

实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展

赵焕英 包金凤*

(首都医科大学北京神经科学研究所, 北京市神经再生修复重点实验室, 教育部神经变性病重点实验室, 北京 100069)

【关键词】 实时荧光定量 PCR; 荧光标记探针; DNA 结合染料

【中图分类号】 Q523.1 【文献标识码】 A

自从 1983 年 Mullis 发明聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 以来, PCR 技术很快成为科研、临床诊断的热点技术。但是传统 PCR 技术在应用中一是不能准确定量, 二是容易交叉污染, 产生假阳性。直到近年来荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术用于 PCR 定量后, 上述问题才得到较好的解决^[1]。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR) 是在 PCR 定性技术基础上发展起来的核酸定量技术。它是一种在 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。该技术不仅实现了对 DNA 模板的定量, 而且具有灵敏度高、特异性和可靠性更强、能实现多重反应、自动化程度高、无污染性、具实时性和准确性等特点, 目前已广泛应用于分子生物学研究和医学研究等领域^[2]。

1. 实时荧光定量 PCR 技术的概述

1.1 荧光共振能量转移原理

1992 年 Higuchi 等首次提出了采用动态 PCR 方法和封闭式检测方式对目的核酸数量进行定量分析, 荧光探针技术是基于标记基团的 FRET 原理而实现的, 当某个荧光基团的发射谱与另一个荧光基团的吸收光谱重叠, 且两个基团距离足够近时, 能量可以从短波长 (高能量) 的荧光基团传递到长波长 (低能量) 的荧光基团, 相当于短波长荧光基团释放的荧光被屏蔽, 这个过程称为 FRET。在探针 5' 端标记一个报告基团 (R), 在 3' 端标记一个淬灭基团 (quencher, Q), 两者距离很近时 (7-

10nm), 报告基团发出的荧光能被淬灭基团所吸收, 并依赖其较高的 S/N 比值 (信-噪比, signal-to-noise ratio) 和良好的辨别能力进行定量检测。

1.2 实时荧光定量 PCR 几个重要参数

① 荧光域值 (threshold): 以 PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 一般荧光域值定义为 3 - 15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。② Ct 值: 也称循环阈值, C 代表 Cycle, t 代表 threshold。Ct 值是指样品管的荧光信号达到某一固定阈值的 PCR 反应循环数。在 PCR 循环过程中, 即荧光信号开始由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环次数。在实际操作中, 这个时刻也就是每个反应管内的荧光信号到达设定的域值的时刻, 可见 Ct 值取决于阈值。③ ΔR_n : 是指模板 DNA 的起始拷贝数 (图 1 所示)。经数学证明, Ct 值与模板 DNA 的起始拷贝数 (ΔR_n) 成反比。典型的 PCR 分 4 个阶段 (图 2)。

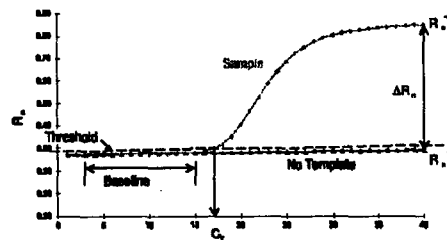


图 1 实时荧光定量 PCR 几个重要参数

Fig. 1 The important parameters of real time PCR

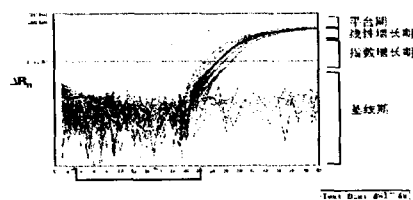


图 2 典型的 PCR 分 4 个阶段

Fig. 2 The 4 phases of real time PCR

【收稿日期】 2006-10-31 【修回日期】 2007-01-26

【作者简介】 赵焕英, 女 (1975), 汉族, 在读硕士研究生。

* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

2. 实时荧光 PCR 的分类

实时荧光 PCR 是在扩增产物聚集的过程中连续检测, 即“实时”检测, 根据在指数扩增期的产物量来推算初始模板的拷贝数^[3]。实时荧光定量 PCR 包括探针类和染料类两种, 探针类是利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加。染料类如 SYBR Green I 则是利用与双链 DNA 小沟结合发光的理化特征指示扩增产物的增加。前者由于增加了探针的识别步骤特异性更高; 但后者则简便易行、成本较低。

