

绝对定量的多聚酶链式反应技术的发展现状及其生物医学应用

曹雷, 许夏瑜, 高彬, 李世超, 文婷, 李莹辉, 卢天健 and 徐峰

Citation: [中国科学: 生命科学](#) **46**, 809 (2016); doi: 10.1360/N052015-00332

View online: <http://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052015-00332>

View Table of Contents: <http://engine.scichina.com/publisher/scp/journal/SSV/46/7>

Published by the [《中国科学》杂志社](#)

Articles you may be interested in

[用多聚酶链式反应快速检测转化细胞中外源人凝血因子重IX cDNA](#)
科学通报 **35**, 625 (1990);

[聚合酶链式反应\(PCR\)用于地中海贫血的产前诊断](#)
科学通报 **33**, 1439 (1988);

[原位聚合技术制备纳米复合聚烯烃材料研究的现状与趋势](#)
科学通报 **53**, 2710 (2008);

[多聚酶链式反应应用于带入IX因子cDNA的转基因小鼠的初筛](#)
科学通报 **39**, 461 (1994);

[应用RAPD分析1个抗条锈病的小麦-黑麦易位系](#)
科学通报 **39**, 2088 (1994);

评述

绝对定量的多聚酶链式反应技术的发展现状及其 生物医学应用

曹雷^{①②}, 许夏瑜^{①②}, 高彬^{①②③}, 李世超^{①②}, 文婷^④, 李莹辉^⑤, 卢天健^②, 徐峰^{①②*}

① 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物信息工程教育部重点实验室, 西安 710049;

② 西安交通大学仿生工程与生物力学中心, 西安 710049;

③ 第四军医大学第一附属医院内分泌代谢科, 西安 710032;

④ 西安点滴生物科技有限公司, 西安 710049;

⑤ 中国航天员科研训练中心, 航天医学基础与应用国家重点实验室, 北京 100094

* 联系人, E-mail: fengxu@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-03-01; 接受日期: 2016-03-10

国家自然科学基金(批准号: 11372243, 11120101002)、中国国际科技合作项目(批准号: 2013DFG02930)、国家重大仪器专项(批准号: 2013YQ190467)、中组部青年海外高层次人才引进计划和教育部新世纪优秀人才支持计划(批准号: NCET-12-0437)资助

摘要 自1985年Mullis发明了体外多聚酶链反应(PCR)至今, PCR已经发展到第三代技术, 即绝对定量的数字化PCR. PCR技术自问世以来, 在遗传病、病原体、癌基因等分子诊断领域和法医鉴定等方面发挥了巨大作用. 本文简要介绍了PCR技术的发展历程, 综述和讨论了绝对定量的数字化PCR的技术路线和应用进展, 总结提出了其进一步发展面临的问题, 并展望了数字PCR技术在生物医学方面的发展前景.

关键词 绝对定量, 多聚酶链式反应, 微孔, 油包水, 微流体

脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)通过对执行生命体生长与运作的遗传指令进行编码来传递生命信息, 它与遗传疾病的传递、恶化以及临床诊断息息相关. 然而从临床样品中提取的靶DNA含量极少(小于千分之一), 所以, 单个或少数几个DNA分子在若干数量级上的扩增放大对于临床检测的准确性和特异性非常重要. 例如, 不同疾病的病原DNA片段(如艾滋病^[1,2]、胎儿染色体非整倍体^[3,4]、肺癌^[5]、环境细菌^[6]等)可以在疾病早期通过核酸扩增被筛选

出来. 因此, 通过扩增靶目标的DNA模板并准确定量分析, 对很多疾病的早期检测、早期诊断和治疗具有重要意义.

