

# 即時定量聚合酶鏈鎖反應

## Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction

潘彥如、林敬哲

Yen-Ru Pan, Jing-Jer Lin

生命現象中極為重要的遺傳物質：DNA 與 RNA，其相關研究在過去由於受限於量過低而難以進行；聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 則克服了這個困境，使得原本數量極低的遺傳物質，得以複製達可以分析的量。然而，PCR 僅限於定性分析，例如定序與基因選殖。至於定量研究，則因近年來即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 的迅速發展，而有重大突破。相較於 PCR 為終點偵測，real-time PCR 因為有更完整的反應產物偵測曲線，故能夠更準確地推算出遺傳物質的反應起始量。運用螢光探針或螢光染劑即時偵測反應產物的原理，real-time PCR 已應用於定量特定基因於基因體中的數目、定量特定基因表現量，或者是偵測單一核苷酸變異 (single nucleotide polymorphism, SNP)。過去十年來，PCR 已為生命科學領域帶來相當大的進展，相信在未来 real-time PCR 將持續扮演舉足輕重的角色。

Polymerase chain reaction (PCR) revolutionizes the detection of DNA and RNA that both are important for life. Crediting to PCR, any particular sequence, even with little amount as single copy, can be amplified and detected. However, earlier studies are restricted in qualitative analysis, such as sequencing and cloning. To achieve quantitative purposes, the real-time PCR technology has been greatly improved that enables accurate quantitative detection of DNA or RNA samples. Compared with the endpoint measurement in traditional PCR, real-time PCR provides more detailed kinetics and reproducible results since it relies on exponential phase of PCR rather than endpoint. Using either fluorogenic probes or DNA binding dyes, detection of PCR products can be performed to quantify copy numbers of target genes in genome, measure the expression levels of one or multiple genes, analyze mutations, and genotype the single nucleotide polymorphism (SNP). In the past ten years, PCR has brought breakthrough in life sciences for its convenience in amplifying diminutive molecules to analyzable amounts. Undoubtedly, real-time PCR plays vital roles in quantification and qualitative analysis, and will continue expanding its uses in various research fields.

### 一、遺傳物質分析從定性到定量的突破

若是列舉對於生命科學領域最具影響力的技

術，聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 無疑會是榜單之首。生命科學領域旨在研究生命現象，而生命現象可以約略敘述為：生物體內

遺傳物質 (通常是 DNA) 轉錄 (transcription) 為訊息核糖核酸 (mRNA)，接著再轉譯 (translation) 為蛋白質，蛋白質執行其多樣功能而展現生命現象；此外，生物體的種族延續必須透過遺傳物質的自我複製而完整保留 (圖 1)。PCR 這項技術對於轉錄和複製這兩個層次可以說有著革命性的影響。在這項技術發展之前，遺傳物質的研究常受限於量過於稀少而無法進行，但是 PCR 突破這個瓶頸，運用前端引子 (forward primer) 與後端引子 (reverse primer) 黏合至遺傳物質特定序列之前後兩端，再利用聚合酵素將該序列複製，則單一分子可經由一個複製循環反應而得兩個分子，兩個分子可得四個分子，如此則可將原本稀少的遺傳物質分子數經由若干複製循環後，以等比級數的速率增加，使得其量到達足以進行後續分析的量 (圖 2)。但是這些分析僅限於定性方面，例如：定序與基因選殖。

除定性實驗外，有相當多的研究需要定量分析，例如：於癌細胞中定量抗藥基因的表現或化學治療後特定基因的表現、病人血液中轉移的癌細胞數目以及病毒或細菌的量。就傳統 PCR 於定量方面，理論上在任一個複製循環進行反應產物量的測量時，應和欲複製對象之起始量有線性比例關係；但實際操作上，卻發現即使相同複製循環數，不一定得到等量的反應產物，此乃傳統 PCR 無法進行

定量分析的原因。

為了達到定量目的，Higuchi 等人於 1992 年發展出一套系統，這個系統在傳統 PCR 中加入了 ethidium bromide，這是一種可以與雙股 DNA 結合的染劑，經由 UV 光的激發，被 ethidium bromide 結合的 DNA 可以發出螢光，並利用 CCD 攝影技術每隔固定時間紀錄螢光量，如此可以建立複製循環數和螢光量的數字關係，相較於傳統 PCR 只能獲得一特定循環數與其產物量的數據 (endpoint measurement)，Higuchi 等人所發展的系統可以更準確地推算出欲複製對象之起始量。由於這個系統是每隔固定時間紀錄螢光量，所以稱之為即時系統 (real time system)，這就是現今常用的即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction) 的前身 (圖 3)。

## 二、定量聚合酶鏈鎖反應之原理概念

定量聚合酶鏈鎖反應之原理概念十分簡單，就是在進行聚合酶鏈鎖反應之同時，即時偵測已知與未知待測物之反應產物，求得更為準確的反應產物量與複製循環數的關係圖，再推算未知待測物的量。承前述已知 Higuchi 等人的即時定量系統在概念上已十分完整，惟實際操作上，由於採用

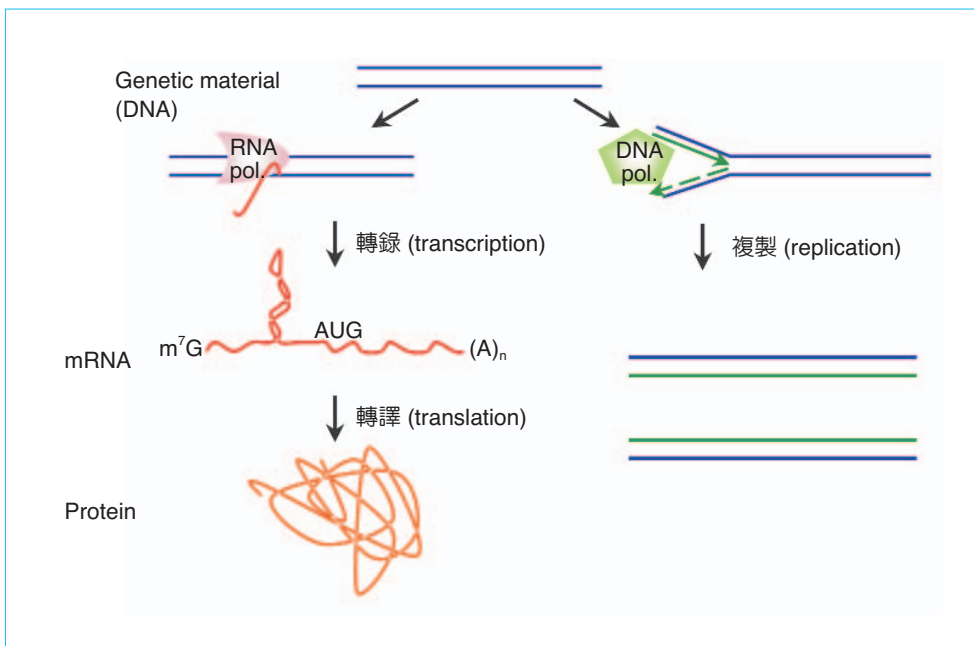


圖 1. 生命現象可以約略敘述為：生物體內遺傳物質 (通常是 DNA) 轉錄為訊息核糖核酸 (mRNA)，接著再轉譯為蛋白質，蛋白質執行其多樣功能而展現生命現象。此外，生物體的種族延續必須透過遺傳物質的自我複製而完整保留。

圖 2.