2.1 荧光标记探针

按其基因标记和能量转移的方式, 目前已经开发出几种相关的技术, 大体可以分为水解探针和杂交探针两类。如 Taq ManTM 探针 (水解探针)、Taq man MGB (水解探针) (Dual-oligo FRET pairs (双杂交探针)、Molecular beacons (杂交探针)、ScorpionsTM/AmplifluorTM (杂交探针)、Universal probe library LNA (locked nucleic acids (水解探针)、Lux (light upon extension 杂交探针)、Simple probe 探针等^[4]。

2.1.1 TaqMan 探针法

这种探针的长度为 20-24 bp, 在其 5' 末端标记一个荧光报告基团, 3' 末端标记一个荧光淬灭基团, 其序列与两引物包含序列内的一段 DNA 模板完全互补。该法利用 Taq 酶的 5' → 3' 外切酶活性, 当探针保持完整时, 淬灭基团吸收发射基团的发射荧光。当有特异的而不是非特异的 PCR 发生时, Taq 酶同时发挥其 5' → 3' 外切酶活性, 将与模板杂交上的探针切碎, 报告基团与淬灭基团分离, 淬灭作用被解除, 荧光信号释放, 可以检测到。荧光信号的强度与 PCR 反应产物的量成正相关。在 PCR 反应中设立标准品模板系列和阴性对照, 根据 FRET 原理, 探针完整时发射基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收。当 PCR 扩增时, Taq 酶的 5' → 3' 外切酶活性将探针酶切降解, 使荧光发射基团和荧光淬灭基团分离, 从而荧光监测系统可接收到荧光信号, 即每扩增一条 DNA 链, 就有一个游离的荧光分子形成, 实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步, 并计算出 R_n 值、ΔR_n 值、C_t 值和阈值。同时利用标准品模板系列绘制出标准曲线, 结合各样品的 C_t 值, 就可以确定样品的起初模板量。常用的荧光基团是 FAM、TET、VIC、HEX (图 3)。



图 3 TaqMan 探针

Fig. 3 TaqMan Probe

2.1.2 Taq man MGB

Taqman MGB 探针是 Taqman 探针的基础上改进的, 在探针的 3' 端增加了 MGB (minor groove binder) 分子, 这种物质能够结合在双链 DNA 小沟部位; MGB 提高了探针的 T_m 值, 从而使它能够分辨 1 个碱基的差别: 完全配对, 有荧光信号; 一个碱基不匹配, 则没有信号; 而且连在 MGB 分子后的是非荧光物质的淬灭基团, 因此使这种探针具备更好的淬灭效果且无背景荧光、荧光标记灵活、提高荧光信号的信噪比、提高退火温度、探针短、提高 SNP 识别率等优点。从而具备了更加广泛的应用前景 (图 4)。

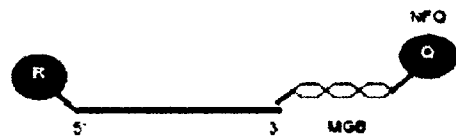


图 4 TaqMan MGB 探针

Fig. 4 TaqMan MGB probe

2.1.3 双杂交探针

双杂交探针是 Roche 公司新近开发的一种 PCR 定量技术, 也是依赖于 FRET 原理进行的。该技术的特点是将荧光基团和淬灭基团分别标记在发光探针的 5' 端和淬灭探针的 3' 端两个不同的探针, 两探针可与模板同一条链相邻的序列杂交, 杂交时两探针的荧光基团和淬灭基团便紧密相邻 (1-5 个碱基), 从而发生 FRET 而使荧光淬灭, 荧光淬灭的程度与起始模板的量成反比, 以此可以进行 PCR 定量分析。该方法的特点是淬灭效率高, 但由于两个探针结合于模板上, 因此影响扩增效率; 此外, 由于需要合成两个较长的探针, 合成成本相对较高, 常用的荧光基团是 LC-Red640 和 LC-Red705 (图 5)。