Khorana在1971年第一次提出了利用多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)进行DNA体外扩增的理念. 而Mullis在1983年设计了这一过程并于1985实际应用到实验研究中. 由于该反应过程是非定量的, 所以最初样品的DNA浓度无法通过扩增后的分子量推测^[7]. 第一代PCR(即终点法PCR)在

引用格式: 曹雷, 许夏瑜, 高彬, 等. 绝对定量的多聚酶链式反应技术的发展现状及其生物医学应用. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 809-826
Cao L, Xu X Y, Gao B, et al. Advances in absolute quantitative PCR and biomedical applications. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 809-826, doi: 10.1360/N052015-00332

进行扩增后只能获得半定量的结果. 随着生物分子荧光技术的发展, 1992 年, 实时定量 PCR(RT-PCR) 即基于荧光探针或染料的第二代 PCR 技术应运而生. 该技术随后逐渐发展为检测目标片段的主流分子生物学技术. 在实时定量 PCR 过程中, 荧光信号随着扩增产物的积累而增强. 实时荧光定量 PCR 能够实时获得模板扩增的荧光值, 然后根据 DNA 模板在指

数增长时期的 C_t 值与标准 DNA 的 C_t 值比较来计算初始模板的浓度. 但是这种方法由于是大体积反应系统, 非特异性的扩增增加了假阳性结果和背景信号, 因此, 最终无法获得绝对定量的结果(“绝对定量”指的是目标分子的数量). 如今, PCR 技术为了达到绝对量化已经发展到了第三代, 即数字 PCR (digital PCR)(图 1)^[8], 相比较于第一代和第二代 PCR