PCR 是以前端引子與後端引子黏合至遺傳物質特定序列之前後兩端，再利用聚合酵素將該序列複製，則單一分子可經由一個複製循環反應而得兩個分子，兩個分子可得四個分子，如此則可將原本稀少的遺傳物質分子數經由若干複製循環後，以等比級數的速率增加，使得其量到達足以進行後續分析的量。

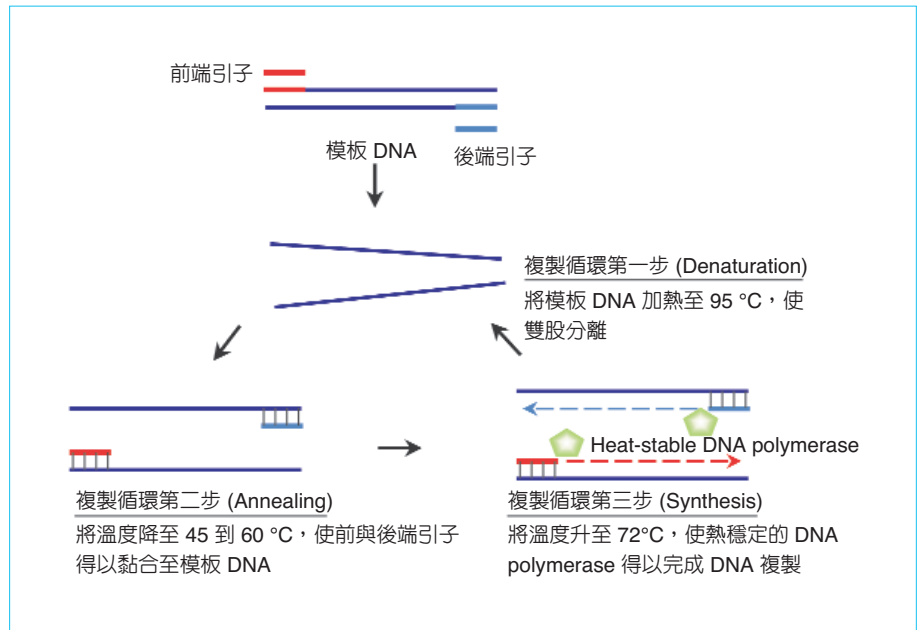
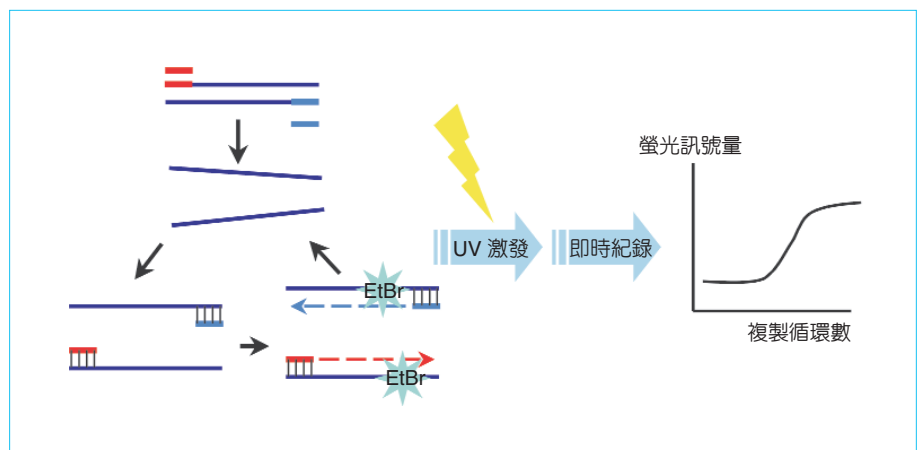


圖 3.

現今常用的即時定量聚合酶鏈鎖反應的前身，此也是一即時系統。



ethidium bromide 作為偵測反應產物的方法，而 ethidium bromide 對於雙股 DNA 即具有結合的能力，故無法區分專一或非專一性產物；此外，ethidium bromide 具有致癌的危險，因此現今常用的即時定量聚合酶鏈鎖反應捨棄 ethidium bromide 而改採其他方式偵測反應產物 (將詳述如後)。

是以在原理概念方面，本文將分 1. 反應產物的偵測；2. 定量的方法；3. 內部對照組的意義，這三個部分作近一步的探討。

### 1. 反應產物的偵測

現今常用的即時定量聚合酶鏈鎖反應運用螢光

化學以偵測反應產物，主要有螢光探針與螢光染劑兩種。螢光探針是已標記螢光物質之專一性探針，改善 ethidium bromide 專一性差的缺點；螢光染劑則雖然專一性亦不高，但是避免了 ethidium bromide 致癌的危險。今分述這兩種方法如下。

#### (1) 螢光探針

這個方法因為利用了 *Taq* DNA polymerase 的 5'→3' 外切酶活性，所以又稱 *TaqMan* 螢光探針，係一已標記螢光物質之專一性探針 (圖 4)。首度於 PCR 反應利用 *Taq* DNA polymerase 的 5'→3' 外切酶活性是 Holland 等人於 1991 年進行的實驗：在