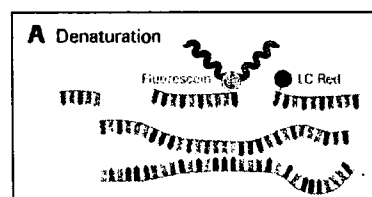


图 5 双杂交探针

Fig. 5 Two-hybrid probe

2.1.4 分子信标

分子信标 (molecular beacon) 技术是一种呈发夹结构的茎环双标记寡核苷酸探针, 环形部分的碱基可与目标核苷酸序列互补, 一般为 15-30 个核苷酸长; 茎部是由互相配对的碱基组成, 不能与目标基因相配对结合, 一般 5-7 个核苷酸长; 在 3' 和 5' 端分别接上发光基团和淬灭基团, 当溶液中有特异模板时分子信标与模板杂交, 从而破坏了发卡结构即实现了 FRET, 释放出荧光信号, 荧光的强度与溶液中分子信标的量成正比, 从而实现了目的基因的定量检测。当 PCR 扩增过程中, 靶序列 DNA 链不断增加, 探针与之杂交, 探针的发夹形结构被打开, 呈线性, 荧光报告基团与淬灭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 (图 6)。常用的荧光基团有 FAM 和 Texas Red。

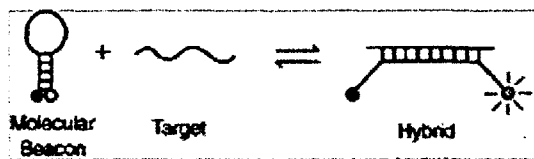


图 6 分子信标

Fig. 6 Molecular beacon

2.1.5 Amplisensor 检测系统

是由美国 Biotmics Tech 公司推出的荧光定量 PCR 检测系统, 其基本原理是先进行一次不对称扩增; 第二轮扩增时, 在双链信号引物的两条互补链上, 分别标记荧光供体和受体, 当信号引物处于双链结构时产生荧光。在 PCR 过程中, 变性使引物荧光基团分离, 复性时引物将优先与不对称扩增产物结合, 使引物不再产生荧光。Amplisensor 检测系统采用半套式扩增和双链引物, 特异性高, 灵敏度与竞争性 PCR 相似。

2.1.6 Universal probe library- LNA (locked nucleic Acids)

新近 Roche 公司研发并建立了人类和鼠的通用探针库, 其探针是由“锁定核酸”组成。他们通过分析人的转录组织中所有不同的可能的 8 至 9 碱基序列, 按照他们在转录组中出现的频率分类, 找出最普遍的 8 至 9 碱基序列模式制备成通用探针; 每一个探针可以与 7000 个转录子杂交。这种探针的特异性由探针和引物共同实现。LNA 是一种双 RNA 聚合的类似物, 其 2'-位的氧原子与核糖 4'-碳原子形成亚甲基的桥键, 并分别在 5' 和 3' 标记

上荧光报告基团和淬灭基团; LNA 单体掺入寡核苷酸序列可以增加形成体的 Tm 值, 其稳定性比 PNA 高 (PNAS2000, 97: 5633-5638)。因 LNA 与 DNA 杂交较 DNA 与 DNA、DNA 与 RNA 甚至 PNA 与 DNA 杂交有更高的亲和性, 故这种探针稳定性最好; 而且探针实现了设计迅速简单、低成本的水解探针特点。一般上其公司网站后, 输入基因序列号, 就能订制, 无需检测引物二聚体和非特异性片段。因此 LNA 技术实现了高熔点和特异性结合特点; 可以用于所有的荧光定量 PCR 仪 (图 7)。

