BIORI BIOTECH · TECHNICAL REVIEW

PCR SENSITIVITY · FROM ENZYME KINETICS TO DETECTION THRESHOLD

PCR 检测体系灵敏度

从酶促反应、蛋白结构到检测阈值的机理与调整

TaqMan qPCR 为主 · RT-qPCR 单列一章 · LOD95 / E / Ct / 临床灵敏度并置 · 不绑定具体货号

95%
LOD95 的判定概率
不是临床灵敏度

90–110%
扩增效率 E 的
常用参考窗口

≈3 copies
Poisson 95% 理论交点
不含提取/抑制损失

89–94%
临床灵敏度文献示例
随人群/参考标准变化

00 READING SUMMARY

阅读摘要：先定口径，再看链条

PCR 的“灵敏度”不是单一酶活指标，而是一条串联系统的总结果：样本与取样先设定统计下限，引物/探针决定能否特异退火，聚合酶决定能否高效延伸，5′核酸酶决定每个扩增子产出多少信号，仪器与阈值决定最终判读。酶学、配方与引探设计分别作用于这条链的不同节点。

1

先定口径

LOD95 是管内概率；E 是每轮放大倍数；Ct 是达到阈值的轮数；临床灵敏度是人群中的 TP/(TP+FN)。

2

直接参数

kcat/Km(dNTP)、processivity、延伸速率、5′核酸酶切割效率、热失活半衰期。

3

间接参数

游离 Mg^{2+}、dNTP/Mg 比、离子强度、pH、添加剂、Tm/ΔG、二级结构、扩增子长度、抑制剂。

4

不要跨口径

LOD 低不等于临床灵敏度高；临床灵敏度还取决于人群、疾病谱、采样与参考标准。

给客户的一句话

“我们先把‘灵敏度’拆成 LOD95、扩增效率、Ct 和临床灵敏度四个口径，再分别看酶、配方和引探各自作用在哪一段；这样讨论才不会把管内性能和临床性能混在一起。”

数据边界 本报告中的文献数值来自不同实验体系，不能直接当作某一产品的承诺值；所有“参考窗口”都需要在客户自己的模板、仪器和样本基质上复验。

1 FOUR METRICS

一、四个口径：LOD95、E、Ct、临床灵敏度

同一个“灵敏度”常被用来指四件不同的事。把它们分开，是后面所有机理讨论的前提。

口径	回答的问题	常用公式/定义	主要决定因素	不能等同于
LOD95	最低能可靠检出多少?	95% 检出概率的最低浓度/拷贝数；CLSI EP17 与 qPCR logistic 方法	取样、回收、扩增效率、背景、重复数	临床灵敏度
扩增效率 E	每轮扩增放大多少?	E = 10^(−1/slope) − 1；90–110% 对应 slope ≈ −3.59 至 −3.10	聚合酶、引探、Mg^{2+}/dNTP、抑制剂	检出限本身
Ct / Cq	达到阈值要几轮?	与初始拷贝数的对数成反比；100% 效率下 1 个 Ct ≈ 2 倍模板	初始拷贝数、效率、阈值设定	灵敏度或临床灵敏度
临床灵敏度	有病的人里检出多少?	TP / (TP + FN)	患病率、疾病谱、采样、参考标准	分析灵敏度/LOD95

1.1 LOD95：最低能可靠检出多少

LOD 是“在给定概率下可检出”的最低量，qPCR 中常用 95% 检出概率（LOD95）。CLSI EP17 与 qPCR 专用统计方法都强调：低浓度端不是线性正态分布，不能直接用普通均值±SD；应按重复实验的检出率做 logistic 回归或概率拟合。[3]

```
LoB = mean(blank) + 1.645 × SD(blank)
LoD = LoB + 1.645 × SD(low)
LOD95：检出率 = 95% 的最低浓度
```

CLSI EP17 形式；qPCR 低浓度端需用重复检出率/逻辑回归，不宜直接套用线性公式。

1.2 扩增效率 E：每轮放大多少

```
E = 10^(−1/slope) − 1
```

slope 为标准曲线 Ct 对 log10(拷贝数) 的斜率。

扩增效率 E	标准曲线斜率	含义	备注
90%	−3.59	每轮 1.90 倍	仍可用，但低拷贝更易漏检
100%	−3.32	每轮 2.00 倍	理论理想值
110%	−3.10	每轮 2.10 倍	可能存在抑制物/引物二聚体干扰

E 接近 100% 时，模板每轮翻倍；E 偏低说明反应受到抑制、引探不佳或酶效率不足。E 高不等于 LOD 低：低拷贝还受取样、回收和阈值判定影响。[1][3]

1.3 Ct：达到阈值要几轮

Ct（Cq）与初始拷贝数的对数成反比。100% 效率下，1 个 Ct 约对应 2 倍模板；90% 效率下约 1.9 倍。Ct 提前可以是模板更多、效率更高，也可能是背景更高或非特异扩增，不能单独当作灵敏度。[1]

1.4 临床灵敏度：人群中的检出比例

```
临床灵敏度 = TP / (TP + FN)
```

TP：真阳性；FN：假阴性。它依赖患病率、疾病谱、采样与参考标准。

临床灵敏度不是 LOD 的同义词。一个 LOD 很低的 assay，如果在目标人群里采样不到位、基质抑制强或疾病早期靶标不存在，临床灵敏度仍可能不高。[19]

> **客户解释**
>
> “LOD95 回答的是‘管里最低能测到多少’，临床灵敏度回答的是‘在目标人群里能查出多少病人’。前者是分析性能，后者是诊断性能，必须分开验证。”

2 FROM SAMPLE TO THRESHOLD

二、串联模型：从样本到阈值

把 PCR 看成一条串联链：任何一段的损失都会向后传递；低拷贝时，最前面的取样与统计往往先设定下限。

01 取样/回收	02 变性/可及	03 退火	04 延伸	05 切割	06 读出
有效拷贝数、提取回收率、基质抑制	GC、二级结构、片段完整性	Tm/ΔG、Ta、引物二聚体	kcat/Km、processivity、延伸速率	5′核酸酶、探针可及性	背景、淬灭、阈值算法

```
P_detect ≈ P_sample × P_access × P_anneal × P_extend × P_cleave × P_read
```