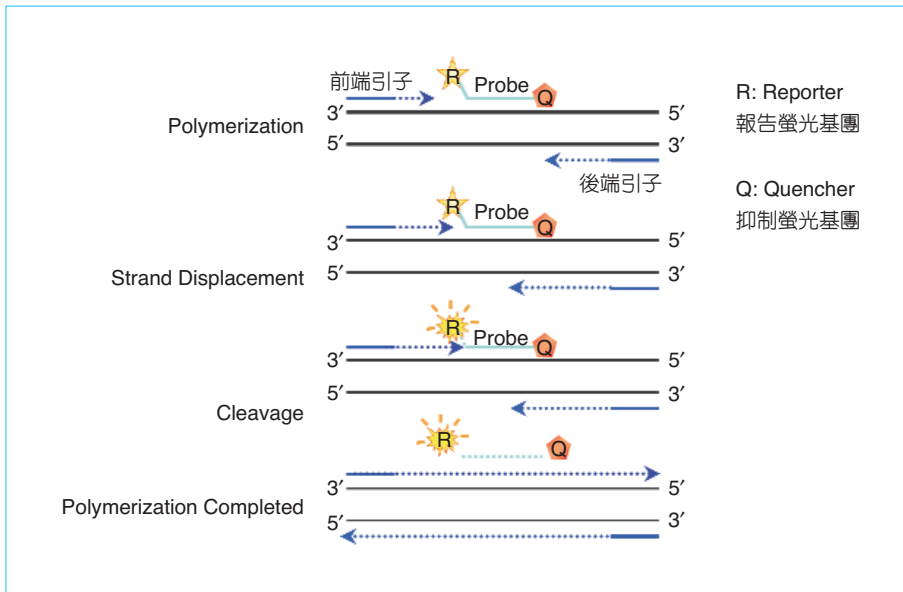


圖 4. 螢光探針的作用原理。

傳統 PCR 反應中又外加探針，該探針的 5' 端標記了放射性同位素  $^{32}\text{P}$ ，並於 3' 端切除官能基使之無法成為引子，當反應進行時，探針會黏合至特定序列之模板，恰成為 *Taq* DNA polymerase 的 5'→3' 外切酶之受質，當 *Taq* DNA polymerase 的複製反應進行至探針與模板之黏合處時，*Taq* DNA polymerase 的 5'→3' 外切酶就會分解探針，再藉由薄層色層分析區分已裂解及完整的探針。因為只有在該特定序列被複製時，探針才會被分解，所以比較已裂解及完整的探針，可以推算出具有特定序列之模板的起始量，而達到定量的目的。

上述方法雖然可以定量，但是需要於 PCR 反應完成後進行薄層色層分析，操作較為繁複。現今常用的方法應用了螢光化學取代放射性同位素標定，並引入即時定量的概念。其原理是於 PCR 反應時除了一對引子，同時加入一個對於欲複製之特定序列有專一性的螢光探針，該探針為一寡核苷酸，兩端分別標記一個報告螢光基團和一個抑制螢光基團。探針完整時，由於兩個基團的距離可以使報告基團發射的螢光信號被抑制基團吸收 (Förster resonance energy transfer, FRET)，故無法發出螢光；當 PCR 反應進行時，*Taq* DNA polymerase 的 5'→3' 外切酶活性將探針進行酶切分解，使報告螢光基團和抑制螢光基團分離，從而螢光監測系統可接收到螢光訊號，即每複製一個 DNA 分子，就有

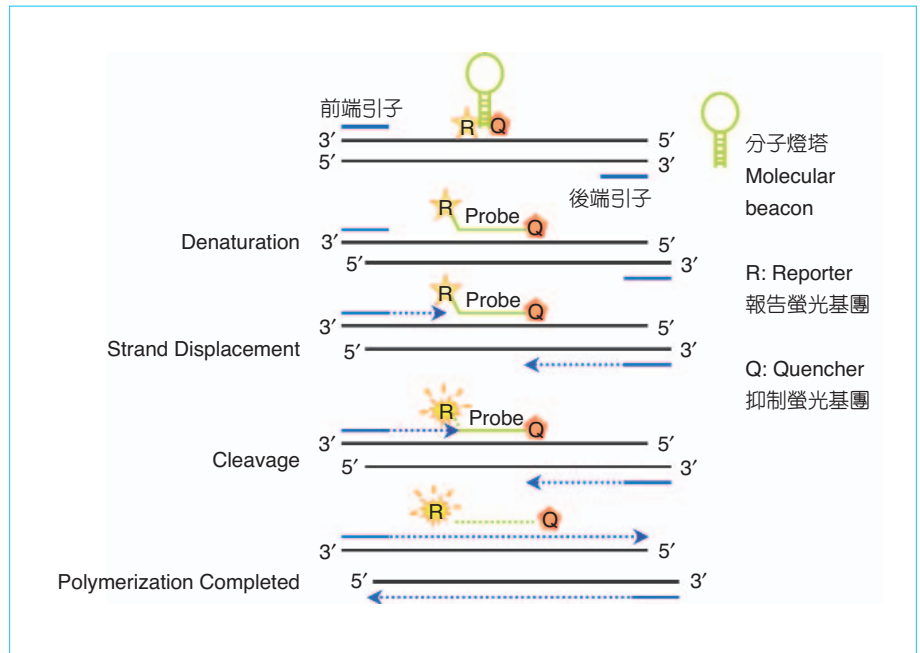
一個螢光分子形成，並每隔固定時間讀取其螢光訊號，實現了螢光訊號的累積與 PCR 產物形成得以完全同步的偵測系統。

依據類似原理設計者，尚有分子燈塔 (molecular beacon) 與 FRET 探針。惟分子燈塔是會形成 stem loop 的寡核苷酸，故第一步是分子燈塔亦須解開結構，才能與模板黏合 (圖 5)。而 FRET 螢光探針的作用原理：兩個探針皆為寡核苷酸，donor probe 的 5' 端標記 fluorescein，接受特定波長的光激發後會發射出另一特定波長之光，當一個已於 3' 端標記紅色螢光的 acceptor probe 和 donor probe 距離在五個核苷酸之內的範圍時，由於兩個基團的距離可以使 donor probe 發射的螢光信號被 acceptor probe 吸收 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)，及發出螢光，並設定儀器僅偵測由紅色螢光基團所發射出的螢光信號；當 PCR 反應進行時，*Taq* DNA polymerase 的 5'→3' 外切酶活性將探針進行酶切分解，使兩個探針自模板分離，無法發出螢光 (圖 6)。

## (2) 螢光染劑

螢光染劑係一與雙股 DNA 結合的染劑，若按結合原理可區分為兩種：其一是 intercalator，另一是 minor groove binder。Higuchi 等人於 1992 年所使用的 ethidium bromide 是一種 intercalator；