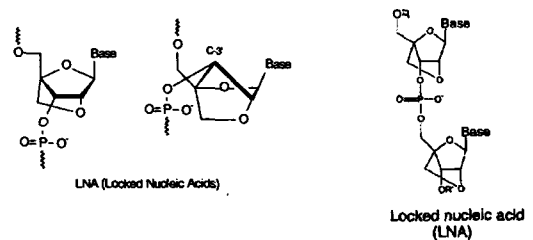


图 7 LNA 结构

Fig. 7 LNA structure

2.1.7 LUX 引物

LUX (light upon extension, LUX) 引物运用高灵敏度的荧光检测系统实时监控每个循环; 并利用累积荧光强度, 通过确立 Ct 值的方法确立样品起, 使引物始模板数从而实现定量。使用 LUX 引物不需要专门设计探针即节省了成本又给实验设计提供了宽松的条件。由于没有探针控制特异性, 因此它的特异性要弱于探针技术, 但不受非特异性扩增或引物二聚体影响, 所以其特异性和灵敏度均较高 (图 8)。



图 8 Lux 工作原理

Fig. 8 The function mechanism of Lux

2.1.8 Simple 探针

最近 Roche 公司生产一种简单探针, 这种探针只在 5' 端标有报告荧光, 在报告荧光和 5' 端之间连接一种称作“linker”的结构, 只有在变性阶段, 探针与目标序列互补结合时, 引起“linker”结构发生改变, 从而报告荧光基团的荧光得以显现。这种探针的好处是不用淬灭基团, 从而无背景荧光 (图 9)。

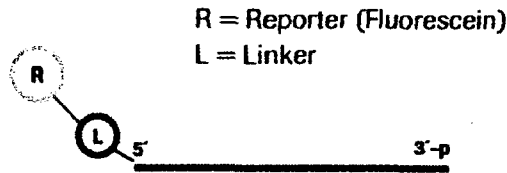


图9 Simple 探针

Fig. 9 Simple Probe

2.2 双链 DNA (dsDNA) 结合染料

目前用于实时 PCR 的 dsDNA 结合染料, 主要有 SYBR Green I 和 LC Green TMI^[5]。

2.2.1 SYBR Green I

是一种非饱和菁类荧光素, 可以嵌合于 DNA 双链结构的小沟中。其处于游离状态时, 检测不到荧光信号, 当结合 dsDNA 后荧光强度明显增强, 即被荧光探测系统检测到, 荧光强度的增加与初始模板量相关, 可以进行定量 DNA 分析, 已有应用于临床诊断和科学研究中的报道。SYBR Green 染料法与探针法相比, 其优势在于检测方法简便, 同时降低了检测成本。但是, 由于该染料能够结合任何 dsDNA 分子, 因此不能保证 PCR 的特异性。可以通过优化 PCR 的反应条件, 减少或去除非特异性产物和引物二聚体的产生, 另外, 也可以借助融解曲线分析法来区分非特异性产物和引物二聚体而进行定性诊断 (图 10)。



图 10 SYBR green I

Fig. 10 SYBR Green I

2.2.2 LC Green TMI

是最新出现的一种 dsDNA 结合染料, 与 SYBR Green I 相比, 该染料是一种饱和结合染料, 能够完全结合 dsDNA 分子, 可直接加入 PCR 反应体系中, 高浓度的 LC Green TMI 不会抑制 PCR 反应。已有文献报道在 PCR 反应体系中加入 LC Green TMI, 使用一对引物, 一个不作标记的探针, 结合常规融解曲线或仅使用一对引物, PCR 结束后通过分析融解曲线的形状和融解温度 (T_m 值) 的大小, 对纯合子和杂合子以及寡核苷酸序列多态性 (SNP) 进行鉴别。LC Green TMI 染料法简便、快速、精确性高, 预期将会有很好的应用前景。

3. 实时荧光 PCR 的定量方法

在实时荧光 PCR 中, 模板的定量有两种方法: 绝对定量和相对定量。绝对定量指用已知的标准曲线来推算未知的样本量; 相对定量指在一定样品中靶序列相对于另一参照序列的量的变化。由于每个模板的 CT 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 利用已知起始 DNA 浓度的标准品可做出标准曲线。