概念式：各段不是独立可乘的严格概率，但用于说明“任一环节损失都会拉低总检出率”。

2.1 低拷贝的统计下限

当每反应平均拷贝数为 λ 时，至少有一个拷贝的概率服从 Poisson：P = 1 − e^(−λ)。95% 检出对应 λ ≈ 3.0；这就是“约 3 个拷贝”的理论来源，不包含提取损失、抑制和扩增失败。[3]

每反应平均拷贝数 λ	至少检出 1 个拷贝的概率	解释
1	63.2%	低拷贝重复间波动很大
2	86.5%	仍有约 13.5% 的孔判阴性
3	95.0%	Poisson 理论的 95% 交点
5	99.3%	接近但未到 100%
10	99.995%	取样波动已很小

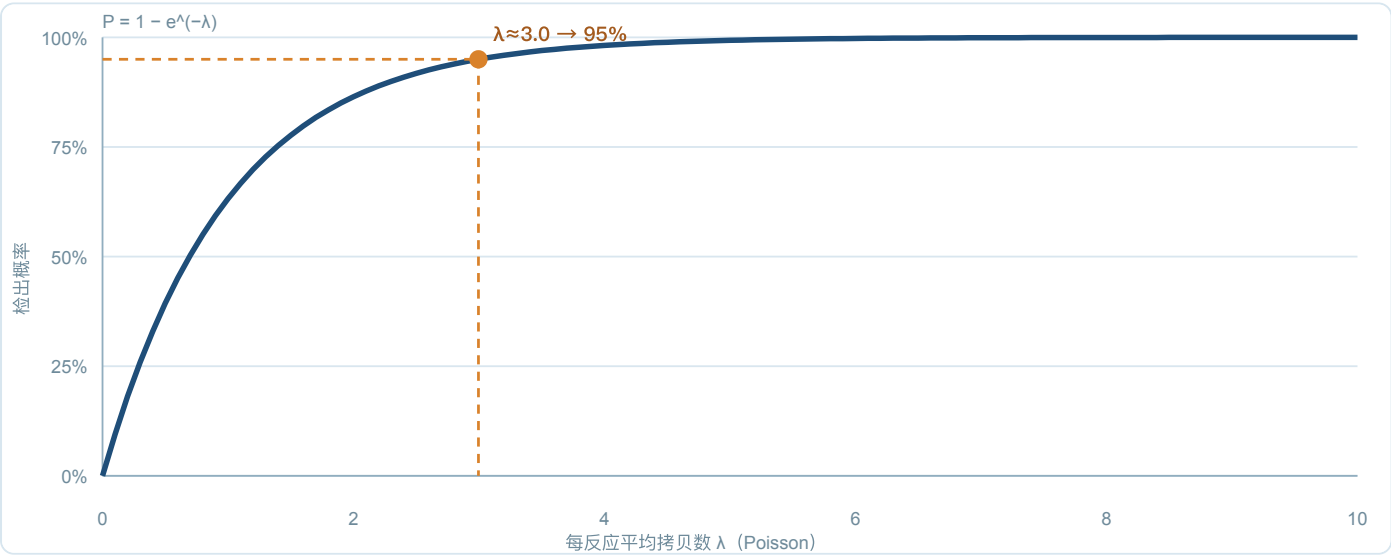


图 1 | Poisson 取样概率：λ≈3.0 时达到 95% 检出；这是理论下限，不是任何 assay 的实测 LOD。

2.2 取样体积与回收率

若样本浓度为 1 copy/μL、取样 5 μL，平均 λ=5；但提取回收 50% 后 λ≈2.5，95% 检出已不成立。增加取样体积、提高回收率、减少抑制，往往比单纯提高酶量更直接。[3][11]

数据边界 “LOD 1 copy”必须写清是每反应、每 μL、还是每采样体积；不写口径的 LOD 不可比较。

ENZYME KINETICS

3 三、酶学：哪些参数直接决定延伸与切割

酶学的“直接参数”是催化循环内的可测量：底物结合、催化速率、持续合成、探针切割和热失活。它们决定“同样模板能不能在有限循环内达到阈值”。

```
v = Vmax[S] / (Km + [S]) = kcat[E][S] / (Km + [S])
```

低底物时 v ≈ (kcat/Km)[E][S]；kcat/Km 常比单独 kcat 更接近“低浓度下的效率”。

参数	定义/单位	文献报告值或范围	对 qPCR 的含义	证据
延伸速率	nt/s 或 kb/min	Taq 约 2 kb/min（≈33 nt/s）；CL7-Taq 约 4 kb/min（≈67 nt/s）	决定延伸时间与短靶标可用性；不是 LOD 的唯一变量	[10]
持续合成能力 processivity	单个结合事件掺入的 nt 数	Taq 较低；长于 1 kb 的产量下降；Sso7d/CL7 融合可提高	影响长扩增子与低拷贝模板的完成率	[9][10]
催化效率 kcat/Km	$M^{-1}s^{-1}$	受 dNTP、模板、温度、缓冲体系影响；文献值不宜跨条件横比	低 dNTP 时决定延伸速率；比单独 kcat 更接近“效率”	[7]
5′核酸酶切割	PC/PY（切割量/产物量）	Taq-wt 77.39%；Taq388 91.96%；TM-Taq 88.19%（三基因平均）	决定 TaqMan 每扩增子的信号产出	[8]
热失活	95℃ 半衰期	约 40 min；97.5℃ 约 9 min（厂商资料）	95℃ 停留时间过长会损失活性酶	[24]
热启动激活	20 min 后活性比例	73–90%（文献实测，因酶而异）	激活不完全会降低有效酶浓度	[5]
错配/保真度	错误率	Taq 无 3′→5′ 校对，错配率高于高保真酶	灵敏度与保真度常需权衡	[7]

3.1 kcat/Km 与 processivity 的分工

kcat/Km 描述低底物浓度下的催化效率，受 dNTP 结合、金属离子、模板匹配和构象闭合影响；**processivity** 描述一次结合能连续掺入多少核苷酸，决定长扩增子或低拷贝模板能否“一次走完”。两者不是同一个参数：酶可以很快但容易脱落，也可以很持续但催化慢。[7]