圖 5. 分子燈塔的原理與螢光探針原理類似，惟分子燈塔是會形成 stem loop 的寡核苷酸，故第一步是分子燈塔亦須解開結構，才能與模板黏合。



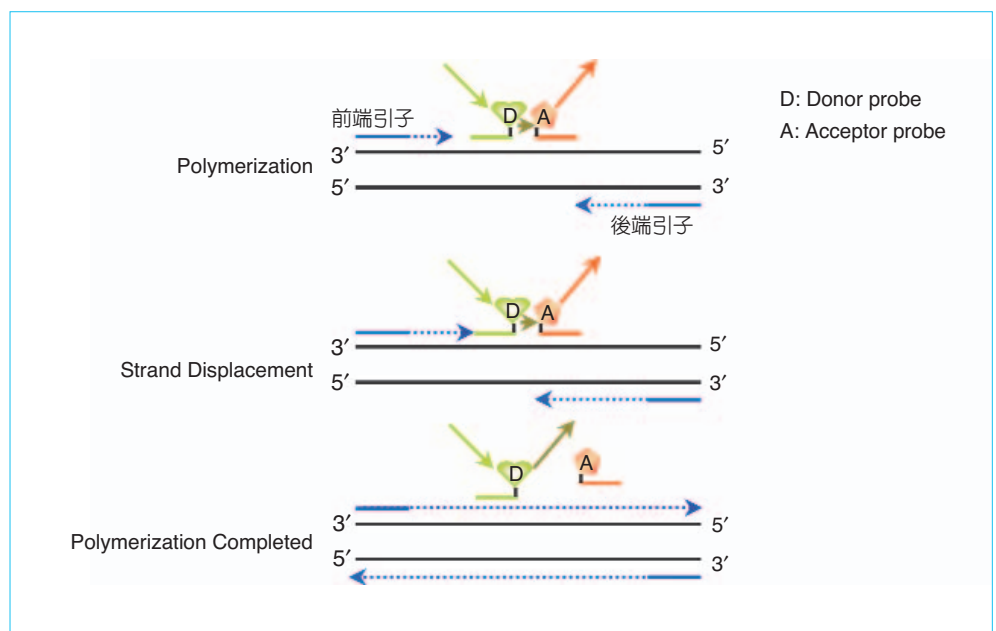
Hoechst 33258 則是一種 minor groove binder。不論是哪一種染劑，就擔任定量聚合酶鏈鎖反應之反應物偵測的角色而言，都必須符合兩項要素：其一是與雙股 DNA 結合後，所發射之螢光比游離狀態之染劑要高；另一則是不得抑制反應進行。

現今通常採用 SYBR Green I 螢光染料。在 PCR 反應體系中，加入過量 SYBR Green I 螢光染

料，SYBR Green I 螢光染料特異性地摻入 DNA 雙鏈之 minor groove 後，發射螢光信號，而不摻入鏈中的 SYBR Green I 染料分子不會發射任何螢光信號，從而保證螢光信號的增加與 PCR 產物的增加完全同步 (圖 7)。

比較上述兩種方法，螢光探針專一性十分高，錯誤黏合 (mis-priming) 或引子二元體 (primer-

圖 6. FRET 螢光探針的作用原理。





dimer) 都不會發射螢光訊號；此外，更可以設計發射不同螢光訊號之報告基團於不同探針，則在同一個 PCR 反應中，可以偵測多種序列。當然，這種方法的缺點就是不同序列就得重新合成專屬探針，所費成本較高。相對的，螢光染劑的方法得到錯誤訊號的機率較高，但是所費較為便宜。另外，關於螢光染劑有一值得注意的地方，即同一個被複製的分子上，會有多個螢光分子結合其上，因此假若引子設計的複製長度愈長，則所得的螢光訊號愈強。此處與螢光探針不同，其螢光訊號強度取決於被複製分子之數目 (圖 7(b))。

## 2. 定量的方法

上述為偵測反應物的方法，一旦完成偵測，數據收集完整之後，便是針對這些反應產物偵測曲線進行分析，以求得待測物的量。在概念上，起始量較高的樣品，可於較少的複製循環數就抵達某特定門檻的螢光訊號量。因此，可以設定一個特定門檻的螢光訊號量，則依到達該門檻所需複製循環數不同，可以推論起始量高低；所需複製循環數愈少，則起始量愈高。上述即為  $C_t$  值的概念 (圖 8)。

更進一步定義  $C_t$  值以及  $C_t$  值與起始模板量的關係。 $C$  代表 cycle,  $t$  代表 threshold,  $C_t$  值的含義是：每個反應管內的螢光訊號到達設定的門檻閾值 (threshold) 時所經歷的複製循環數。以實例說明，對不含帶測物與含帶測物兩反應管同時偵測反應產

物，不含帶測物之反應產物偵測曲線呈持平狀態，含帶測物之反應產物偵測曲線於第 15 個到第 16 個複製循環之間的時間點開始出現升高之螢光訊號量，則前 15 個複製循環的螢光訊號稱為螢光基底信號 (basal line)，而螢光閾值 (threshold) 的設定，是指螢光基底信號的標準差之 10 倍，可以用公式表示為： $threshold = 10 \times SD_{cycle\ 3-15}$  (如圖 8(a) 所示)。而之所以將螢光門檻閾值 (threshold) 的設定在此的主因，是 PCR 複製循環在到達該複製循環數時，剛剛進入真正的指數擴增期 (對數期)，此時誤差尚未放大，是故  $C_t$  值將完全依起始量而定；若將 threshold 設定更高，由於需要較多的複製循環數才能抵達，此時誤差放大的機率升高，可能導致  $C_t$  值因不同批操作而有不同結果。

Higuchi 等人於 1993 年的研究指出，每個模板的  $C_t$  值與該模板起始量的對數具有線性關係，起始量越多， $C_t$  值越小。定量的方法是將已知量的質體 DNA 作系列稀釋，作為標準樣品，並同時與待測樣品進行定量聚合酶鏈鎖反應。利用已知起始量的標準樣品可作出標準曲線，其中橫坐標代表起始量的對數，縱坐標代表  $C_t$  值 (如圖 8(b) 所示)。因此，只要獲得未知樣品的  $C_t$  值，即可從標準曲線上計算出該樣品的起始量。