3.1 绝对定量

绝对定量 FQ-PCR 一般采用外标准品定量的制备来实现绝对定量, 可以通过化学合成目的基因; 或是将 PCR 扩增产物直接梯度稀释; 或是将 PCR 产物克隆到载体上, 然后抽提质粒, 经过测量浓度和拷贝数可准确定量, 它的优点是稳定、准确^[6]。质粒 DNA 和体外转录的 RNA 常作为绝对定量的标准品。将标准品稀释成不同浓度的样品, 并作为模板进行 PCR 反应。以标准品拷贝数的对数值为横坐标, 以测得的 Ct 值为纵坐标, 绘制标准曲线。对未知样品进行定量时, 根据未知样品的 Ct 值, 即可在标准曲线中定出样品的拷贝数。做好标准曲线至关重要, 对于 RNA 样品, 标准品最好是体外转录的 RNA, 如果用 cDNA、PCR 产物作为标准品, 虽然制备简单易于保存, 但是将会因为标准品无法准确指示样品反转录效率, 而给最终定量起始拷贝数带来影响。绝对定量也具有相应的缺陷, 标准品的稳定保存很难获得成功。目前广泛使用的在 260 nm 波长下定量的方法与众多因素有关, 如水、缓冲液、仪器性能, 乃至核酸的抽提过程都会影响到结果的稳定性。

3.2 相对定量

相对定量是指在测定目的基因的同时测定某一内源性管家基因, 该管家基因主要是用于核苷酸的拷贝数的比较、反映反应体系内是否存在 PCR 扩增的影响因素, 通常选用的管家基因有 GAPDH、 β -2 微球蛋白和 rRNA^[7]。使用的 β -actin、相对定量较为早期的方法是用一系列已知外参物做标准曲线, 根据该标准曲线得到目的基因和管家基因的量, 再将目的基因同管家基因的比值作为定量的最后结果。此种方法计算出未知样品的量是相对于某个参照物的量而言, 因此, 相对定量的标准曲线比较容易制备, 对于所用的标准品只需知道其稀释度即可。在整个试验中, 待测样品的量来自于标准曲线, 最终必须除以参照基因的量, 即参照基因是 1 \times 的样本, 其他的样本为参照基因的 n 倍。由于管家基因在各种组织中的恒定表达, 所以可用管家基

因的量来作为标准,以比较来源不同的样本,目的基因表达量的差异,此即相对定量。这一方法的缺陷是要求外参、目的基因和管家基因的扩增效率一致;此外加入已知起始拷贝数的内标相当于是进行双重 PCR 反应,存在两种模板相互的干扰和竞争^[8]。

3.3 比较 Ct 值法

即 ΔCT 值法,该方法是同时扩增待测靶基因片段和一个作为内参照的基因片段,一般是一个内源性管家基因片段。这两个扩增反应可在 2 管中分别进行,也可在同一反应管中进行,测得两者的 CT 值之差,即 ΔCT 。该方法不需要标准曲线。它是根据 PCR 扩增反应的原理,假设每个循环增加倍的产物数量 PCR 反应的指数期得到扩增产物的值来反映起始模板的量通过数学公式来计算相对量。比较 Ct 法与标准曲线法的相对定量的不同之处在于其运用了数学公式来计算相对量,前提是假设每个循环增加一倍的产物数量,在 PCR 反应的指数期得到 Ct 值来反应起始模板的量,一个循环 (Ct = 1) 的不同相当于起始模板数 2 倍的差异。比较不同待测标本 DNA 的 ΔCT 值与正常标本 DNA 的 ΔCT 值的变化,即可对未知标本靶基因的原始拷贝数作出判断,从而对病理状态进行判断或诊断。但是此方法是以靶基因和内源控制物的扩增效率基本一致为前提的,效率的偏移将影响实际拷贝数的估计^[9]。最终结果也是靶序列和参考品的相对比值。该方法需确定靶序列和参考品的扩增效率是否一致;如不一致,则会影响结果的准确性。

4. 实时荧光 PCR 技术的应用

实时荧光 PCR 技术已广泛应用于临床及生命科学研究的各个领域。在科研方面可定量分析各种基因的表达分析,基因突变和多态性分析,单核苷酸多态 SNP 测定及易位基因的检测;在医疗方面可用于免疫组化分析、临床疾病早期诊断、病原体检测、耐药性分析、肿瘤微小残留病变研究等^[10]。以下就其在基因工程研究、病原体的检测和肿瘤分子诊断等方面的应用及其新进展作一简述。