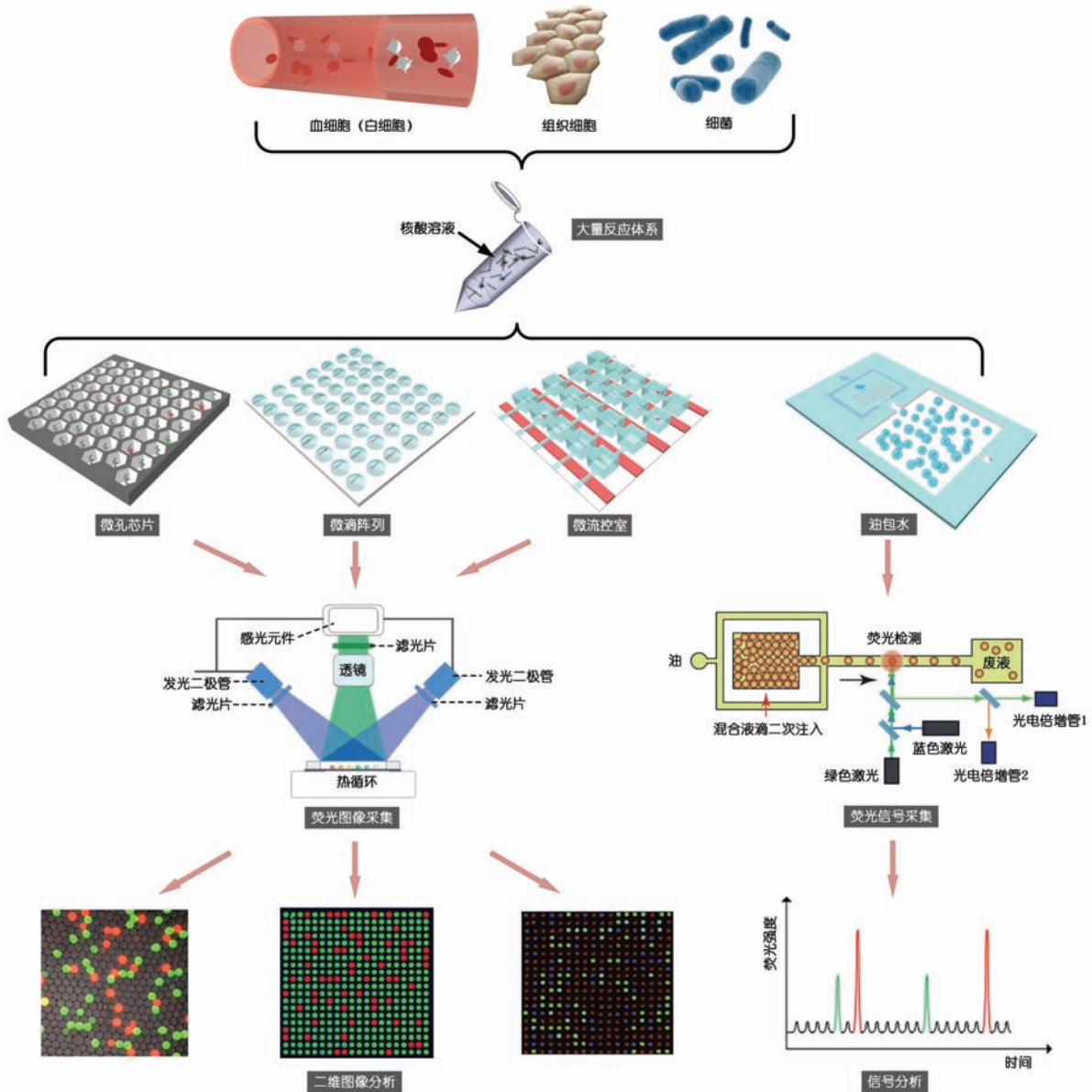


图 1 数字 PCR 的 4 种常见技术路线及其检测原理(网络版彩图)

提取自白细胞、组织细胞或细菌的 DNA 样品经过稀释后主要有 4 种方式将其分散为单分子的体系: 基于微孔芯片的方法; 基于打印的微滴阵列的方法; 基于微流控室分割的方法; 基于油包水微液滴的方法. 其中油包水的方法适用的检测方式是光电倍增管(photomultiplier, PMT)检测, 其他 3 种方法的检测方式均基于电荷耦合器(charge coupled device, CCD)拍照检测

技术, 微量的样品就足以获得可靠的检测结果. 其中的“数字”被解释为单一实体中信号的开关(如开或关, 凝固的或非凝固的, 激活的或非激活的, 荧光的或非荧光的, 有差别的和无差别的)^[9]. 数字 PCR 是在有限稀释条件下将单个待检测的 DNA 模板分散于单个重复的反应体系中, 每个反应体系中有一个 DNA 模板没有 DNA 模板(统计上), 这样极大减少了扩增后 DNA 模板检测的背景荧光^[10]. 数字 PCR 具有显著提升检测通量, 极大提高检测精确性, 提升检测浓度下限的优势.

在数字 PCR 中, DNA 模板扩增前被稀释到一定的浓度, 在此浓度下, 包含单个 DNA 模板的微体系通过扩增被荧光探针检测到并产生某种颜色荧光的特定信号, 而不包含单个 DNA 模板的微反应体系则不能产生荧光信号. 因此, 通过计算产生阳性信号的反应体系数量就能提供一个准确的数字化结果. 通过此方法, 样品中的初始目标 DNA 模板就能够被绝对定量, 这样极大降低了 PCR 产生的扩增偏倚(即非特异性的扩增)^[11]. 随着 PCR 相关技术的飞速发展, 现在可以利用微纳技术实现数字 PCR 实验的特殊需求. 然而由于该技术尚处于发展阶段, 存在技术缺陷导致的假阳性、昂贵的实验成本、复杂的实验过程、临床研究缺乏等亟待解决的挑战. 所以对这一新兴领域做一个全面的概述是非常必要的.

近期, 越来越多的人开始关注数字 PCR, 科学引文索引收录的相关文章的数量也在飞速增长. 该领域综述性文章主要涉及数字 PCR 发展史^[12-17]以及相关应用^[18,19], 极少涉及该领域技术路线的分类和对比, 以及不同技术路线催生的产品和应用范围. 毋庸置疑, 作为一种绝对定量的分子生物学研究工具, 数字 PCR 将在 DNA 的定量检测中承担越来越重要的角色. 本文首先按照不同样品分散方法对数字 PCR 的技术路线做了清晰的划分, 同时介绍了不同技术路线中的新兴技术, 最后展示了目前数字 PCR 的相关应用. 其中, 本文尤其对数字 PCR 的关键技术路线及其发展水平进行了介绍, 包括样品的分散, 信号放大(即多聚酶链式反应), 荧光图像的获取和处理, 并进一步概述了新兴的可与数字 PCR 整合的微纳技术. 希望本综述将有助于相关研究人员更好地了解数字 PCR 并将其深入应用到生物医学研究领域.