## 3. 內部對照組的意義

內部對照組對於一般聚合酶鏈鎖反應的意義在

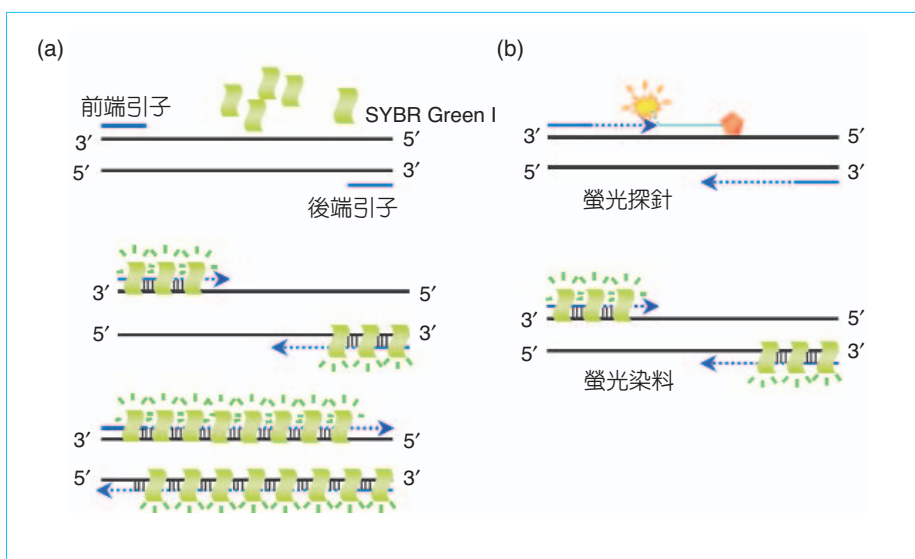


圖 7.  
(a) 螢光染劑之作用原理，(b) 螢光探針與螢光染劑之比較：螢光強度前者取決於被複製之分子數目；後者取決於引子設計之複製長度。

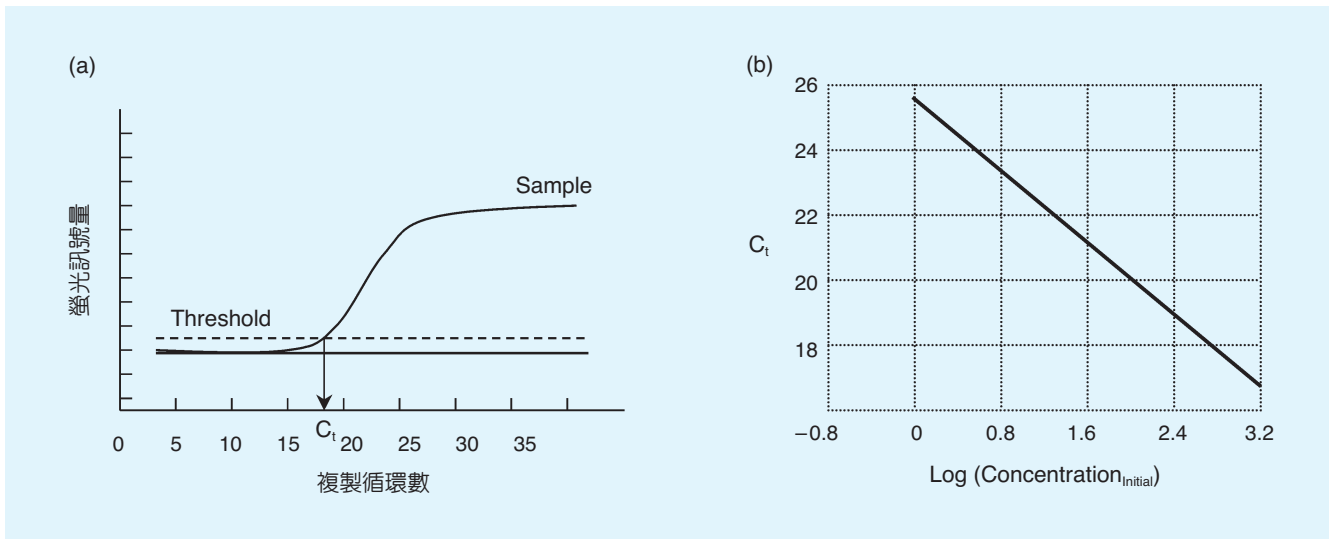


圖 8. (a) 每一個複製循環作一次檢測，記錄螢光訊號量。(b) 利用已知起始量的標準樣品可作出標準曲線，其中橫坐標代表起始量的對數，縱坐標代  $C_t$  值。

於協助其進行定量。主要方式是利用已知量的內部對照模板和未知量的標的模板同時進行聚合酶鏈鎖反應，反應完成後，互相比較其反應產物之相對量，則可以求出標的模板的量。這是相對定量的概念，以這種相對定量進行定量的 PCR 主要又因內部對照模板的不同而分下列兩種方法。

### (1) 內部對照法

在同一個 PCR 反應管中加入已定量的任意內部對照模板和其引子，前端引子用螢光標記，後端引子不標記。在標的模板被複製的同時，內部對照模板也被複製。在 PCR 產物中，由於內部對照模板與標的模板的長度不同，二者的擴增產物可用電泳分離開來，分別測定其螢光強度，以內部對照模板為對照，定量待檢測模板 (如圖 9 所示)。

相對定量的準確性，必須建立在一個條件成立的時候：內部對照模板和標的模板被複製的效率相同。但是上述方法由於內部對照模板與標的模板的長度與序列不同，所以在聚合酶鏈鎖反應中被複製的效率亦不盡相同，導致定量並不準確。是以若能令內部對照模板設計與標的模板幾近相同，同時具有鑑別兩者的方法，則可以排出這個疑慮。下列方法就是依此設計。

### (2) 競爭法

將標的模板設計突變，並選擇出具有新的序列之突變株，且該新序列含有一個內切酶可以辨識的內切位點，此即外源競爭性模板。在同一反應管中，待測樣品與競爭模板用同一對引子同時複製 (其中一個引子為螢光標記)。反應後用內切酶分解 PCR 產物，競爭性模板的產物被酶解為兩個片段，而待測模板並不會被酶切，可通過電泳將兩種產物分開，分別測定螢光強度，根據已知模板推測未知模板的起始量 (如圖 10 所示)。

由於傳統定量方法都是終點檢測，即 PCR 到達平臺期後進行檢測，而 PCR 經過對數期而到達平臺期時，檢測重現性極差 (如圖 11 所比較)。同一個模板在 96 孔 PCR 儀上做 96 次重複實驗，所得結果有很大差異，因此無法直接從終點產物量推算出起始模板量。加入內標後，可部分消除終點產物定量所造成的不準確性。但即使如此，傳統的定量方法也都只能算是半定量的方法。

即時螢光定量 PCR 技術有效地解決了傳統定量只能終點檢測的局限，實現了每一複製循環就檢測一次螢光信號的強度，並記錄在電腦軟體之中，通過對每個樣品  $C_t$  值的計算，根據標準曲線獲得定量結果。因此，即時螢光定量 PCR 無需內部對照是建立在下述兩個基礎之上的。