4.1 基因工程研究领域

实时荧光定量技术的出现不仅加强了有关对基因的量的研究方法,而且也加强了对基因的质所发生变化的研究。它可以检测基因突变和基因组的不稳定性,已经被广泛应用于遗传分析^[11]。

4.1.1 基因表达研究

有不同的荧光报告基团标记的探针分别与野生型和突变基因杂交,探针杂交的效率和其后的切除与杂交有关。如果一种染料的荧光信号明显强于另一种,说明它是一个纯合子,如果荧光信号都增加则表明是一个杂合子。刘敬忠等报道使用 dsDNA 结合染料 SYBR Green I,结合融解曲线分析对 α -地中海贫血纯合子、杂合子作出诊断^[12]。使用双色荧光标记探针,结合不同的引物设计,可以实现对某些先天性疾病的定量检测。应用实时荧光定量 PCR 方法对 β 地中海贫血症 (β 地贫) 患者 β 与 γ 珠蛋白 mRNA 水平进行检测,其结果特异性强、定量准确,为了解 β 地贫的分子病理机制及其临床诊断提供了可靠的检测数据。迄今对遗传性物质改变引起的疾病还无法根治,只能通过产前监测和产前基因诊断,减少病婴出生^[13]。因此,实时荧光定量 PCR 方法可用于产前监测和产前基因诊断。

4.1.2 单核苷酸多态性 (SNP) 及突变分析

实时荧光定量 PCR 一个诱人的应用前景是用于检测基因突变和基因组的不稳定性^[14]。基因突变的检测基于两条探针,一条探针横跨突变位点,另一条为锚定探针,与无突变位点的靶序列杂交。两条探针用两种不同的发光基团标记。如靶序列中无突变,探针杂交便完全配对,如有突变,则探针与靶序列不完全配对,会降低杂交体的稳定性,从而降低其熔解温度 (T_m)。这样便可对突变和多态性进行分析。

4.1.3 转基因研究

Tesson 等确定了实时定量 PCR 的技术条件,利用两种发光探针及适当的循环域值,扩增一个转移后的基因和一个对照基因,以分析转基因鼠的接合性^[15]。同型结合的和异质接合的动物交配后其子代中转基因的传递情况符合孟德尔遗传规律,通过实时定量 PCR 检测,该方法为转基因动物的同型结合及异质接合提供了明确的鉴定结果。这项技术在转基因动物繁育及基因剂量功能效应实验中将有很大用途。

4.2 肿瘤分子诊断

肿瘤的本质是细胞内基因发生了变化,是一种多基因异常的疾病,这些异常变化用实时荧光定量 PCR 方法都可以检测出来。目前用此方法进行过端粒酶 hTERT 基因、慢性粒细胞性白血病 ER 基因、肿瘤 MDR1 基因等,尽管肿瘤发病的分子机制尚未完全阐明,但相关基因的遗传学改变的积累是致癌性转变的根本原因之一已得到普遍承认^[16]。

癌基因的突变和表达增加,在许多肿瘤早期就出现。实时荧光 PCR 技术不仅能有效地检测到基因的突变,而且可以准确检测癌基因的表达量。如定量结直肠癌淋巴结的癌胚抗原 (CEA) mRNA 的表达量,可作为诊断癌症微转移的重要依据^[17]。目前,肿瘤患者的生存期已有所延长,但是缓解期的患者仍存在复发的危险,因此,微小残留病变的检测对于进一步调整治疗方案至关重要。实时荧光 PCR 技术正成为检测肿瘤微小残留分子标志的一种必备工具^[18]。Eckert 等提出采用实时荧光 PCR 技术检测儿童急性淋巴细胞白血病微残留病灶,对儿童急性白血病的治疗有重要指导意义。