3.2 Taq 的实测与工程化数据

- Taq 的延伸速率约 **2 kb/min**（≈33 nt/s）；CL7-Taq 融合酶约 **4 kb/min**（≈67 nt/s），并报告 **100×** 灵敏度提升。[10]
- 理性设计 Taq 的 N 端核酸酶结构域（L208I/E209K/E210R）可使聚合酶活性提高约 **5×**；在特定 GM 作物 qPCR 中 LOD 约 **0.1 copies/μL**，并耐受 **30%** 粗植物裂解液。[9]
- Taq 的 5′核酸酶切割效率可用 PC/PY（切割量/产物量）衡量：Taq-wt **77.39%**，Taq388 **91.96%**，TM-Taq **88.19%**；dNTP 存在时切割效率显著下降，说明聚合酶活性优先于核酸酶活性。[8]

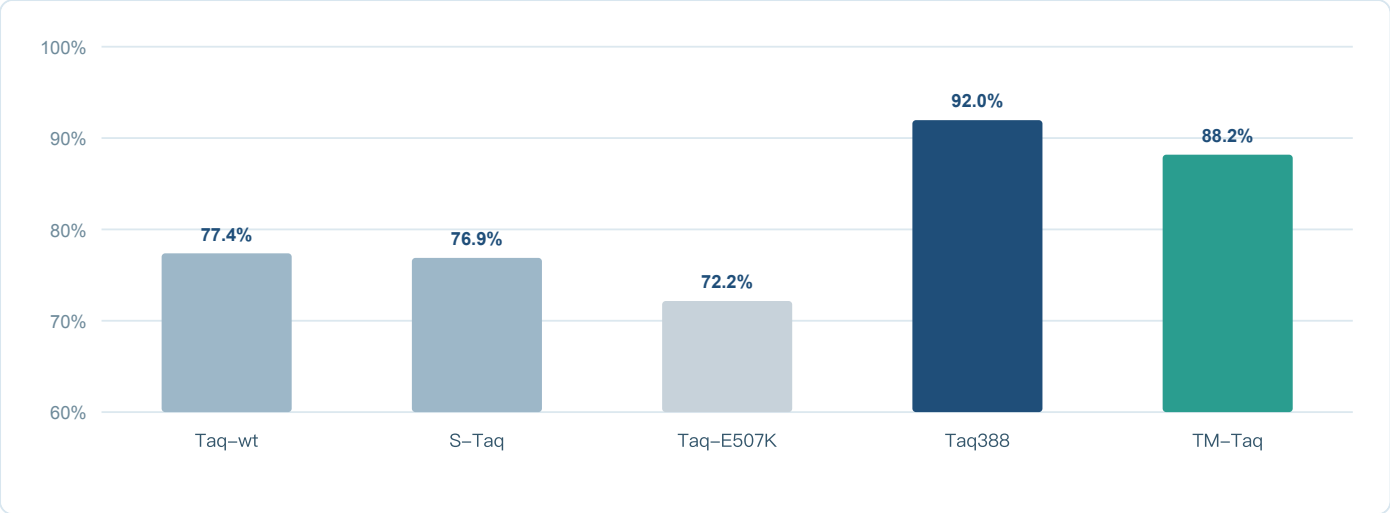


图 2 | Taq 变体的探针切割效率（PC/PY，三基因平均）。数据来自厂商主导研究，作为机制参考，不代表独立产品比较。[8]

3.3 TaqMan 的机制要点

TaqMan 不是“探针一结合就被切”：聚合酶先延伸，遇到探针时通过 5′→3′ 核酸酶/5′flap 内切与链置换协同切割；dNTP 充足时聚合酶活性占优，切割被压低。KlenTaq 缺失 5′核酸酶结构域，不能有效切割，但链置换更强，约 **97%** 探针保持完整，而 Taq-wt 仅约 **4%**。[8]

> **客户解释**
>
> “TaqMan 的信号不是酶越多越强，而是延伸和切割要配合。延伸太强、dNTP 太高，反而可能压低切割信号；这就是为什么有些体系‘酶活很好，但 TaqMan 信号不成比例’。”

> **数据边界** TaqMan 切割数据来自特定探针/模板/基因体系；不能直接外推到所有探针序列和所有 qPCR 仪器。

PROTEIN STRUCTURE

4 四、蛋白结构：结构域如何映射到动力学

Taq 属于 A 家族 DNA 聚合酶：N 端 5′核酸酶结构域、手掌（palm）催化中心、手指（fingers）dNTP 结合、拇指（thumb）DNA 结合。结构变化最终要落到“结合、催化、持续合成、切割、稳定性”五个可测参数上。



图 3 | Taq 结构域示意（非按比例）。结构坐标参考 PDB 1TAU / 1TAQ。[20]

结构要素	功能	改变后的动力学后果	对 qPCR 的影响	证据
5′核酸酶结构域	水解探针、5′flap 内切	缺失（KlenTaq）→ 无切割、链置换增强	TaqMan 信号弱；适合探针熔解曲线	[8]
手掌 palm	催化中心、二价金属离子	突变可改变 kcat、dNTP 选择性	影响延伸速率与错配识别	[7]

结构要素	功能	改变后的动力学后果	对 qPCR 的影响	证据
手指 fingers	dNTP 结合、诱导契合	闭合动力学改变；单分子见 20 μs 瞬态闭合	影响 dNTP 识别与催化节奏	[6]
拇指 thumb	DNA 结合、持续合成	亲和力/电荷改变可提高 processivity	长靶标、低拷贝完成率提高	[9][10]

4.1 构象动力学

单分子研究显示，Taq 的手指结构域在 dNTP 结合时发生快速瞬态闭合（约 20 μs 量级）；即使互补底物，每次催化掺入前也平均有约 5 次瞬态闭合。温度敏感性主要来自“开放态”的速率，而不是闭合/催化本身。[6] 这解释了为什么“提高温度”不只加快化学步骤，也改变蛋白构象 ensemble。

4.2 结构改造的取舍

缺失 5′核酸酶（KlenTaq）→ 切割消失、链置换增强；融合 DNA 结合蛋白（Sso7d/CL7）→ processivity、延伸速率、抗抑制提高；电荷突变（E507K）→ DNA 结合/抗抑制改善，但在某些体系中切割效率反而下降。[8][9][10] 结构改造很少只改善一个参数，通常同时改变速度、保真度、持续合成和稳定性。

> **数据边界** 结构示意用于解释机制，不等同于高分辨率结构解析；具体突变的效果必须在目标模板与缓冲体系中实测。

FORMULATION

5 五、配方：游离 Mg^{2+}、dNTP 与添加剂

配方的作用不是“给酶加营养”，而是改变酶与底物的有效状态：游离 Mg^{2+} 决定催化可用性，dNTP 既是底物又螯合 Mg^{2+}，离子强度改变 DNA 结合，添加剂改变变性与二级结构。