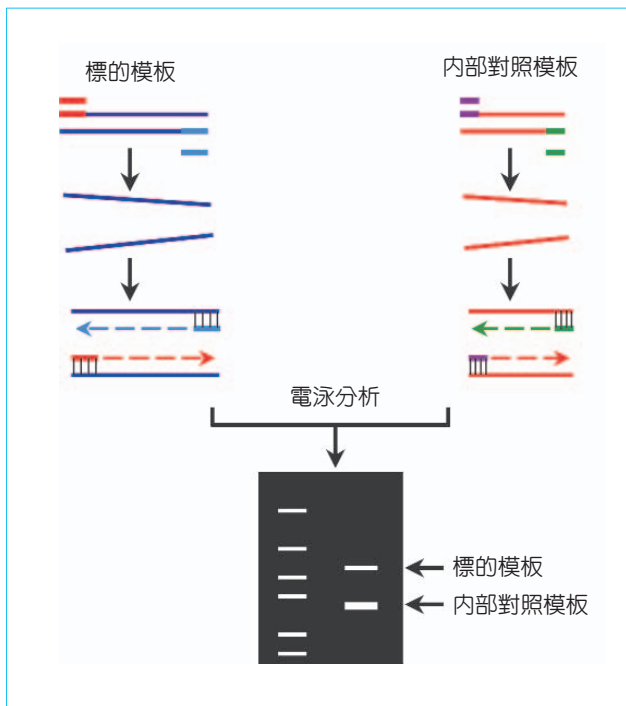


圖 9. 內部對照法：在同一個 PCR 反應管中加入已定量的任意內部對照模板和其引子，前端引子用螢光標記，後端引子不標記。在標的模板被複製的同時，內部對照模板也被複製。在 PCR 產物中，由於內部對照模板與標的模板的長度不同，二者的擴增產物可用電泳分離開來，分別測定其螢光強度，以內部對照模板為對照，定量待檢測模板。

### (1) $C_t$ 值的重現性

PCR 複製循環在到達  $C_t$  值所在的複製循環數時，剛剛進入真正的指數擴增期 (對數期)，此時微小誤差尚未放大，因此  $C_t$  值的重現性極好，即同一模板不同時間複製或同一時間不同管內複製，得到的  $C_t$  值是恒定的。

### (2) $C_t$ 值與起始模板的線性關係

由於  $C_t$  值與起始模板的對數存在線性關係，可利用標準曲線對未知樣品進行定量測定，因此，即時螢光定量 PCR 是一種採用外標準曲線定量的方法。

儘管即時螢光定量 PCR 技術於理論上不需內部對照，但是實際操作上仍會配套放置。就定量基因

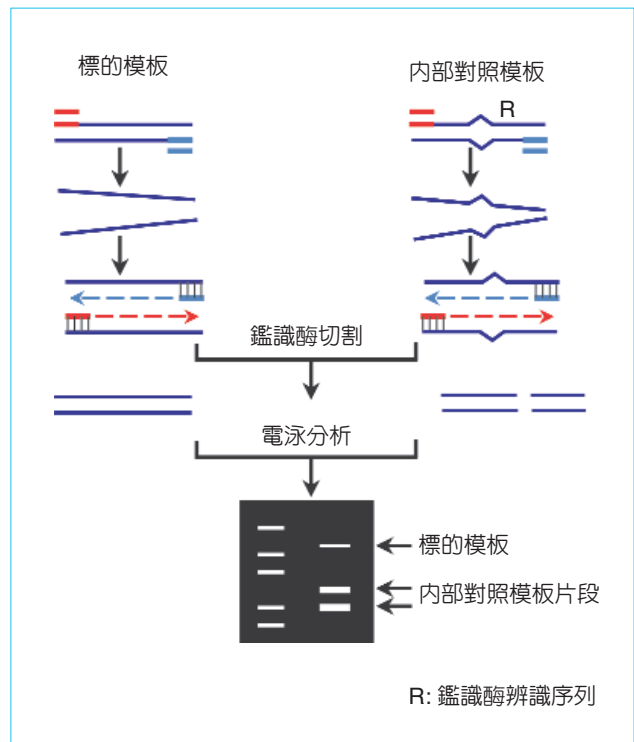


圖 10. 內部對照之競爭法：將標的模板設計突變，並選擇出具有新的序列之突變株，且該新序列含有一個內切酶可以辨識的內切位點，此即外源競爭性模板。在同一反應管中，待測樣品與競爭模板用同一對引子同時複製 (其中一個引子為螢光標記)。反應後用內切酶分解 PCR 產物，競爭性模板的產物被酶解為兩個片段，而待測模板並不會被酶切，可通過電泳將兩種產物分開，分別測定螢光強度，根據已知模板推測未知模板的起始量。

的表現量而言，會依標的基因的表現量高低，配套放置表現量不同的內部對照基因。主要因素在於方便其他研究者了解標的基因的表現量，同時亦增加實驗的可信度。較為常用的低表現量 house keeping genes: phosphoribosyl transferase (PBGD) 與 hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)；較為常用的中表現量 house keeping genes:  $\beta_2$  microglobulin ( $\beta_2$ M) 與 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)。運用上述內部對照基因有一須注意的地方，若研究主旨在於比較藥物處理後的基因表現或其他基因調控的比較，必須注意藥物處理並不會影