1 样本的分散

核酸样品的分散是数字 PCR 中的第一步, 也是最核心的技术步骤. 早期应用于数字 PCR 的样品分散方法基于 96 或 384 孔, 且步骤较为繁琐^[8]. 发展至今, 数字 PCR 的微反应体系已经减小至纳升(nL)或皮升(pL)级别. 理想情况下, DNA 模板应完全分散在独立反应体系内(如微反应室、微孔、微滴), 即在开始扩增前, 每个微反应体系中的 DNA 模板分布应遵循统计规律, 每个微体系中只有单个或没有 DNA 模板. 包含目标 DNA 模板的微体系会在若干 PCR 循环之后显示出目标荧光信号, 系统自动判读为 1; 不含目标 DNA 模板的微体系因只显背景荧光信号则判读为 0. PCR 扩增后, 通过计算 1 所占百分比就能够推算出初始目标核酸浓度. 但在实际操作中, 通常每反应单元中可能包含两个或两个以上的目标分子^[20], 就需要使用泊松概率分布函数(poisson distribution)进行计算^[16], 以排除这些异常单元对定量检测的影响. 每个反应单元中包含 n 个分子的概率可以通过 $f(n, \lambda) = (e^{-\lambda} \lambda^n) / n!$ 计算获得. 其中 n 表示每个反应单元中的分子数量, λ 表示芯片上的分子总数与反应单元之间的比例(即扩增前每个反应单元中包含分子数量的平均值)^[21]. 现今, 数字 PCR 的几种主流核酸样品分散技术主要包括基于微孔板, 油包水微液滴, 微流体芯片等, 且已开发出相应的产品并应用于实践中.

DNA 模板的分散过程涉及一些重要的参数, 包括微体系尺寸、体积(每个微滴)、微滴通量(每个芯片)及微滴的质量(表 1). 一些影响因素会影响到这些参数的准确性. (i) 对于微体系尺寸, 较大的反应体系也许会包含一个以上的 DNA 模板导致读取信号荧光结果错误, 然而, 过小的体积对加工工艺要求苛刻, 同时将增加微体系的总数量, 技术上难以实现; (ii) 对于每个微滴来说, 由于微滴具有有限的体积, 一些基因组的大片段无法被包含进去, 因此, 基因组大片段需要预先被消化成小片段. 但是, 消化步骤会限制数字 PCR 的应用方向, 并且会影响检测结果的准确性; (iii) 至于每次试验中产生的微滴通量, 当然在大部分情况下是越高越好, 在许多特定片段的检测中, 目标片段的含量通常很低, 而且背景值又很强, 这无疑会大大影响接下来的分析过程; (iv) 对于微反应体系来说, 微滴的质量指的是微反应体系的稳定性, 它取决于每种技术路线本身的特点. 相邻的

表 1 数字 PCR 的 4 种常见样品分散方法的比较

DNA 样品分散方法	分散相关参数				
	单元尺寸(m) ^[11]	单元体积(nL)	单元数量(个)	体系稳定性	分散速度(个/min)
微孔芯片的方法	$10^{-6}\sim 10^{-5}$	0.800~1.000 nL	20000(每个芯片)	***	60000
油包水微液滴的方法	$10^{-5}\sim 10^{-4}$	0.001~1.000 nL	20000~10000000(每组通道)	*	2000
微流控微室的方法	$10^{-5}\sim 10^{-4}$	6.250 nL	14112(每个芯片)	**	10000
基于打印的方法	10^{-4}	0.800 nL	400(每板)	**	100