组分/条件	常用筛选窗口	对酶促反应的作用	过量或不当的负向	证据
Mg^{2+}（总）	Taq 约 1.5–2.0 mM；常规 1–4 mM，0.5 mM 递增	辅因子；影响 dNTP 结合与催化	过高可能降低保真度/特异性；与 dNTP 螯合	[22][23]
dNTP	各 0.2 mM；Mg^{2+} 比总 dNTP 高 0.5–1 mM	底物；决定延伸速率	过量螯合 Mg^{2+}、抑制反应	[22][23]
K^+/Na^+ 等一价离子	KCl 约 50 mM	离子强度；影响 DNA 结合	升高会持续降低延伸速率	[5][23]
BSA	约 0.6%（文献体系）	减少酶吸附、缓解血液抑制	批次差异；不是万能解	[10]
DMSO	常用 1–10%	改善 GC 富集模板的变性	高浓度抑制；可能降低特异性	[5]
甜菜碱/甲酰胺/丙二醇	甜菜碱 0.5–2 M；甲酰胺 1–5%	降低 Tm、缓解二级结构	明显降低延伸速率	[5]
甘油	5–10% 常见	稳定酶、降低冰点	高浓度黏度/抑制；对速率影响小	[5]
pH/缓冲液	Tris 约 pH 8.3–8.8（室温）	维持电荷与活性	温度/pH 漂移改变有效活性	[21][23]

5.1 Mg^{2+} 与 dNTP 是联动变量

总 Mg^{2+} 不等于游离 Mg^{2+}。每个 dNTP 都螯合 Mg^{2+}；dNTP 从 0.2 mM 提高到 0.4 mM（每种）时，总 dNTP 增加约 0.8 mM，会显著改变游离 Mg^{2+}。因此“Mg^{2+} 最优”必须和 dNTP 浓度一起定义。[22][23]

游离 Mg^{2+} ≈ 总 Mg^{2+} − 被 dNTP/EDTA/柠檬酸等螯合的部分

实操上以 Mg^{2+} 滴定 + E/Ct 响应找窗口，不靠单一公式。

5.2 添加剂：有正向，也有明确负向

在一项实时荧光延伸速率实验中，DMSO 可使延伸速率最多提高 **33%**；甘油影响很小；甜菜碱、甲酰胺和 1,2-丙二醇随浓度升高而**降低**延伸速率；一价阳离子（Li^+/Na^+/K^+/Cs^+/NH_4^+）持续**降低**延伸速率。[5] 这与“添加剂越多越能救体系”的直觉相反：它们改变的是热力学/离子环境，存在明确的最优窗口。

5.3 抗抑制：BSA 的定量例子

野生型 Taq 在 **0.2%** 血液中即完全被抑制；加入 **0.6% BSA** 后可在 **2%** 血液中扩增。[10] 这是“配方通过间接参数（酶吸附/抑制剂隔离）改善灵敏度”的典型例子，但 BSA 不能替代提取，也不能保证所有基质。

> **客户解释**
>
> “配方没有万能最优。Mg^{2+}、dNTP、盐和添加剂是一个联动矩阵；我们通常先固定引探，再做 Mg^{2+}×dNTP 的小矩阵，最后才看添加剂，避免一次改太多变量。”

6 PRIMERS & PROBES

六、引物与探针：Tm 不是越高越好

引探设计直接作用于“退火占据率、特异性、探针切割”。最关键的不是预测 Tm，而是实验退火温度 Ta 与缓冲体系的匹配。

参数	常用设计窗口	机制	过度/不足的后果	证据
引物长度	18–24 nt	平衡特异性与退火	过短→非特异；过长→二级结构	[4]
引物 Tm / Ta	Tm 约 58–62℃；Ta 需实验确定	Ta 决定最大结合量，比 Tm 更关键	只看 Tm 不看 Ta → 假阴性/非特异	[4]
探针长度/Tm	18–25 nt；Tm 约 65–70℃，常高于引物 5–10℃	保证延伸阶段仍结合并被切割	过高→区分度下降；过低→信号弱	[23]
扩增子长度	qPCR 常用 70–200 bp；TaqMan 常 50–150 bp	短扩增子受 processivity 限制小	过长→效率下降、低拷贝漏检	[4][8]
GC 含量	约 40–60%	影响 Tm 与二级结构	过高→二级结构；过低→Tm 不足	[4]
引物二聚体/发夹	ΔG 尽量低；3′端避免互补	竞争引物/模板，产生非特异信号	二聚体→假阳性/灵敏度下降	[4]
探针 5′端	避免 5′G；报告基团/淬灭基团匹配	影响切割识别与淬灭效率	5′G 可能降低切割效率	[8][23]
修饰（MGB/LNA）	按区分度需求选择	提高 Tm/错配识别	过度稳定→等位基因区分下降	[4][8]

6.1 Ta 比 Tm 更关键

引物设计综述明确指出：决定引物性能的关键变量是退火温度 Ta，而不是 Tm；最优 Ta 必须实验确定，且不同 master mix 之间不能直接外推。引物二聚体、模板二级结构、BLAST 未覆盖的错配杂合都会造成假阴性或非特

异。[4]

6.2 探针设计的两难

探针 Tm 高一些有利于延伸阶段保持结合，但过高会降低错配区分度；过低则信号弱、切割不足。常用“探针 Tm 高于引物 5–10℃”是设计起点，不是硬性保证；MGB/LNA 可提高 Tm，但也可能压缩区分窗口。[23][4]

6.3 扩增子长度的权衡

短扩增子受 processivity 限制小、效率通常更高；但过短可能降低特异性或限制探针位置。qPCR 常用 70–200 bp，TaqMan 常 50–150 bp；最终以标准曲线 E 和 LOD95 验证。[4][8]

> **客户解释**
> “Tm 只是设计起点。真正决定体系的是 Ta、缓冲体系和引探二级结构；同一对引物换一个 master mix，最优 Ta 可能就变了。”

RT-qPCR

7 七、RT-qPCR：逆转录步骤可能先决定灵敏度

RT-qPCR 比 qPCR 多了一段逆转录。对 RNA 靶标，RT 的 processivity、热稳定性、RNase H 活性和 RNA 二级结构，可能在 Taq 之前就设定了下限；因此本章单列，不混入 DNA qPCR 的结论。