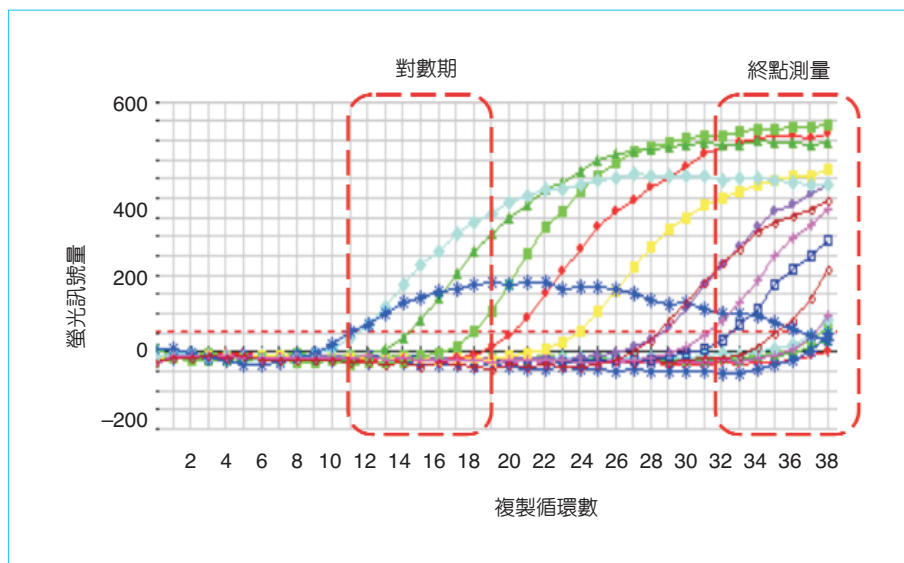


圖 11. 傳統 PCR 定量方法 (終點偵測) 與 real-time PCR (對數期偵測) 的比較。

響內部對照基因的表現量，以免定量之參考失去意義。此外，就定量基因的數目而言，可以放置單一數目 (single copy number) 的基因作為對照。總之，挑選內部對照基因的原則除了表現穩定或數目已知之外，最好能夠與待測之標的基因在序列長度與內容上有較高的相似性，使兩者的反應效率一致，使內部對照有其意義。

### 三、定量聚合酶鏈鎖反應之實際操作

操作定量聚合酶鏈鎖反應的實驗 (如圖 12 所示)，基本流程是待測物、前後端引子、dNTPs、與螢光染劑或螢光探針混合均勻置入硼矽玻璃毛細管 (borosilicate glass capillaries)，該管具有較高的表面對體積比例 (surface-to-volume ratio)，確保反應物和其周圍空氣能迅速到達溫度平衡，使升溫降溫效率較好。接著將毛細管置入該硼矽玻璃毛細管的專屬離心機，確定所有反應物已集中於硼矽玻璃毛細管之細管部，即可置入聚合酶鏈鎖反應機器，進行反應。

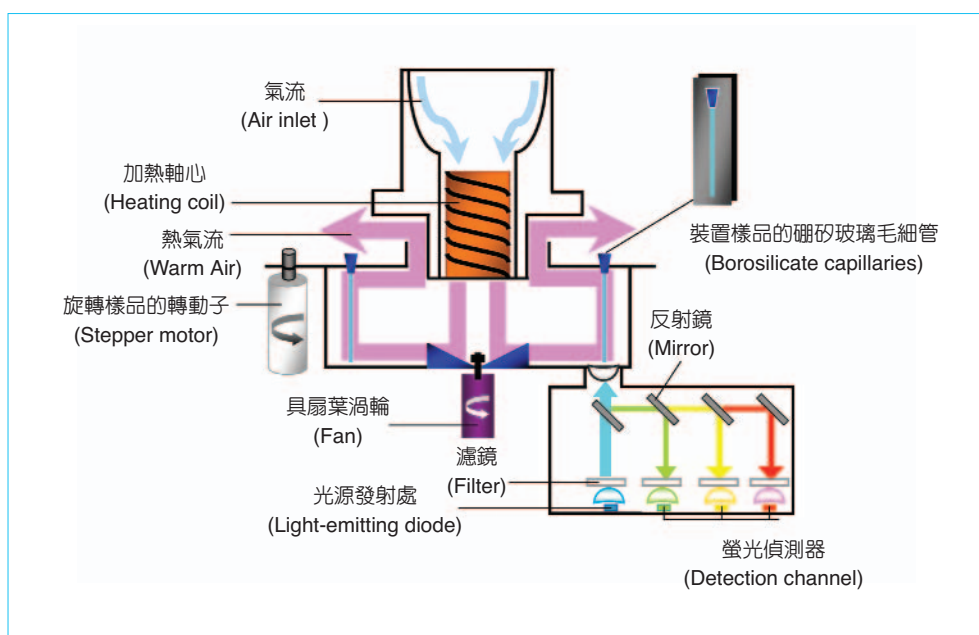


圖 12. 聚合酶鏈鎖反應機器之縱切面示意圖。

聚合酶鏈鎖反應機器可以區分為加熱軸心 (heating coil)、熱對流槽 (thermal chamber)、具扇葉渦輪 (fan)、光源發射處 (light emitting diode)、螢光偵測器 (detection channel) 與訊號顯示螢幕 (monitor) 幾個部分。機器與電腦連線，由特定操作軟體進程式設定，包括樣品數、螢光探針種類或螢光染劑種類、溫度升降、偵測器的濾鏡波長範圍與複製循環數。待程式設定完全，機器便開始運轉，主要由加熱軸心、熱對流槽與扇葉渦輪三個部分控制溫度升降；而螢光之激發與訊號接收則在硼矽玻璃毛細管之尖端。通常一個複製循環數偵測一次，由光源發射處 (light emitting diode) 將光源自濾鏡 (filter) 穿越後，發射出固定波長之激發光，激發光抵達硼矽玻璃毛細管之尖端 (tip) 同時激發管內樣品之螢光基團，而螢光基團所發射出的螢光，則可以透過反射鏡 (mirror) 將螢光反射至螢光偵測器 (detection channel)，並可以立即 (on-line and real-time) 由電腦螢幕讀取螢光訊號。以上就是定量聚合酶鏈鎖反應的基本操作流程。

另外，關於螢光探針的設計，現行多種分析軟體可以協助設計，這些軟體也都各自有其強調的設計原理與注意事項，故不在此詳述。惟有一原則需掌握，通常將待測基因之序列輸入後，分析軟體會依據熱力學考量在  $T_m$  (melting temperature) 溫度下的探針黏合效率，建議 10–20 種適合螢光探針設計的序列，此時，可以將這些建議序列進行序列資料庫比對，找出專一性最高的螢光探針進行實驗。

## 四、定量聚合酶鏈鎖反應之今日應用

### 1. 定量基因數目或基因表現

#### (1) 定量基因數目

有些研究領域旨在分析生物的基因體，例如分析某些特定基因，或許是致癌相關，也有可能是演化相關，其在基因體中的出現次數，進而推論該基因在致癌過程或演化歷史中的關係。定量的方法是將已知量的質體 DNA 作系列稀釋，作為標準樣品，並同時與待測樣品進行定量聚合酶鏈鎖反應。將不同濃度的質體 DNA 在與時俱增之複製循環和其螢光值進行作圖，之後將其複製循環數與不同濃度的質體 DNA 的對數作圖，則可得標準曲線，此時，將待測樣品之複製循環數對回這條標準曲線，則可以求得其濃度。

