>1</sup>, 洪奇华<sup>2\*</sup>, 张耀洲<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学生命科学学院, <sup>2</sup>动物科学学院, 杭州 310029)

**摘要:** 实时定量 PCR(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RQ-PCR) 技术是 20 世纪 90 年代中期发展起来的一种新型核酸定量技术。该技术具有实时监测、快速、灵敏、精确等特点, 是对原有 PCR 技术的革新, 扩大了 PCR 的应用范围。本文综述了 RQ-PCR 技术的原理、RQ-PCR 仪、RQ-PCR 实时定量检测系统及其应用。

**关键词:** 实时定量; PCR; 应用

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 0253-9977(2004)01-62-06

聚合酶链式反应(PCR)是一种体外扩增 DNA 片段的技术, 根据扩增策略和检测产物手段的不同, 可分为定性 PCR 和定量 PCR。PCR 技术自问世以来得到了不断发展, 20 世纪 90 年代中期发展起来的实时定量 PCR(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RQ-PCR)除了普通 PCR 的高灵敏性外, 还具有可直接监测扩增中的荧光信号变化获得定量结果, 精确性高; 定量和扩增同步进行, 克服了 PCR 的平台效应; 只需加样时打开一次盖子, 其后完全是闭管操作, 降低了污染; 不需 PCR 后处理; 只需 2~3 小时便能获得数据; 高通量, 几个反应可同时进行等优点。RQ-PCR 克服了传统定量 PCR 需后处理, 存在假阳性污染; 准确度不高; 电泳所用染色剂 EB 可能为致癌物质和需进行复杂的检测工作等不足。本文综述了目前国内外几种 RQ-PCR 技术的原理、RQ-PCR 仪、RQ-PCR 实时定量检测系统及其应用的研究进展。

## 1 RQ-PCR 的原理

RQ-PCR 技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。它在常规 PCR 基础上添加了荧光染料或荧光探针。荧光染料能特异性掺入 DNA 双链, 发出荧光信号, 而不掺入双链中的染料分子不发出荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物增加完全同步<sup>[1]</sup>。荧光探针法是将荧光共振能量传递(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术<sup>[2]</sup>应用于常规 PCR 中, 在探针的 5' 端标记一个荧光报告基团(R), 3' 端

标记一个淬灭基团(Q), 两者可构成能量传递结构, 即 5' 端荧光基团所发出的荧光可被淬灭基团吸收或抑制; 当两者距离较远时, 抑制作用消失, 报告基团荧光信号增强, 荧光监测系统可接收到荧光信号。

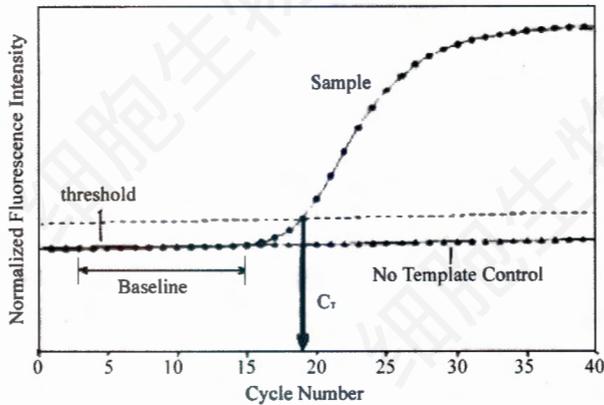
利用以上荧光产生原理, 在 PCR 过程中可以连续不断地检测反应体系中荧光信号的变化。当信号增强到某一阈值(PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 阈值的缺省设置为 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍)时, Ct 值被记录下来。C 代表 Cycle, t 代表 threshold, Ct 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数(如图 1 所示)。每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系<sup>[4]</sup>, 起始拷贝数越多, Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线, 其中横坐标代表起始拷贝数的对数, 纵坐标代表 Ct 值(如图 2 所示)。这样, 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。

## 2 RQ-PCR 仪

RQ-PCR 需用特定的 RQ-PCR 仪。RQ-PCR 仪由热循环仪(PCR 仪)、荧光检测系统和计算机及软件系统三部分组成。当样品通过仪器中的光电二极管时, 用完整的光源激发并实时记录荧光。有些仪器按顺序扫描样品, 有的可同时扫描所有样品使实验时间缩短。各种仪器能检测到的波长数和光学频