环节	关键参数	对 RT-qPCR 灵敏度的影响	常见调整	证据
逆转录	RT 的 processivity、热稳定性、RNase H 活性	RNA 二级结构/长片段可导致 RT 提前脱落	提高 RT 温度、耐热 RT、优化引物	[12]
一步法 vs 两步法	RT 与 qPCR 同管/分管	一步法减少转移损失但优化空间小；两步法可分别优化	低拷贝 RNA 先比较两种模式	[1][2]
RNA 质量	完整性、抑制剂、gDNA 残留	降解/抑制会直接抬高 LOD	RNase-free、DNase、内参	[11]
引物策略	基因特异引物/随机引物/Oligo(dT)	决定 RT 起始效率与覆盖区域	按靶标长度与 RNA 类型选择	[4]

7.1 一步法与两步法

一步法减少转移损失、适合低拷贝与高通量；两步法可分别优化 RT 与 qPCR，适合困难 RNA 或需要独立控制 RT 温度的体系。两者没有绝对优劣，应以 LOD95 与重复性比较。[1][2]

7.2 耐热 RT 的意义

提高 RT 反应温度可以打开 RNA 二级结构，但普通 RT 在高温下失活；耐热 RT 的理性设计（例如基于 Pfu DNA 聚合酶骨架）是当前一条工程路线。[12] 对客户体系，先判断“RT 限制”还是“qPCR 限制”：可用相同 RNA 输入比较一步法/两步法与不同 RT 温度。

> **数据边界** RT-qPCR 的 LOD 不能直接由 DNA qPCR 的酶学数据推算；RT 步骤、RNA 完整性和 DNase 处理都要单独验证。

8 SAMPLE MATRIX

八、样本基质与抑制剂：把“管内性能”拉回现实

临床样本很少是纯水。血液、肝素、EDTA、SDS、腐殖酸、胍盐和乙醇都会通过不同机制降低有效酶活或荧光信号；这部分常比酶改造更决定实测 LOD。

抑制剂/基质	主要来源	作用机制	缓解手段	证据
血红素/血液	全血、血卡	与酶/核酸结合，抑制扩增	BSA、稀释、提取、耐抑制酶	[10][11]
肝素	采血管	多阴离子，竞争 DNA 结合	肝素酶、提取、低浓度	[11]
EDTA	采血管/缓冲液	螯合 Mg^{2+}	Mg^{2+} 滴定、脱盐	[11]
SDS/去污剂	裂解液	使酶变性	稀释、纯化	[11]
腐殖酸	土壤/环境样本	抑制酶、淬灭荧光	提取纯化、BSA、稀释	[11]
胍盐/乙醇	提取残留	抑制酶/影响退火	洗涤、干燥、稀释	[11]

8.1 抑制的三种表现

- **Ct 延后/斜率变平：**扩增效率下降，低拷贝先漏检。
- **荧光基线抬高/淬灭：**信号被基质吸收或淬灭，阈值判定失真。
- **提取回收下降：**不是酶的问题，但表现为“灵敏度不够”。

8.2 处理顺序

先判断是“抑制”还是“回收损失”：加标回收、稀释线性、内参与基质匹配标准曲线是三种最常用的排查。BSA、稀释、提取纯化和耐抑制酶都可作为手段，但顺序应先做基质排查，再改配方。[10][11]

> **客户解释**
>
> “如果同一个体系在纯模板里 LOD 很好、到血清/粪便里变差，优先查基质抑制和提取回收，而不是先换酶。酶改造只能解决一部分抑制。”

9 LEVERS & TRADE-OFFS

九、正向/负向调整矩阵：每个动作都有代价

下表把“酶—配方—引探—样本”四类调整放在同一张矩阵里。方向箭头是机制上的预期，不是保证；最后一列是必须验证的指标。

调整杠杆	主要作用参数	方向	可能收益	负向/代价	验证指标
提高酶浓度	有效酶量	↑	低拷贝延伸概率提高	背景/引物二聚体、成本	LOD95、阴性对照
提高 processivity	持续合成	↑	长靶标/低拷贝完成率提高	速度/保真度可能下降	长扩增子效率
提高 5′核酸酶切割	信号/扩增子	↑	TaqMan 信号更强	非特异切割/背景	PC/PY、阴性对照
热启动	非特异延伸	↓	室温组装更稳、特异性提高	激活不完全（20 min 仅 73–90%）	激活曲线、Ct

调整杠杆	主要作用参数	方向	可能收益	负向/代价	验证指标
Mg^{2+} 滴定	游离 Mg^{2+}	最优点	活性/信号提高	过量降低保真度/特异性	E、LOD95
dNTP 调整	底物/Mg 缓冲	最优点	延伸速率提高	过量螯合 Mg^{2+}/抑制	E、Mg^{2+} 滴定
KCl/离子强度	DNA 结合	最优点	特异性提高	过高抑制延伸	E、Ct
BSA	酶吸附/抑制剂	↑（适量）	抗抑制、低拷贝信号提高	批次差异	基质样本 LOD
DMSO	GC 二级结构	适量	GC 富集模板扩增改善	高浓度抑制/特异性下降	E、熔解曲线
甜菜碱/甲酰胺	Tm/二级结构	适量	GC 富集模板改善	延伸速率下降	E、Ct
引物 Tm/Ta 匹配	退火占据率	优化	特异性/效率提高	只看 Tm 可能失败	E、熔解曲线
短扩增子	processivity 限制	↓ 长度	效率/低拷贝检出提高	太多短片段可能影响特异性	E、LOD95
探针修饰	Tm/错配识别	按需	区分度提高	过度稳定降低区分度	ΔCt、熔解曲线
样本前处理	抑制剂/回收	优化	有效模板提高	回收损失/流程复杂	回收率、LOD95

9.1 三条硬规则

1. **先定口径：**改一个参数后，至少同时看 E、Ct 和 LOD95；只看 Ct 提前可能把背景/非特异误判为灵敏度提高。
2. **一次只动一组：**Mg^{2+}、dNTP、酶量、Ta 之间存在交互，单因素最优不等于组合最优。
3. **把负向写进方案：**每个正向动作都配一个反证指标（阴性对照、熔解曲线、测序/电泳、基质加标）。