微体系之间是否是物理阻隔, 是否会出现交叉污染, 是否有溶剂蒸发的风险, 这些特点一并决定微体系的质量. 除此之外, 面对数以万计的微反应体系的数量, 较慢的样品分散速度会直接影响数字 PCR 检测的效率, 阻碍技术自身的发展和运用. 在实际测试中, 动态检测范围也是一项很重要的应用指标, 具有更宽的动态检测范围, 意味着适用于更广泛的应用. 相比传统的实时荧光定量 PCR(动态检测范围为 10^5), 基于微流控微室分割方法的像素数字 PCR(megapixel digital PCR)的动态检测范围能够达到 10^7 ^[22]. 应用最广泛的微液滴数字 PCR(Bio-Rad[®], 美国)的动态检测范围为 $10^4\sim 10^5$ ^[23,24], 与之具有相同单元数量的 20K 数字 PCR 芯片(Thermo Fisher Scientific[®], 美国)的动态检测范围为 10^5 ^[25]. 所以, 对于研究人员来说, 需要合理权衡检测精确度、实验通量, 以及检测系统和测试分析的成本等方面, 选取合适的数字化 PCR 检测平台^[26]. 下面, 主要就数字 PCR 的 4 种常见的技术路线及其检测原理分别进行介绍.

1.1 微孔板

基于微孔板的数字 PCR 原理如下: 首先在硅基或者玻璃上建立密集的微米尺度的微孔阵列(图 2A), 然后采用物理和化学方法进行表面改性, 使用该微孔阵列能够产生数万个纳升级别的微反应体系. PCR 中采用多色荧光标记法, 结合 DNA 探针高度的结合特异性, 进行目标物的快速检测; 同时开发专用的二维图像采集硬件和软件对检测结果进行获取和分析. 阵列微孔中被荧光素标记的探针经过 PCR 反应, 会在一定波长的激发下, 产生特异性荧光反应, 并且产生不同的荧光信号(图 2C). 核酸溶液中分别与目标 DNA 结合的探针所产生的信号便可以显示其自身的特征与浓度^[21]. 微孔板是进行数字 PCR 检测的一种理想备选方案, 它能够将微孔阵列的重复性和稳定性与数字 PCR 的定量化、高敏感度、宽动态范围以

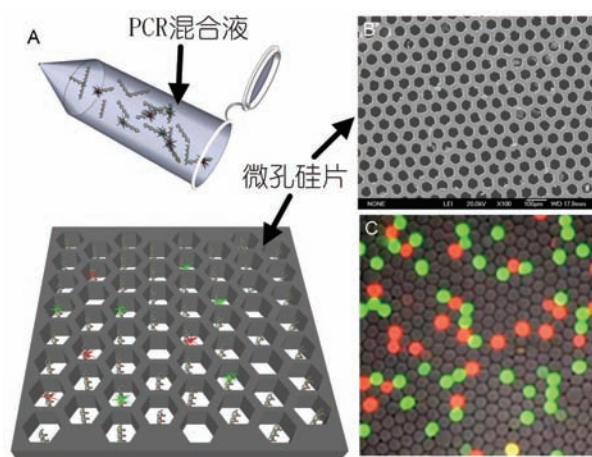


图 2 基于微孔芯片的数字 PCR 检测(网络版彩图)

A: 表面修饰后的微孔硅芯片对核酸溶液的单分子分散; B: 微孔硅芯片(20K[™]芯片)的扫描电子显微镜照片; C: TaqMan 探针检测的照片

及特异性检测的特点相结合.