收稿日期: 2003-05-23; 修回日期: 2003-06-30

\* 通讯作者, E-mail: hongandwang@zju.edu.cn

图1 Ct值的确定<sup>[3]</sup>

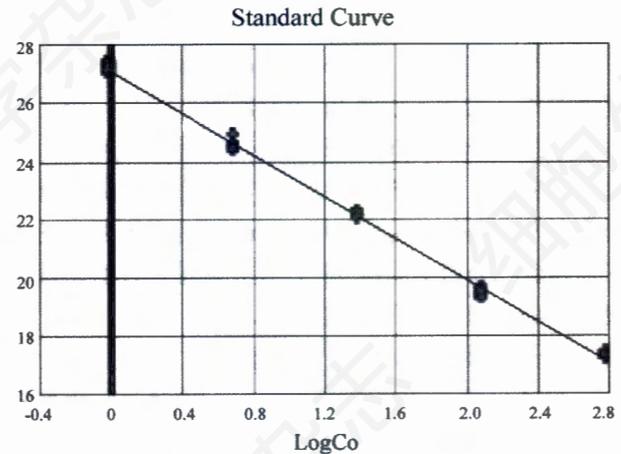
率范围不同;能区分的波长数越多,频率范围越宽,仪器的灵敏性越好<sup>[5]</sup>。在每个扩增循环中,荧光在一个特殊的检测系统依赖点被检测到。周期性的监测产生荧光时间进程,显示在某一时刻的扩增子数量。由于荧光检测系统和数据分析软件与实时PCR仪构成整体,因而无需扩增后处理,从而使污染降到最低,并能快速得到实验结果。

1996年,美国应用生物系统公司(Applied Biosystems, ABI)的ABI PRISM®7700和5700、罗氏公司(Roche)的LightCycler™等率先投入商业使用。近几年,不同公司发展了各种类型的RQ-PCR仪,它们的扩增和检测全部自动化、耗时短、工作效率高。国内使用较多的有ABI PRISM®7000、7900、7700型和LightCycler™,其它还有Mx4000(Stratagene, TX, USA)、Icycler iQ(BioRad Laboratories Inc., CA, USA)、SmartCycler(Cepheid, CA, USA)和Rotor-Gene(Corbett Research New South Wales, Australia)、Opticon(MJ Research)等。ABI PRISM®7900等RQ-PCR仪可用于高通量(384孔板)检测,而ABI PRISM®7000和Opticon等RQ-PCR仪则利用了多色多通道技术。

### 3 RQ-PCR的实时定量检测系统

RQ-PCR的实时检测系统可分两类:一类是非特异性的双链DNA嵌入染料,如SYBR Green I;另一类是以杂交形式进行的单链检测系统,有水解探针(如TaqMan)、杂交探针(如Lightcycler)等。单链检测系统可通过在不同探针上标记不同波长的报告基团荧光素,来检测和定量多种DNA样品,因此,可在同一试管中同时定量多种靶基因。

#### 3.1 非特异性双链DNA嵌入染料(SYBR Green I)

图2 荧光定量标准曲线<sup>[4]</sup>

SYBR Green I是一种与双链DNA结合的染料。当它游离在溶液中时,不发出荧光;一旦掺入DNA双链,便发出强烈的荧光。它的最大优点是能用于任何模板的任何一对引物。然而,由于SYBR Green I能结合于任一双链DNA,包括靶DNA、引物二聚体和非特异性PCR产物,可能会造成定量不准确。解决这个问题方法很多,如使用严格设计、高特异性的引物,尽可能降低引物二聚体的形成,并优化反应条件;还可以用比较融解曲线的方法<sup>[6]</sup>,如LightCycler等PCR仪能分析反应的融解曲线,从而区分出靶DNA和引物二聚体结合的荧光量;此外,热启动PCR能降低引物二聚体的形成<sup>[7]</sup>。利用LightCycler仪,SYBR Green I方法已有许多成功应用,如细胞因子的定量、病毒荷载量的检测。