> **数据边界** 矩阵中的“正向/负向”是条件依赖的：同一改动在不同模板、不同缓冲体系、不同仪器上可能反转。

10 CLINICAL SENSITIVITY
十、临床灵敏度：真实数据与参考区间

临床灵敏度是诊断准确性指标，不是酶学参数。下面列出已发表的真实数据，用来说明“量级与异质性”，不是给某一产品定目标。

疾病/场景	检测方法	合并灵敏度（95% CI）	研究规模/参考标准	证据
SARS-CoV-2	鼻咽拭子 RT-PCR	89.0%（85.4–91.8）	13 项研究、25 个 RT-PCR 方案；meta 分析	[14]
MRSA 定植/感染	PCR	92.5%（87.4–95.9）	29 篇文献、74 个准确度测量；PCR vs 培养	[16]
宫颈高级别病变	14 型 HR-HPV DNA	91.6%（88.1–94.1）	38 项研究、18,737 名 HIV 感染女性；CIN2+ 组织学	[17]
脓毒症	数字 PCR（血）	94%（85–98）	8 项研究、1,278 例；血培养为参考	[18]
CT 多部位混合	NAAT	93.1%（90.5–95.0）	17 项研究；单部位 NAAT 为参考	[15]
NG 多部位混合	NAAT	94.1%（90.9–96.3）	17 项研究；单部位 NAAT 为参考	[15]

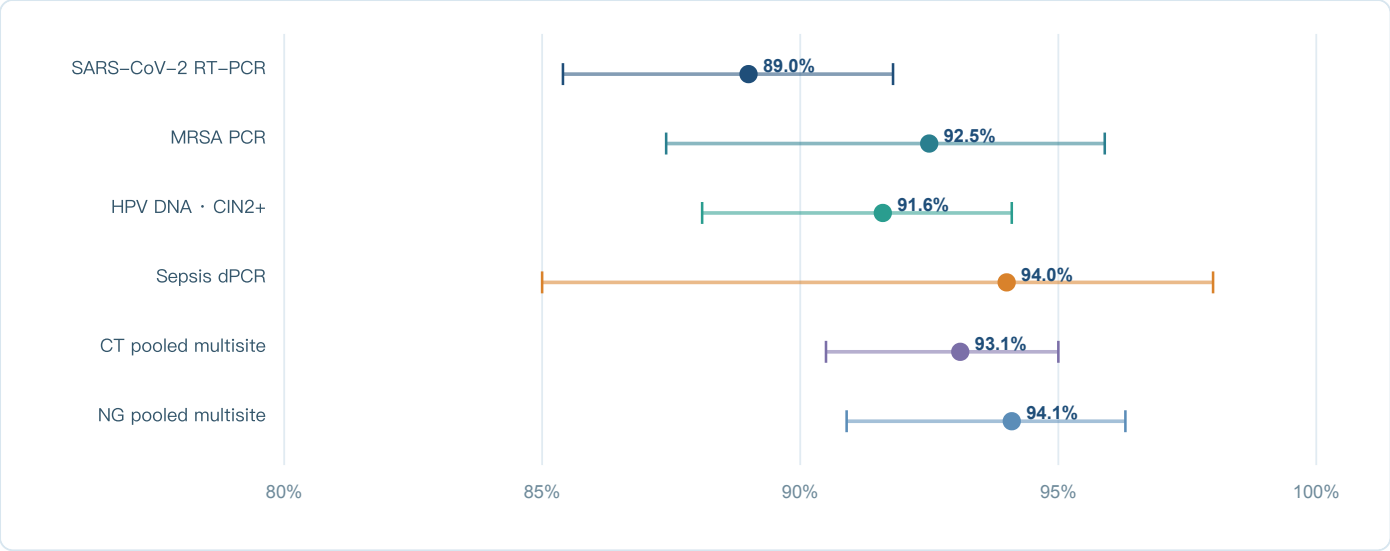


图 4 | 已发表临床灵敏度示例（点估计与 95% CI）。不同疾病、参考标准和人群不可直接横向比较。[14][15][16][17][18]

10.1 为什么不能用一个数概括

同一检测方法在不同人群、不同采样部位、不同参考标准下，临床灵敏度会变化。例如 SARS-CoV-2 鼻咽拭子 RT-PCR 的合并灵敏度为 89.0%（85.4–91.8），这是 13 项研究、25 个方案的合并值，不代表每一个 assay。[14] MRSA PCR 的合并灵敏度为 92.5%（87.4–95.9），参考标准是培养。[16] HPV DNA 在 HIV 感染女性中 CIN2+ 的合并灵敏度为 91.6%（88.1–94.1）。[17]

10.2 参考数值怎么用

- **作为量级参考：**上述传染/肿瘤筛查场景多在 89–94% 区间；不是“合格线”。
- **作为对照设计：**临床验证应报告目标人群、参考标准、采样部位、阳性/阴性例数，而不是只报一个百分比。
- **与 LOD 分开：**LOD95 是分析性能；临床灵敏度要按 STARD 类框架做队列验证。[19]

```
PPV = TP / (TP + FP); NPV = TN / (TN + FN)
```

PPV/NPV 随患病率变化；同一 assay 在不同流行率下解释不同。

> **客户解释**
>
> “文献里 qPCR 的临床灵敏度常见在 89–94% 这个量级，但这不是标准线。我们要看它测的是哪个人群、用什么参考标准、采样是否到位；这些条件变了，数字就会变。”

11 VALIDATION & DOE

十一、验证设计：把机理变成可验收的数据

对外解释需要“可复现的证据包”。验证可分为四层：分析灵敏度、扩增效率、条件矩阵、临床/基质验证。

实验	设计	样本量/重复	读出	验收/解释
LOD95	3 个低浓度 × 20 重复 × 3 次运行	每浓度 60 孔	95% 检出率、概率曲线	报告最低浓度与 CI；不得只用 1 次
扩增效率	5 个 10 倍稀释点 × 3 重复	15 孔/次，至少 2 次	slope、E、R^2	E 90–110%，R^2≥0.99；异常点回查
Mg^{2+}/dNTP 矩阵	Mg 3 水平 × dNTP 2 水平	3 重复 × 2 次	E、Ct、LOD95	选最优点而非单点最优
引探 Tm/Ta 梯度	Ta 梯度 3–5 点	3 重复	Ct、熔解峰、阴性对照	以 Ta 实验为准，不只看预测 Tm
样本基质	高/中/低抑制基质加标	3 重复 × 3 浓度	回收率、LOD95	基质特异性结论
临床灵敏度	前瞻/回顾队列，盲法	按目标人群估算	TP/FN、灵敏度/特异度	遵循 STARD；报告参考标准与人群