4.3 病原体的分子检测

目前,用此方法还进行了对人类结核杆菌、免疫缺陷病毒、肝炎病毒、流感病毒、巨细胞病毒、EB 病毒等病原体的检测^[19]。同样在国内,2004 年针对 Sars 流行性病的检测和诊断使得荧光定量 PCR 技术得以应用和发展。荧光定量 PCR 问世后的几年中,积累了大量有关病原体核酸量与感染性疾病发生、发展和预后之间关系的资料,这些研究资料不断丰富,将形成感染性疾病的临床分子诊断标准。目前,实时荧光 PCR 技术已应用于肝病、性病以及人类免疫缺陷病毒 (HIV) 等各种病原体的临床诊断,为实现快速准确诊断提供了有效的检测方法。

5. 小结

通过设计针对目的基因的特异性引物和探针,并优化反应体系和反应循环参数,已成功地建立了快速、灵敏、特异的 FQ-PCR 检测方法。可实现大量样本同时检测,并节省大量试验时间和反应成本,为基因定量检测和准确定量疾病相关基因的表达提供了有效的技术手段;同时实现对人类和动物疾病的早期诊断与基因分期、分型,以及对人类肿瘤转移的早期发现及预后判断^[20]。因此 FQ-PCR 技术将成为未来分子生物学实验室必备的研究工具,在临床上将有更加广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Clegg RM. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6 (1): 103-110
- [2] Mikael KA, Jose MA, Martin B, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, 27: 95 - 125
- [3] Jones C D, Yeung C, Zehnder J L, et al. Comprehensive validation of a real-time quantitative PCR assay for clinical laboratory use. *J Clin Pathol*, 2003, 120 (1): 42-48
- [4] Wolfgang K, Jonathan N, Karas S, et al. Fluorogenic primers for real-time PCR. *American Biotechnology Laboratory*, 2003, (7): 52-56
- [5] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LC Green. *Clin Chem*, 2003, 49 (6 pt 1): 853-860
- [6] Zimmermann B, Holzgreve W, Wenzel F, et al. Novel real-time quantitative PCR test for trisomy. *Clin Chem*, 2002, 48 (2): 362-363
- [7] Galbiati S, Smid M, Gambini D, et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet*, 2005, 117 (2-3): 243-248
- [8] Robert M W, Stella L, Michael G, et al. Measurement of Epstein barr virus DNA loads in whole blood and plasma by Taq Man PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 5245-5249
- [9] Magnus L, Charles H. Dynamic range and reproducibility of hepatitis B virus (HBV) DNA detection and quantification by cobas Taqman HBV, a real-time semiautomated assay. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 4251-4254
- [10] Nathalie D, Axelle D, Véronique S, et al. Quantification of Human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 1303-1310
- [11] Hwa HL, Ko TM, Yen ML, et al. Fetal gender determination using real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of maternal plasma. *J Formos Med As-soc*, 2004, 103 (5): 364-368
- [12] 刘敬忠, 闫梅, 王立荣, 等. 实时荧光聚合酶链反应结合融解曲线分析在 α 地中海贫血基因诊断中的价值. *中华检验医学杂志*, 2005, 28 (8): 858-861
- [13] Ueno H, Yoshida K, Hirai T. Quantitative detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA in the peritoneal cavity of gastric cancer patients by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *Anticancer Res*, 2003, 23 (2C): 1701-1708
- [14] Nieuwenhuis E J, Jaspars L H, Castelijns J A, et al. Quantitative molecular detection of minimal residual head and neck cancer in lymph node aspirates. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (2): 755-761
- [15] Liew M, Pryor R, Palais R, et al. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem*, 2004, 50 (7): 1156-1164
- [16] Piet A, van Rijn, Gerard J W, et al. Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative Real Time PCR technology. *Journal of Virological Methods*, 2004, 120: 151-160
- [17] Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalisation of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalisation, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 2004, 64: 5245 - 5250
- [18] Pont-Kingdon G, Lyon E. Direct molecular haplotyping by melting curve analysis of hybridisation probes: beta 2-adrenergic receptor haplotypes as an example. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 89
- [19] Janet Barletta. Applications of real-time immuno-polymerase chain reaction (rt-IPCR) for the rapid diagnoses of viral antigens and pathologic proteins. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, 27: 224 - 253
- [20] Neil J, Gibson. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 363: 32 - 47