#### 3.2 水解探针(TaqMan)

此系统利用合适的DNA的5'-3'核酸外切酶(常用Taq酶)活性,特异性切割探针5'端的荧光基团<sup>[8]</sup>。该探针的5'端和3'端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。报告荧光基团可用FAM、TET、VIC、JOE及HEX,共价结合到寡核苷酸的5'端,它们可被3'端的淬灭荧光基团(如TAMRA)所淬灭。当溶液中有PCR产物时,该探针与模板退火,即产生了适合于核酸外切酶活性的底物,从而将探针5'端连接的荧光分子从探针上切割下来,破坏了两荧光分子间的FRET,发出荧光。TaqMan探针已被广泛应用于科研和诊断,如基因检测、病毒定量、宫颈癌中微转移分子的定量和细胞因子的定量等。但探针需两次修饰,本底较高,成本也高。

2000年,美国Applied Biosystems公司开发了一种新的TaqMan探针——MGB探针。这种探针采用非

荧光淬灭基团,大大降低了本底信号的强度。同时探针上还连接有 MGB (Minor Groove Binder) 修饰基团,可以将探针的  $T_m$  值提高  $10^{\circ}\text{C}$  左右。因此,为了获得同样的  $T_m$  值, MGB 探针可以比普通 TaqMan 探针设计得更短,既降低了合成成本,也使得探针设计的成功率大为提高。实验证明, TaqMan MGB 探针对等位基因的区分得更为理想<sup>[9]</sup>,甚至能检测仅有单核苷酸差异的等位基因的表达水平。

### 3.3 分子灯标(Molecular beacon)

分子灯标由 Tyagi 和 Krammer<sup>[10]</sup>建立。该探针为单链 DNA,呈茎环结构,环部与靶 DNA 序列互补,为 15~35bp;茎部核苷酸互补,但与靶 DNA 无序列同源性,约 8bp。分别在探针的 5' 端和 3' 端标记报告荧光基团和淬灭荧光基团。游离时,分子灯标由于一端报告荧光基团和另一端淬灭基团紧密相邻,发出的荧光被淬灭<sup>[11]</sup>;在 PCR 变性后复性阶段,探针的环部核苷酸序列与互补的靶序列结合,形成更稳定的杂交,破坏了茎环结构产生的 FRET,淬灭作用被解除<sup>[12]</sup>;在 PCR 延伸阶段,分子灯标又从模板上解离,重新形成茎环结构,荧光消失。随着每次扩增产物的积累,荧光强度增加,可反映出每次扩增末扩增产物积累的量。该法探针可循环利用,但标记较复杂,要求游离在溶液中时无选择性折叠,以免造成部分淬灭和荧光本底;同样,如果茎结构的热力学温度过高,则会影响探针与靶序列杂交。分子灯标尤其适合于鉴定点突变。它们能区别仅单个核苷酸差异的 DNA,并且特异性要比常规等长的寡聚核苷酸探针更明显<sup>[12,13]</sup>。主要用于突变检测、病原体定量、病毒复制和胎儿的性别检测,也有报道用多元 PCR 检测不同的病毒。

发卡式引物(sunrise primer)<sup>[14,15]</sup>是对分子灯标的发展,在延伸时整合进它们的特异扩增子,产生荧光信号。其特异性仅依赖于引物序列。此法能将所有扩增产物均标记上荧光分子,因此荧光信号响应快。但无法区分特异和非特异扩增是其最大不足。

蝎状引物(scorpion primer)<sup>[16]</sup>是对发卡式引物的进一步改进。该技术在引物与分子灯标探针之间连接一个间隔臂,使 PCR 延伸反应时不能够延伸至分子灯标。这样,非特异扩增产物便无荧光信号;当有特异扩增产物时,即可与分子灯标进行杂交,产生荧光信号。既解决了非特异问题,又保留了响应快的特点。但仍存在问题:杂交时探针不能完全与模板匹配,且探针合成复杂。在 Lightcycler 循

环仪上已证明蝎状引物胜过 TaqMan 探针或分子灯标,尤其是在快速循环条件下<sup>[17]</sup>。

Kuhn 等<sup>[18]</sup>利用基于肽核酸的分子灯标(PNA-based MB),使目标双链 DNA 不须变性能与灯标结合,克服了常规分子灯标只有在目标核酸变性条件下才能与灯标结合的不足。

### 3.4 双杂交探针(Lightcycler)

此系统中用了四种寡聚核苷酸:两种引物和两种探针。两个探针各有一个标记,以头尾相接的方式与靶扩增子退火<sup>[19]</sup>。一个探针的 3' 端供体分子被循环仪的光源激发后,产生从供体到毗邻探针(相差 1~5 核苷酸) 5' 端受体基团的 FRET。由于只有当两个探针都结合于模板时才产生荧光,因而特异性高,但影响扩增效率。另外,需合成两个探针,成本提高。应用的例子有:治疗后最小残留病的检测、突变检测、病原体检测和病毒荷载定量。