11.1 最小证据包

- **LOD95：**至少 3 个低浓度、20 重复、3 次运行；报告 95% 检出浓度与置信区间。
- **E：**5 个 10 倍稀释点、3 重复、至少 2 次独立运行；报告 slope、E、R^2。
- **条件矩阵：**Mg^{2+} × dNTP、Ta × 引探、酶量 × 基质；不要只做单因素。
- **临床/基质：**目标人群、参考标准、盲法、样本量；遵循 STARD/MIQE 报告。[1][19]

> **数据边界** LOD95 的重复数和浓度点不足，会系统性高估灵敏度；只报“最低检出浓度”而不报检出率/重复数，不可比较。

EVIDENCE & GAPS

12 十二、证据表与缺口

本报告优先使用同行评审文献、结构数据库与方法学指南；厂商资料只用于“参考窗口”，并单独标注。下表是可追溯的证据清单。

编号	来源	类型/等级	本报告用它支持	限制
[1]	Bustin SA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611–622.	A	LOD/E/Ct/临床灵敏度定义	报告规范，不是机理实验
[2]	Bustin SA, et al. MIQE 2.0: revision of the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments guidelines. Clin Chem. 2025.	A	更新后的 qPCR 报告口径	不提供酶学数据
[3]	Forootan A, Sjöback R, Björkman J, et al. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). Biomol Detect Quantif. 2017;12:1–6.	A	LOD95、LoB/LoD 统计	以特定 qPCR 体系为例
[4]	Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. Biomol Detect Quantif. 2017;14:19–28.	A	引物设计、Ta、二级结构	综述/方法学

编号	来源	类型/等级	本报告用它支持	限制
[5]	Montgomery JL, Wittwer CT. Influence of PCR reagents on DNA polymerase extension rates measured on real-time PCR instruments. Clin Chem. 2014;60(2):334–340.	A	延伸速率与添加剂影响	体外实时荧光体系
[6]	Turvey MW, Gabriel KN, Lee W, et al. Single-molecule Taq DNA polymerase dynamics. Sci Adv. 2022;8(10):eabl3522.	A	Taq 单分子构象动力学	非 qPCR LOD 直接数据
[7]	Kuznetsova AA, et al. Structural and molecular kinetic features of activities of DNA polymerases. Int J Mol Sci. 2022;23(12):6373.	A	聚合酶结构/动力学框架	综述，非 Taq 专属
[8]	Cao Q, Zou Z, Cao D, et al. Mechanism and application of Taq DNA polymerase in TaqMan qPCR. Front Bioeng Biotechnol. 2026;14:1773703.	B*（厂商主导）	TaqMan 切割、变体 PC/PY	厂商主导，需独立互证
[9]	Lu Z, et al. Protein engineering of Taq DNA polymerase for ultrafast PCR and its application in molecular diagnostics of genetically modified crops. J Agric Food Chem. 2026;74(1):1264–1275.	A/B	Taq 工程化、超快 qPCR	特定 GM 作物体系
[10]	Li Z, et al. A fusion of Taq DNA polymerase with the CL7 protein from Escherichia coli remarkably improves DNA amplification. Molecules. 2024;29(5):1145.	A	CL7–Taq 灵敏度/延伸/抗抑制	特定融合酶体系
[11]	Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. Anal Bioanal Chem. 2020;412:2009–2023.	A	PCR 抑制机制与对策	基质相关，需本地验证
[12]	Kuznetsova AA, et al. Engineering a thermostable reverse transcriptase for RT–PCR through rational design of Pyrococcus furiosus DNA polymerase. Biomolecules. 2025;15(11):1507.	A	耐热 RT 工程	RT 章节，非 qPCR 全体系
[13]	Lee SJ, et al. Development of a simple direct and hot-start PCR using Escherichia coli–expressing Taq DNA polymerase. Int J Mol Sci. 2023;24(14):11405.	B	热启动 Taq 构建	方法学，非 LOD 数据
[14]	Marando M, et al. Diagnostic sensitivity of RT–PCR assays on nasopharyngeal specimens for detection of SARS–CoV–2 infection: a systematic review and meta–analysis. Caspian J Intern Med. 2022;13:139–147.	A	SARS–CoV–2 临床灵敏度	异质性高，非产品承诺
[15]	Aboud L, et al. Diagnostic accuracy of pooling urine, anorectal, and oropharyngeal specimens for the detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: a systematic review and meta–analysis. BMC Med. 2021;19:255.	A	CT/NG 混合样本灵敏度	混合采样，非单样本
[16]	Luteijn JM, et al. Diagnostic accuracy of culture–based and PCR–based detection tests for methicillin–resistant Staphylococcus aureus: a meta–analysis. Clin Microbiol Infect. 2011;17(2):146–154.	A	MRSA PCR 灵敏度	2011 年 meta 分析

编号	来源	类型/等级	本报告用它支持	限制
[17]	Kelly H, et al. Diagnostic accuracy of cervical cancer screening strategies for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+/CIN3+) among women living with HIV: a systematic review and meta-analysis. EClinicalMedicine. 2022;53:101645.	A	HPV DNA CIN2+ 灵敏度	HIV 感染女性人群
[18]	Li Y, Ma M, Xu X, Li Q, Ji C. Value of digital PCR in the early diagnosis of sepsis: a systematic review and meta-analysis. J Crit Care. 2022;71:154138.	A	脓毒症 dPCR 灵敏度	dPCR，不是 qPCR
[19]	Sĭmundic´AM. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. Biochem Med. 2009;19(3):203–211. PMC4975285.	A	临床灵敏度定义	定义，不是 qPCR 性能
[20]	RCSB PDB. Taq polymerase—DNA complexes 1TAU and 1TAQ.	A	Taq 结构域/复合物	结构示意，非按比例
[21]	Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. J Vis Exp. 2012;(63):e3998.	C	PCR 优化方法学	协议，非机理定量
[22]	NEB. Guidelines for PCR optimization with Taq DNA polymerase（厂商技术资料，Mg^{2+} 1.5–2.0 mM；比总 dNTP 高 0.5–1 mM）. 访问 2026-11.	C	Mg^{2+} 参考窗口	厂商资料
[23]	Thermo Fisher Scientific. PCR setup—six critical components to consider（厂商技术资料，Mg^{2+} 1–4 mM，0.5 mM 递增）. 访问 2026-11.	C	PCR 组分参考窗口	厂商资料
[24]	Ampliqon / Thermo Fisher. Taq DNA polymerase stability data（厂商资料：95℃ 半衰期约 40 min；97.5℃ 约 9 min）. 访问 2026-11.	C	Taq 热稳定性	厂商资料