目前, 微孔板数字 PCR 技术平台(Quant Studio 3D digital PCR system, Thermo Fisher Scientific[®])已成功商业化, 并应用于实际数字 PCR 检测中^[27-29], 采用了双色荧光探针的微孔板数字 PCR 芯片能够同时在一张芯片上检测两种目标物. 图 2B 展示 Thermo Fisher Scientific[®]公司“Quant studio 20K[™]芯片”的扫描电子显微镜照片, 该芯片核心是采用微纳加工技术制造的 1 cm^2 的微孔硅片. 首先采用硅片光刻技术在硅基上加工 20000 个六边形的微孔, 接着进行表面改性, 将疏水的硅基氧化为亲水的二氧化硅, 然后打磨去除其表面的氧化层, 形成具有疏水表面同时兼具亲水微孔内壁的硅芯片. 每张芯片包含 20000 个六边形微孔, 每个微孔中的容量约 0.8~1 nL, 微孔最大直径约 $60\ \mu\text{m}$, 深度约 $330\ \mu\text{m}$, 孔间最小间距约 $20\ \mu\text{m}$, 深宽比达到 5:1, 并且完全贯穿硅芯片. 所以借助孔内壁的亲水性以及通孔毛细管作用, 微孔中的亲水性核酸溶液可以保持停留在孔内部.

如上文所述,微孔硅芯片一般以光刻(或称为纳米压印)方式制造而成,逐渐地被用来检测核酸和蛋白浓度. Dimov 等人^[30]通过标准光刻技术在硅基上制造了微孔阵列(长 20 μm ; 宽 20 μm ; 深 50 μm). 在其制作的超过 60000 个微反应室的芯片上可进行单细胞多重 RNA 计数. Witters 等人^[31]将蛋白质分子连接到一定大小的超顺磁微珠上,通过外加磁力和磁珠的选择湿润性作用,微珠上的目标 DNA 模板能够被拖拽进比微珠尺寸稍大的微孔中,据报道该装置检测浓度的线性动态范围为 10 aM~90 fM,跨越了 4 个数量级,对于不同浓度范围的样本具有良好的兼容性,同时也提高了目标蛋白的检测精确度.

1.2 油包水

油包水微液滴数字 PCR 的原理如图 3 所示:一定浓度的待测 DNA 样品与 PCR 预混液一同加入微流控芯片内的微通道,在流过“T”型混合管道后,核酸溶液会被油包裹形成一定大小的油包水结构,且每一个油包水微滴中只包含一个 DNA 模板或不包含 DNA 模板. 收集油包水微液滴于 PCR 管中,启动 PCR 热循环. 待反应结束后,所有微液滴逐个通过光电倍增管的检测通路^[32],根据荧光强度的泊松分布设定阈值,将产生目标荧光的液滴记作 1,反之则为 0. 最终通过阳性微滴(产生目标荧光的微滴)计数结果计算出初始样品目标 DNA 的浓度. 一般来说,油包水的液滴构型可以借助以下微纳结构实现:丙烯酸聚氨酯(polyurethane acrylate, PUA)、聚甲基丙烯酸

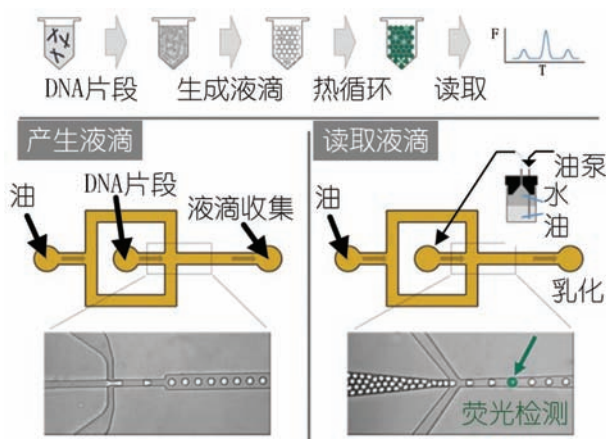


图3 基于油包水微液滴的数字 PCR(网络版彩图)

油包水的方法主要包括两个步骤:借助微流控芯片生成油包水液滴(左);逐一读取液滴的荧光信号(右)

酸甲酯(polydimethyl methacrylate, PMMA)、聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)等材料上加工的 T 型通道,聚二甲基硅氧烷上的剪切-聚焦通道,硅基通道阵列^[33].