### 3.5 双探针(Bi-probes)

双探针利用 FRET 技术,但只有一个扩增特异性探针,标记 FRET 受体;SYBR Green I 作为 FRET 供体<sup>[20]</sup>。此法可减少非特异性荧光信号,但易形成引物二聚体降低可信度,使靶 DNA 拷贝数偏低。

## 4 RQ-PCR 技术的应用

### 4.1 病原体检测

RQ-PCR 技术可以快速、准确定量测出高至  $10^{10}$ ,低至  $10^0$  个拷贝数的病原体,定量范围极宽。目前该技术已经应用于细菌、病毒、衣原体、支原体、寄生虫等许多病原体的检测研究。

以前对乙肝病毒(HBV)的检测主要依靠间接指标——乙肝表面标志物。而仅仅根据 HBsAg 阳性或阴性,在临床应用中很难判断患者体内病毒是否处于复制期,病毒复制的量又如何,以及患者是否具有传染性等。虽然常规 PCR 方法也能定性检测 HBV,而 RQ-PCR 能快速和精确定量,更好地解决了这一难题<sup>[21]</sup>,如 RQ-PCR 检测 HBV-DNA 的结果为  $10^1\sim 10^5$  拷贝/ml 时,表明病毒复制水平低,传染性较弱;而当 HBV-DNA 大于  $10^5$  拷贝/ml 时表明病毒复制水平高,传染性较强。另外,HBV-DNA 的定量检测可及时灵敏地监测患者药物治疗的效果。

Makino 等<sup>[22]</sup>在一百升纯化空气加入炭疽杆菌细胞,用炭疽特异性引物进行 RQ-PCR 检测,1 小时内炭疽杆菌的单个细胞就被 RQ-PCR 检测到,表明 RQ-PCR 可快速检测空气传播的细菌孢子,为阻

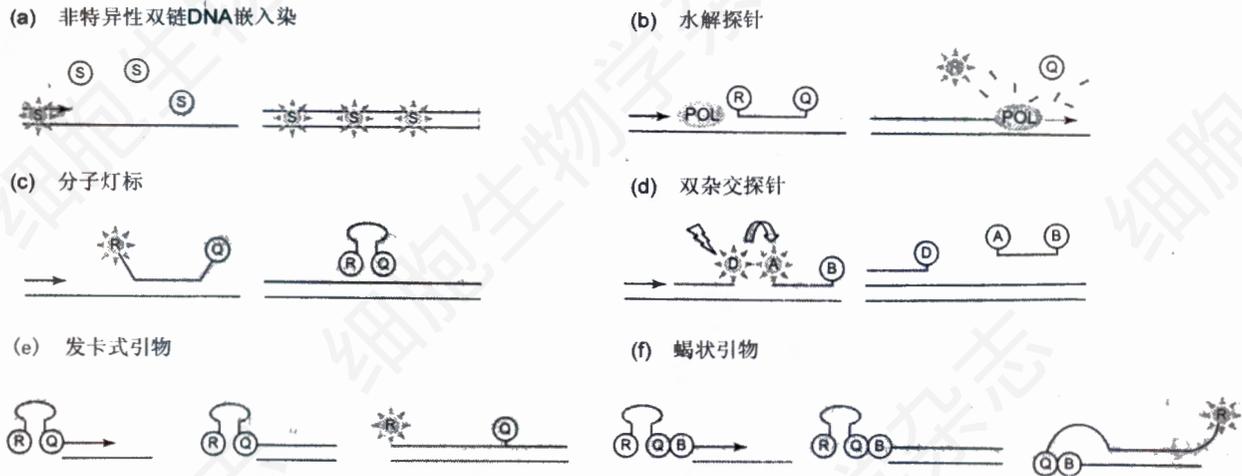


图3 RQ-PCR 技术中所用的荧光检测系统 (分别示退火和延伸)<sup>[19]</sup>

(a) 染料自由存在于溶液中时, 不发出荧光; 当 SYBR Green I 与 双链 DNA 结合时, 靶 DNA 产生荧光。

(b) 变性后, 引物和探针均与靶 DNA 退火, 由于报告荧光基团和淬灭基团距离很近, 不发出荧光; 延伸阶段, 探针被具 5'-3' 核酸外切酶活性的 Taq 酶切割, 报告荧光基团和淬灭荧光基团分离, 发出荧光。