#### (2) 定量基因表現

承前文所述，於癌細胞中定量抗藥基因的表現或化學治療後特定基因的表現，都需要有準確的定量方法，掌握治療後的效果，反轉錄定量聚合酶鏈鎖反應 (real time reverse transcription PCR) 即是一個已被廣為應用於定量基因表現的方法。在這個技術發展成熟之前，定量或偵測基因表現的方法主要有北方墨點 (northern blotting)、nuclease protection assays 與 *in situ* hybridization 等方式。但是以定量這個目的而言，反轉錄定量聚合酶鏈鎖反應仍是較佳的選擇，原因在於其方便性與準確性。其進行方

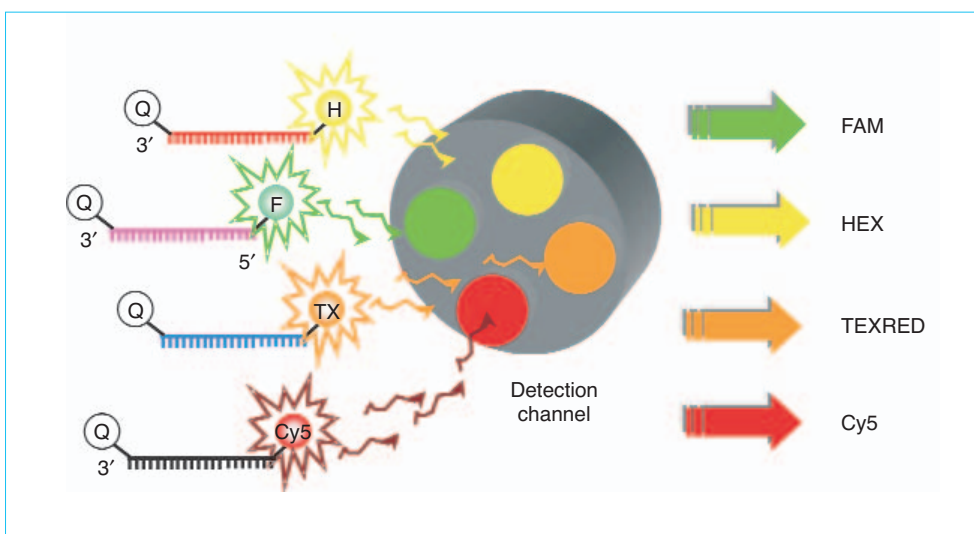


圖 13.

多色偵測，主要由四種螢光探針進行之。利用不同激發波長的螢光標記物去標定不同基因。四種螢光基團可以選擇：FAM、HEX、TEXRED 與 Cy5，標記螢光基團於四種探針並設計四組引子則可以同時偵測四種標的基因。

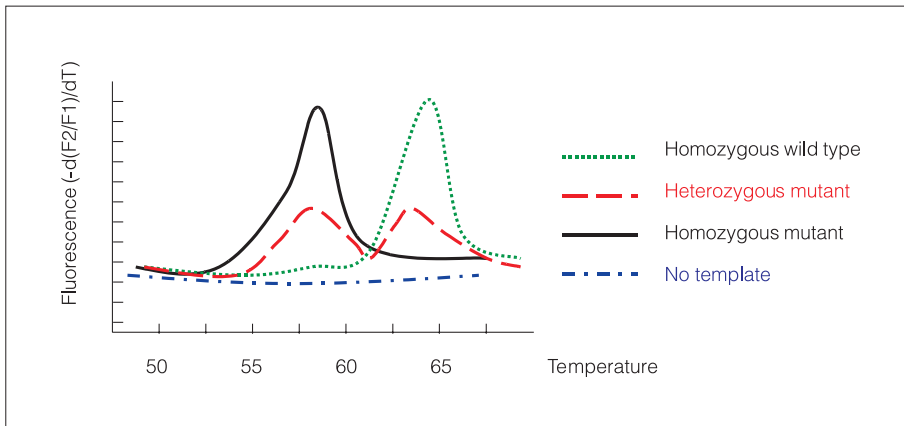


圖 14.  
偵測基因突變。

式，除了第一步必須將 *mRNA* 反轉錄為 *DNA* 之外，其餘操作步驟與注意事項均與一般定量聚合酶鏈鎖反應無異。

### (3) 同時偵測不同基因

利用不同激發波長的螢光標記物去標定不同基因 (如圖 13 所示)。通常有四種螢光基團可以選擇：FAM、HEX、TEXRED 與 Cy5，標記螢光基團於四種探針並設計四組引子則可以同時偵測四種標的基因。

## 2. 偵測基因突變

例如應用在 *single nucleotide polymorphism* (SNP)。其偵測原理是隨著定量聚合酶鏈鎖反應的進行，同時進行融解溫度 (*melting temperature*) 曲線紀錄，如圖 14 所示。若是 *homozygous wild type*，則需較高溫度才能偵測到其  $T_m$ ，並且是單一波峰之曲線；若是 *homozygous mutant type*，則在較低溫度即能偵測到其  $T_m$ ，並且是單一波峰之曲線；若是 *heterozygous mutant type*，則在兩個溫度偵測到其  $T_m$ ，即兩個波峰之曲線。

綜觀前述所言，定量聚合酶鏈鎖反應之原理概念是在進行聚合酶鏈鎖反應之同時，即時偵測已知與未知待測物之反應產物，求得更為準確的反應產物量與複製循環數的關係圖，再推算未知待測物的量。而其今日之應用在定量方面，有定量基因在基

因體的數目、基因之表現，以及若要同時偵測多個基因之數目或表現量，可以使用多種螢光同時偵測。在定性方面，則是應用在 *single nucleotide polymorphism* (SNP)。相信在未來，定量聚合酶鏈鎖反應會應用於更廣的研究領域，解決更多的問題。

## 參考文獻

1. R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith, *Biotechnology*, **10**, 413 (1992).
2. R. Higuchi and C. Fockler, *Biotechnology*, **11**, 1026 (1993).
3. P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**, 7276 (1991).

林敬哲先生為美國北卡羅萊納大學生化暨生物物理博士，現任國立陽明大學生物藥學研究所教授。

潘彥如小姐為國立陽明大學生物化學研究所碩士，現任國立陽明大學生物藥學研究所研究助理。

Jing-Jer Lin received his Ph.D. in biochemistry and biophysics from the University of North Carolina at Chapel Hill, USA. He currently is a professor in the Institute of Biopharmaceutical Science at National Yang-Ming University.

Yen-Ru Pan received her M.S. in biochemistry from National Yang-Ming University. She currently is a research assistant in the Institute of Biopharmaceutical Science at National Yang-Ming University.