基于油包水微液滴技术, Bio-Rad[®]于 2011 和 2013 年分别推出了 QX100[™]和 QX200[™]数字 PCR 系统,并应用于诸多与基因检测相关的应用中^[23,24,34-37]. 在其配套的微滴产生芯片上,20 μL PCR 反应混合液加载到具有 8 个并行通道的微滴生成芯片进样孔;60 μL 含有乳化稳定剂和表面活性剂的矿物油被注入相邻的进油孔,然后将微流体芯片嵌入微滴发生器(DG[™]). 微滴发生器利用真空在出液孔处产生的连续负压,将存于 8 个进样孔中的样品分散为约 20000 个大小均一的微滴^[10]. 通常该技术可产生平均体积为 1 nL 左右的油包水微液滴. 最近, Rain Dance[®]公司(美国)正式推出了名为 Rain Drop[™]的数字 PCR 系统,该系统对油包水微液滴技术进行了很大的改进:不但提升了微液滴生成芯片微通道的数量,而且减小了通道尺寸,每次能够以大约 5 pL/每微滴的体积制造最多 100000 个微液滴^[16,25].

一种结合了油包水微液滴结构和磁珠的数字 PCR 技术,也被称为 BEAMing(beads, emulsion, amplification, and magnetics)^[38],用于检测样本中目标核酸片段的含量,从而量化遗传变异的程度. 采用该方法产生的反应单元(微磁珠液滴)能够通过流式细胞仪进行筛选,并应用于进一步研究^[39].

1.3 微流控

微流控技术因其集成化、高通量、便携、样品量需求少等优点已逐渐应用于分子生物学的诸多研究中. 现在,通过微流控技术与数字 PCR 技术相结合产生了一种名为“微流体阀”的微流控芯片结构,它在外观上与集成电路中的晶体管的排列很相似^[22,40,41],因此也被称作集成流路芯片(integrated fluid circuit, IFC). 集成流路芯片的制造加工能够借助多层软光刻技术实现^[11]. 微流控数字 PCR 的原理如下:PCR 预混液首先与稀释后的 DNA 样品混合,一并通入 PDMS 通道中,样品通道由成千上万个微纳加工获得的小室串联而成. 一定量核酸溶液在流动过程中逐渐填满这些小室, DNA 模板也均匀地分散到这些单元内,最终形成包含单分子核酸的 PCR 反应阵列. 小室之间通过“微流体阀”分隔,除了反应

层, 另外一层具有相同通道数量的 PDMS 膜采用“压力阻断”的方式分割与之垂直的反应层通道, 最终形成互相之间完全独立的微反应室. 微量 PCR 反应就在众多互相独立的小室中进行. Tian 等人^[40]设计并且制作了多层 PCR 芯片, 包含 DNA 纯化和数字 PCR 检测功能. 他们借助磁珠和外加磁场完成了模板链的冲洗和洗脱步骤. 为解决 PDMS 膜的透气性造成的样品蒸发, 他们增加了一层注满水的 PDMS 层, 以此来保持 PCR 反应层的湿润度, 减少溶剂的蒸发.

Fluidigm[®]公司(美国)已经通过微流控芯片平台(BioMark™ HD system)在数字 PCR 检测领域获得了重大的成果^[22,42-46], 其研发的微流控芯片名为“集成流路芯片”(IFCs). 每个微流控芯片借助微流控阀门将注入的 PCR 混合液随机分散到 1176 个互相独立, 容量为 6.25 nL 的反应室内^[42]. 当气体或液体被注入到控制通道网络(油通道)中时, 油通道和 DNA 溶液通道之间的 PDMS 膜向上弯折, 便形成了微流控阀. 当阀门闭合时, 连续的 DNA 溶液通道被分割为独立的 PCR 反应小室(图 4). 使用该芯片, 研究人员检测了 3 种与肺癌相关的基因丰度, 研究结果显示出了微流控芯片用于单核酸分子扩增与检测的可行性和灵活性^[48]. 一种集成了细胞捕获、细胞裂解、反转录和数字 PCR 检测的微流控数字 PCR 芯片也被用于单细胞分析^[49], 与 IFCs 的不同之处在于, 它采用流动的油相产生独立的反应区室, 而不依赖于“微流体阀”结构.

