PCR SENSITIVITY · EVIDENCE MAP

PCR 检测体系灵敏度 从样本到阈值的证据地图

TaqMan qPCR 为主；RT-qPCR 单列一章；同时看 LOD95、扩增效率 E、Ct 与临床灵敏度。本页用于确认报告结构，不作为最终技术结论。

灵敏度是串联系统的总结果，不是单一酶活指标。

低拷贝时，取样体积与 Poisson 分布先设下限；酶学参数决定“能否高效延伸”，配方决定“酶与底物的有效状态”，引探决定“能否特异退火并被切割”。**任何一个环节的损失，都会抵消另一环节的增益。**

因果链 / CAUSAL CHAIN

01 取样与模板回收
每反应有效拷贝数、提取回收率、基质抑制
LOD 的统计下限 [3]

02 变性 / 模板可及
GC 含量、二级结构、片段完整性
引物能否找到靶点 [6]

03 引物 / 探针退火
Tm、ΔG、二级结构、引物二聚体
退火占据率与特异性 [6]

04 聚合酶结合 / 延伸
kcat/Km(dNTP)、processivity、延伸速率、活性酶比例
扩增效率 E 的核心 [4][5]

05 探针切割
5′核酸酶切割效率、探针可及性、链置换
每扩增子的信号产出 [5]

06 信号 / 阈值
背景荧光、淬灭效率、仪器增益、阈值算法
Ct 与 LOD95 的判定 [1][3]

证据簇 / EVIDENCE CLUSTERS

簇	核心问题	代表证据（等级）	主要缺口
A	**口径与统计** LOD95、E、Ct、临床灵敏度分别回答什么?	MIQE；MIQE 2.0；LOD/LOQ 方法（A）	临床灵敏度不是 LOD 的同义词
B	**酶动力学与结构** 哪些动力学量直接决定延伸与切割?	DNA 聚合酶动力学综述；TaqMan 机制研究（B*，厂商主导）；PDB 1TAU/1TAQ（A）	同一 qPCR 条件下的突变体动力学数据少
C	**配方与辅因子** 游离 Mg^{2+}、dNTP/Mg、离子强度如何改变有效活性?	PCR 优化方法学（C）；MIQE 报告框架（A）	配方多为经验矩阵，缺普适最优值
D	**引探热力学** Tm/ΔG、二级结构、扩增子长度如何影响退火与切割?	qPCR 引探设计综述（B）；TaqMan 机制（B*）	过度稳定探针会降低区分度
E	**体系边界** 热启动、RT、样本基质与抑制剂如何改写结论?	PCR 抑制机制综述（A）；耐热 RT 工程（B）；热启动 Taq（B）	不同样本基质需独立验证
F	**临床灵敏度** 患者阳性检出比例由什么决定?	诊断准确性基本定义（A）	需临床样本与目标人群，不能由酶学推算

等级： A 同行评审且直接相关 | B 同行评审但间接/体系特异 | B* 厂商主导研究，需独立互证 | C 方法学/协议 | G 缺口。临床灵敏度不进入酶学因果链，单独作为诊断准确性指标处理。

正向调整 / 需有条件
processivity↑ · kcat/Km(dNTP)↑ · 游离 Mg^{2+} 滴定 · Tm/ΔG 匹配 · 短扩增子 · 热启动 · 基质前处理

负向作用 / 常见反向
Mg^{2+}/dNTP 过量 · 高盐/甘油 · 探针过度稳定 · 引物二聚体 · 长扩增子/高 GC · 反复冻融 · 基质抑制剂

报告目录 / CONTENTS

对外技术资料版 · 以客户能理解的因果链组织，不按论文罗列

00 摘要：一张图看懂灵敏度
01 四个口径：LOD95、E、Ct、临床灵敏度
02 串联模型：从样本到阈值
03 酶学：kcat/Km、processivity、延伸速率、5′核酸酶
04 蛋白结构：A 家族结构域与结构–功能权衡
05 配方：游离 Mg^{2+}、dNTP/Mg、离子强度、添加剂
06 引探：Tm/ΔG、二级结构、扩增子、探针切割
07 边界：热启动、RT-qPCR、样本基质与抑制剂
08 正向 / 负向调整矩阵：条件、收益、代价
09 实验验证：DoE 与 LOD95 确认
10 证据表、缺口清单、术语表

[1] Bustin SA, et al. MIQE guidelines. Clin Chem. 2009. DOI 10.1373/clinchem.2008.112797
[2] Bustin SA, et al. MIQE 2.0. Clin Chem. 2025. DOI 10.1093/clinchem/hvaf043
[3] Methods to determine LOD/LOQ in qPCR. Biomol Detect Quantif. 2017. DOI 10.1016/j.bdq.2017.04.001
[4] Kuznetsova AA, et al. Structural and molecular kinetic features of DNA polymerases. IJMS. 2022. DOI 10.3390/ijms23126373
[5] Cao Q, et al. Mechanism and application of Taq DNA polymerase in TaqMan qPCR. Front Bioeng Biotechnol. 2026. DOI 10.3389/fbioe.2026.1773703（Vazyme 主导）
[6] qPCR primer design revisited. Biomol Detect Quantif. 2017. DOI 10.1016/j.bdq.2017.11.001
[7] PCR: basic protocol plus troubleshooting and optimization. J Vis Exp. 2012. DOI 10.3791/3998
[8] Sidstedt M, et al. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS. Anal Bioanal Chem. 2020. DOI 10.1007/s00216-020-02490-2
[9] RCSB PDB: Taq polymerase–DNA complexes 1TAU / 1TAQ
[10] Simundic´AM. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. Biochem Med. 2009. PMC4975285
[11] Kuznetsova AA, et al. Thermostable reverse transcriptase for RT-PCR. Biomolecules. 2025. DOI 10.3390/biom15111507
[12] Lee SJ, et al. Direct and hot-start PCR with Taq. IJMS. 2023. DOI 10.3390/ijms241411405