12.1 主要缺口

- **同一 qPCR 条件下的酶变体动力学数据少：**多数 kcat/Km/延伸速率来自引物延伸或体外荧光体系，不能直接等同 LOD。[5][7]
- **配方最优值高度体系依赖：**Mg^{2+}/dNTP/添加剂没有普适最优；必须做矩阵。[22][23]
- **临床灵敏度不能由 LOD 推算：**需要目标人群与参考标准；本报告只给文献示例，不给产品承诺。[19]
- **厂商主导的 TaqMan 切割数据需独立互证：**本报告将其标为 B*，只用于机制解释。[8]

12.2 参考文献

1. Bustin SA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611–622. DOI/ID: 10.1373/clinchem.2008.112797 | 等级 A
2. Bustin SA, et al. MIQE 2.0: revision of the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments guidelines. Clin Chem. 2025. DOI/ID: 10.1093/clinchem/hvaf043 | 等级 A
3. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, et al. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). Biomol Detect Quantif. 2017;12:1–6. DOI/ID: 10.1016/j.bdq.2017.04.001 | 等级 A
4. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. Biomol Detect Quantif. 2017;14:19–28. DOI/ID: 10.1016/j.bdq.2017.11.001 | 等级 A
5. Montgomery JL, Wittwer CT. Influence of PCR reagents on DNA polymerase extension rates measured on real-time PCR instruments. Clin Chem. 2014;60(2):334–340. DOI/ID: 10.1373/clinchem.2013.212829 | 等级 A

6. Turvey MW, Gabriel KN, Lee W, et al. Single-molecule Taq DNA polymerase dynamics. Sci Adv. 2022;8(10):eabl3522. DOI/ID: 10.1126/sciadv.abl3522 | 等级 A
7. Kuznetsova AA, et al. Structural and molecular kinetic features of activities of DNA polymerases. Int J Mol Sci. 2022;23(12):6373. DOI/ID: 10.3390/ijms23126373 | 等级 A
8. Cao Q, Zou Z, Cao D, et al. Mechanism and application of Taq DNA polymerase in TaqMan qPCR. Front Bioeng Biotechnol. 2026;14:1773703. DOI/ID: 10.3389/fbioe.2026.1773703 | 等级 B*（厂商主导）
9. Lu Z, et al. Protein engineering of Taq DNA polymerase for ultrafast PCR and its application in molecular diagnostics of genetically modified crops. J Agric Food Chem. 2026;74(1):1264–1275. DOI/ID: 10.1021/acs.jafc.5c12875 | 等级 A/B
10. Li Z, et al. A fusion of Taq DNA polymerase with the CL7 protein from Escherichia coli remarkably improves DNA amplification. Molecules. 2024;29(5):1145. DOI/ID: 10.3390/molecules29051145 | 等级 A
11. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. Anal Bioanal Chem. 2020;412:2009–2023. DOI/ID: 10.1007/s00216-020-02490-2 | 等级 A
12. Kuznetsova AA, et al. Engineering a thermostable reverse transcriptase for RT-PCR through rational design of Pyrococcus furiosus DNA polymerase. Biomolecules. 2025;15(11):1507. DOI/ID: 10.3390/biom15111507 | 等级 A
13. Lee SJ, et al. Development of a simple direct and hot-start PCR using Escherichia coli-expressing Taq DNA polymerase. Int J Mol Sci. 2023;24(14):11405. DOI/ID: 10.3390/ijms241411405 | 等级 B
14. Marando M, et al. Diagnostic sensitivity of RT-PCR assays on nasopharyngeal specimens for detection of SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis. Caspian J Intern Med. 2022;13:139–147. DOI/ID: 10.22088/cjim.13.0.139 | 等级 A
15. Aboud L, et al. Diagnostic accuracy of pooling urine, anorectal, and oropharyngeal specimens for the detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: a systematic review and meta-analysis. BMC Med. 2021;19:255. DOI/ID: 10.1186/s12916-021-02160-9 | 等级 A
16. Luteijn JM, et al. Diagnostic accuracy of culture-based and PCR-based detection tests for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2011;17(2):146–154. DOI/ID: 10.1111/j.1469-0691.2010.03202.x | 等级 A
17. Kelly H, et al. Diagnostic accuracy of cervical cancer screening strategies for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+/CIN3+) among women living with HIV: a systematic review and meta-analysis. EClinicalMedicine. 2022;53:101645. DOI/ID: 10.1016/j.eclinm.2022.101645 | 等级 A
18. Li Y, Ma M, Xu X, Li Q, Ji C. Value of digital PCR in the early diagnosis of sepsis: a systematic review and meta-analysis. J Crit Care. 2022;71:154138. DOI/ID: 10.1016/j.jcrc.2022.154138 | 等级 A
19. Sĭmundic´AM. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. Biochem Med. 2009;19(3):203–211. PMC4975285. DOI/ID: PMC4975285 | 等级 A
20. RCSB PDB. Taq polymerase—DNA complexes 1TAU and 1TAQ. DOI/ID: PDB 1TAU / 1TAQ | 等级 A
21. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. J Vis Exp. 2012;(63):e3998. DOI/ID: 10.3791/3998 | 等级 C
22. NEB. Guidelines for PCR optimization with Taq DNA polymerase（厂商技术资料，Mg^{2+} 1.5–2.0 mM；比总 dNTP 高 0.5–1 mM）. 访问 2026-11. DOI/ID: neb.com | 等级 C
23. Thermo Fisher Scientific. PCR setup—six critical components to consider（厂商技术资料，Mg^{2+} 1–4 mM, 0.5 mM 递增）. 访问 2026-11. DOI/ID: thermofisher.com | 等级 C
24. Ampliqon / Thermo Fisher. Taq DNA polymerase stability data（厂商资料：95℃ 半衰期约 40 min；97.5℃ 约 9 min）. 访问 2026-11. DOI/ID: 厂商稳定性资料 | 等级 C