(c) 探针呈茎环结构, 报告荧光基团和淬灭基团紧密相邻, 不发出荧光; 当探针与靶 DNA 杂交时, 探针发生构象变化形成线性结构, 报告荧光基团和淬灭荧光基团分离, 结果使荧光增加。

(d) 两探针分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭基团; 探针以头尾相接的方式与靶 DNA 退火, 使供体和受体荧光基团紧密相邻, 不发出荧光。

(e) 只有当引物整合进扩增产物和随后的延伸阶段, 才引起供体和受体基团的分离, 产生荧光; 在退火阶段, 发夹结构重建, 抑制了荧光信号。

(f) 引物整合进特异的扩增产物, 但茎环结构尾部受间隔臂保护; 随后的退火阶段, 环部与扩增子的互补序列结合, 供体和受体基团分离, 产生荧光; 延伸阶段, 探针结构分离, 重新形成发夹结构, 荧光淬灭。

止传染病的流行提供了灵活而强有力的工具。

#### 4.2 基因表达研究

在基因表达研究中, 常用的方法有 Northern 印迹、RT-PCR 定量法等, 而 RQ-PCR 对 mRNA 的检测比 Northern 印迹、RT-PCR 定量法要方便、快速、准确得多。

RQ-PCR 方法能检测各种组织细胞中基因的表达丰度, 从而分析基因的表达调控<sup>[23]</sup>、监控 mRNA 表达模式<sup>[24]</sup>、检测组织中少量存在的基因<sup>[25]</sup>、跟踪细胞群体中克隆型<sup>[26]</sup>、定量分析基因在不同组织中的转录水平等。RQ-PCR 也用来研究各种处理如受病毒感染对细胞 mRNA 含量变化的影响<sup>[27, 28]</sup>、锻炼等对 mRNA 表达的影响<sup>[29]</sup>, 以及比较染病组织与正常组织中各 mRNA 含量、不同组织中基因表达情况等。

#### 4.3 基因突变及多态性研究

扩增 DNA 的核苷酸序列不需要分子克隆、宿主细胞内的生长准备, 即可在媒介中的生物分子纯化过程中直接测得, 因此 RQ-PCR 可用于检测特异突变基因。利用 RQ-PCR 和有关的间接测序方法, 可对已知 DNA 序列进行基因突变及多态性的分析,

如对已知 DNA 序列进行位置突变基因及序列多态性的定位, 扩增 DNA 限制性位点检测遗传变异等。

Ulrike 等<sup>[30]</sup>用 RQ-PCR 建立了快速、精确的细胞色素 P450 2D6 基因分型的方法。用 RQ-PCR 和荧光熔点鉴别 5 个重要的与代谢疾病相关的突变 (CYP2D6\*4, \*7, and \*8) 和缺失 (CYP2D6\*3 and \*6)。分别用 RQ-PCR 和等位基因特异性多元 PCR, 检测来自 323 个个体的 DNA 中 CYP2D6 基因多态性。检测的结果通过序列分析核实, RQ-PCR 基因分型 100% 可靠, 而传统的等位基因特异性多元 PCR 中 12.1% 样品不能确定。

#### 4.4 肿瘤研究

肿瘤基因的遗传学改变的积累是致癌性转变的根本原因。癌基因的表达增加和突变在许多肿瘤早期和良性阶段就可出现。RQ-PCR 不但能有效地检测基因的突变, 而且能准确测定表达量, 可进行肿瘤的早期诊断和治疗效果及预后的判断。Stahlberg 等<sup>[31]</sup>研究认为, 通过检测肿瘤标记, RQ-PCR 适合于高通量检测癌症。Mitas 等<sup>[32]</sup>研究还表明 RQ-PCR 方法非常适合分析微量入侵的淋巴结组织, 该技术

不需手术便可以进行活组织切片检查。

#### 4.5 转基因安全检测

在转基因食品、疫苗和治疗中介入外源物质可能会引起危险。因此,在安全检测中,利用高敏感的PCR来检测这些物质是很关键的。RQ-PCR可用于对转基因产品的检测和定量。根据目前转基因技术中使用的基因构件主要来源于花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子和农杆菌的NOS终止子,绝大部分转基因产品含有这两个基因片段,用RQ-PCR检测定量35S启动子和NOS终止子就可达到简便、快速、准确的检测转基因产品的目的。

