

即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time Quantitative Polymerase

Chain Reaction，簡稱Q-PCR)

原理

Q-PCR技術利用專一的Primer probe(引子探針)會在PCR(聚合酶連鎖反應)過程中產生螢光，再利用螢光偵測系統(Ex.ABI 7900HT Detection system)來偵測每個循環(cycle)所釋放出的螢光量，進而推算出每個循環所產生的產物含量，達到即時定量的目的。

目前使用的探針有分成Non-Specific(非特異性)及Specific(特異性)兩大類。我們今天實驗課所使用的是Non-specific chemistry detector；SYBR Green，其特性是不會與單股DNA (single-strand DNA, ssDNA)結合，僅會與雙股DNA(double-strand DNA, dsDNA) 結合。

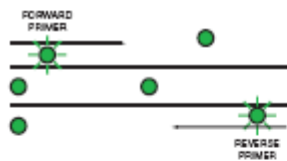
在PCR過程中，原始的樣本會先受熱形成單股的DNA，接著引子進行專一性的結合形成雙股DNA，此時SYBR Green會與雙股DNA進行結合，然後釋放螢光，進而被螢光系統偵測。螢光的訊號則是在每個循環中的annealing或elongation階段被偵測；藉由偵測到的螢光強度回推樣本的含量。



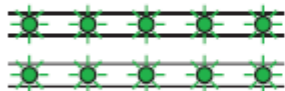
Step 1: Reaction setup
The SYBR[®] Green I dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



Step 2: Denaturation
When the DNA is denatured, the SYBR[®] Green I dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



Step 3: Polymerization
During extension, primers anneal and PCR product is generated.

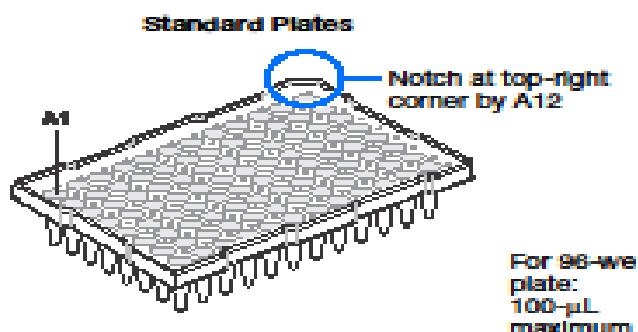


Step 4: Polymerization completed
SYBR[®] Green I dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the instrument.

材料與試劑

1. DNA sample from oral cancer cell line

- 10 mM dNTP
- 50 μ M Forward & Reverse primer
- SYBR Green Master Matrix(波仕特)
- 96 well & 封膜



實驗步驟

- 配製DNA sample：加入ddH₂O將DNA sample濃度稀釋為50ng/5 λ 。
- 配製5uM Forward primer：取9 λ ddH₂O至eppendorf，再加入1 λ 50uM Forward primer stock。
- 配製5uM Reverse primer：取9 λ ddH₂O至eppendorf，再加入1 λ 50uM Reverse primer stock。
- 配製1.2mM dNTP：取88 λ ddH₂O至eppendorf，再加入12 λ 10mM dNTP stock。
- 配製Mixture solution：

Reagent	Concentration	Volume
Forward primer	5uM	0.2 λ /well
Reverse primer	5uM	0.2 λ /well
dNTP	1.2mM	0.2 λ /well
ddH ₂ O	X	4.6 λ /well

(此處Mixture solution為一個well的量，請視實際loading 的well數做調整)

- 取出96孔盤，每個well依序加入5 λ Mixture solution。
- 每個well依序加入稀釋後的DNA sample 5 λ 。
- 將96孔盤放至冰上，至-20 $^{\circ}$ C冰箱取出SYBR Green Master Matrix，vortex後每個well依序加入10 λ SYBR Green Master Matrix。
- 取出封膜黏貼於96孔盤上，黏貼完全後即可上機。
- Real-Time PCR循環溫度如下：Stag1 50 $^{\circ}$ C反應2分鐘；
Stage2 95 $^{\circ}$ C反應 10 分；Stage3 95 $^{\circ}$ C反應 15 秒、60 $^{\circ}$ C反應 1 分，共 40 個 Repeat。