RQ-PCR在生物安全检测中的应用还有:动物中基因治疗载体的生物分布的确定、生物疗法中残留DNA的定量、污染细胞库和终产物中病毒和细菌核酸检测、有效清除病毒研究中病毒清除水平的定量、疫苗中逆转录病毒活性的特异性检测、以及遗传稳定性监控中转基因拷贝数的确定等。

#### 5 RQ-PCR 技术展望

准确、灵敏、快速和经济的RQ-PCR技术已发展成为一项完全自动化的核酸定量技术,大大降低了假阳性率,工作效率高,结果重现性好,且不必使用对人体有害的染色剂。RQ-PCR应用较多的是医学方面,较成熟主要是在病原体检测方面。在植物学、动物学等领域的研究中,该技术应用还较少。随着RQ-PCR技术与生物芯片技术<sup>[33]</sup>、肽核酸技术<sup>[34]</sup>、微解剖技术<sup>[35]</sup>等先进技术的整合,RQ-PCR应用前景将越来越广阔。

#### 参 考 文 献

- [1] ABEA, INOUE K, TANAKA T, KATO J, *et al.* Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**(9): 2899 — 2903.
- [2] OZAKI H, MCLAUGHLIN L W. The estimation of distances between specific backbone-labeled sites in DNA using fluorescence resonance energy transfer[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 5205 — 5214.
- [3] LOVATT A. Application of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products [J]. *Molecular Biotechnology*, 2002, **82**: 279 — 300.
- [4] HIGUCHI R, HIGUCHI R, FOCKLER C, *et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions [J]. *Biotechnology*, 1993, **11**(9): 1026 — 1030.
- [5] WITTEWER C T. The LightCycler™ a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control [J]. *Biotechniques*, 1997, **22**: 176 — 181.
- [6] RIRIE K M, RASMUSSEN R P, WITTEWER C T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction [J]. *Anal Biochem*, 1997, **245**(2): 154 — 160.
- [7] KELLOGG D E, RYBALKIN I, CHEN S, *et al.* TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase [J]. *Biotechniques*, 1994, **16**: 1134 — 1137.
- [8] HOLLAND P M, ABRAMSON R D, WATSON R, *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 7276 — 7280.
- [9] KUTYAVIN I V, AFONINA I A, MILLS A, *et al.* 3-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 655 — 661.
- [10] TYAGI S, KRAMER F R. Molecular beacons: probes that fluorescence upon hybridization [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 303 — 308.
- [11] TYAGI S, BRATU D P, KRAMER F R, *et al.* Multicolor molecular beacons for allele discrimination [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 49 — 53.
- [12] BONNET G, TYAGI S, LIBCHABER A, *et al.* Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 6171 — 6176.
- [13] KABOE V O K, LUCHKINA L A, TRETIAKOV A N, *et al.* PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure)[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 94.
- [14] NAZARENKO I A, BHATNAGAR S, HOHMAN R. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 2516 — 2521.
- [15] WINN-DEEN E S. Direct Fluorescence Detection of Allele-Specific PCR Products Using Novel Energy-Transfer Labeled Primers [J]. *Mol Diagn*, 1998, **3**(4): 217 — 221.
- [16] WHITCOMBE D, THEAKER J, GUY S P, *et al.* Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**(8): 804 — 807.
- [17] THELWELL N, MILLINGTON S, SOLINAS A, *et al.* Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 3752 — 3761.
- [18] KUHN H, DEMIDOV V V, GILDEA B D, *et al.* PNA beacons for duplex DNA [J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001, **11**(4): 265 — 270.
- [19] WITTEWER C T, HERRMANN M G, MOSS A A, *et al.* Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification [J]. *Biotechniques*, 1997, **22**: 130 — 138.
- [20] BRECHTBUEHL K, WHALLEY S A, DUSHEIKO G M, *et al.* A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus [J]. *J Virol Methods*, 2001, **93**(1-2): 105 — 113.
- [21] LOEB K R, JEROME K R, GODDARD J, *et al.* High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA serum using the TaqMan fluorogenic detection system [J]. *Hepatology*, 2000, **32**(3): 626 — 629.
- [22] MAKINO S and CHEUN H. Application of the real-time

- PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores [J]. *J Microbio Methods*, 2003, **53**(2): 141 — 147.
- [23] GIRARD B M, MAY V, BORA S H, *et al.* Regulation of neurotrophic peptide expression in sympathetic neurons: quantitative analysis using radioimmunoassay and real-time quantitative polymerase chain reaction [J]. *Regul Peptides*, 2002, **109**(1-3): 89 — 101.
- [24] WICKERT L, STEINKRÜGER S, ABIAKA M, *et al.* Quantitative monitoring of the mRNA expression pattern of the TGF- $\beta$ -isoforms ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3) during transdifferentiation of hepatic stellate cells using a newly developed real-time SYBR Green PCR [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **295**(2): 330 — 335.
- [25] HIROSHI S, KAZUE O, YONEMURA K, *et al.* Quantitative PCR to evaluate small amounts of BCL2 mRNA in human peripheral T cells: implication of equimolar target and competitor end products [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2003, **328**(1-2): 147 — 153.
- [26] ALEXANDRA G, GILLES F, CHRISTIANE C, *et al.* Tracking T cell clonotypes in complex T lymphocyte populations by real-time quantitative PCR using fluorogenic complementarity-determining region-3-specific probes [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, **270**(2): 269 — 280.
- [27] DENG X, LI H, TANG Y. Cytokine expression in respiratory syncytial virus-infected mice as measured by quantitative reverse-transcriptase PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, **107**(2): 141 — 146.
- [28] WHITE T M, MAHALINGAM R, TRAINA V, *et al.* Persistence of simian varicella virus DNA in CD4(+) and CD8(+) blood mononuclear cells for years after intratracheal inoculation of African green monkeys [J]. *Virology*, 2002, **303**(1): 192 — 198.
- [29] MAEDA S, MIYAUCHI T, IEMITSU M, *et al.* Effects of exercise training on expression of endothelin-1 mRNA in the aorta of aged rats [J]. *Clin Sci*, 2002, **103**: 118S — 123S Suppl. 48.
- [30] ULRIKE M S, BAYERER B, WOLF S, *et al.* Rapid and Reliable Method for Cytochrome P450 2D6 Genotyping [J]. *Clin Chem*, 2002, **48**: 1412 — 1417.
- [31] STÅHLBERG A, ÅMAN P, RIDELL B, *et al.* Quantitative Real-Time PCR Method for Detection of B-Lymphocyte Monoclonality by Comparison of  $\kappa$  and  $\lambda$  Immunoglobulin Light Chain Expression [J]. *Biochemistry*, 2002, **35**(8): 591 — 596.
- [32] MITAS M, COLE D J, HOOVER L, *et al.* Real-time reverse transcription-PCR detects KS1/4 mRNA in mediastinal lymph nodes from patients with non-small cell lung cancer [J]. *J Clin Chem*, 2003, **49**: 312 — 315.
- [33] MARSHALL A and HODGSON J. DNA chips: an array of possibilities [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(1): 27 — 31.
- [34] COSTA J M, PAUTAS C, ERNAULT P, *et al.* Real-time PCR for diagnosis and follow-up of Toxoplasma reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(8): 2929 — 2932.
- [35] EHRIG T, ABDULKADIR S A, DINTZIS S M, *et al.* Quantitative amplification of genomic DNA from histological tissue sections after staining with nuclear dyes and laser capture microdissection [J]. *Mol Diagn*, 2001, **3**: 22 — 25.

## Real-time Quantitative PCR and Its Applications

WANG Liang Yan<sup>1</sup>, HONG Qi Hua<sup>2\*</sup>, ZHANG Yao Zhou<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup>College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** Developed in the mid 1990s for the analysis and quantification of nucleic acid, real-time quantitative PCR is a molecular biological technique gaining rapidly in popularity. The advancement provided by the real-time version of PCR is due to its unique ability to monitor the complete DNA amplification progress and other features such as rapidness, sensitivity and accuracy. Real-time Quantitative PCR has reformed the conventional PCR as well as enlarged applications. This article reviews the principle, instruments, detection systems for quantification and some applications of this new technique.

**Key words:** real-time quantitative; PCR; applications

\*Author for correspondence, E-mail: hongandwang@zju.edu.cn