另外, Shen 等人^[50]设计制作的名为“滑动芯片”(slip chip)的数字 PCR 芯片, 现在已经被用于准确测定 PCR 扩增的 DNA 模板数量. 该芯片工作时, 微升级的核酸样品能够被分散到 1280 个微液滴内, 每个微液滴的体积为 2.6 nL. 而且, 该数字 PCR 芯片还实现了单拷贝模板的检测精度. 之后, 研究人员设计出一种以“滑动芯片”(slip chip)为实验平台, 并且结合了数学理论微流控芯片装置, 称为多体积数字 PCR(multivolume digital PCR, MV digital PCR)装置^[51]. 相比每个微反应腔具有固定体积的数字 PCR 技术, 多体积数字 PCR 的优势在于, 既保持了较好的线性检测范围(最大可达 10^6)和高的检测精度, 又使数字化的单分子 PCR 检测所需要的微反应腔的数量维持在最小值. 多体积数字 PCR 装置不仅能够满

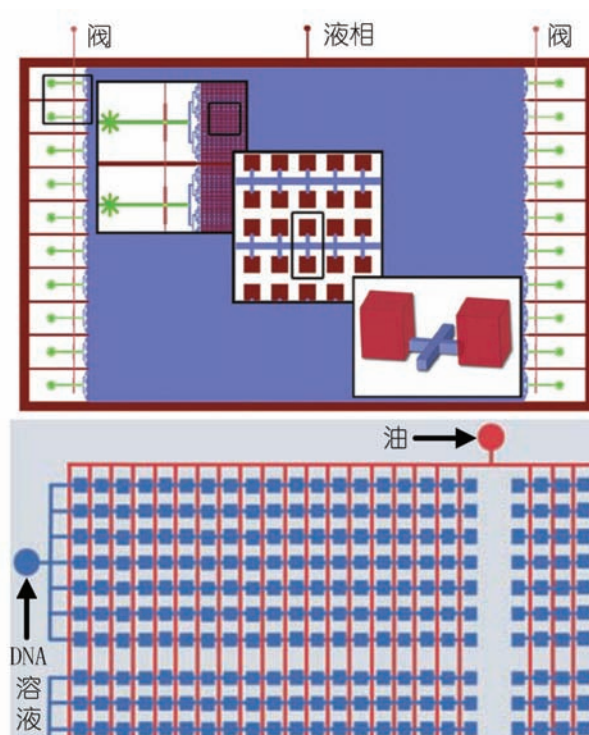


图 4 基于微流控的数字 PCR^[22,42,47](网络版彩图)

微流体数字 PCR 芯片由两层 PDMS 通道层构成: PCR 反应层(DNA 溶液, 包含 PCR mix)和压力微阀控制层(油)

足临床样本中 HIV 病毒载量(血浆中, 从 <500 个分子/mL 到 >1000000 个分子/mL)的即时检测需求, 而且能够进行多体积数字 RT-PCR(MV digital RT-PCR), 确定 RNA 分子的含量^[1]. 多体积数字 PCR 简化了数字 PCR 的操作, 节约了检测空间, 而且能够实现不同区域上(同一张芯片)、不同样品的多重目标物检测. 除此之外, Tian 等人^[52]报道了一种负压驱动的数字 PCR 芯片, 它的主要材料也是聚二甲基硅氧烷(PDMS), 该芯片具有 650 个微反应腔, 每一个腔的容积大约为 6.28 nL. 但是, PDMS 芯片中的溶剂依然有可能在 PCR 反应过程中蒸发.

基于微流控的数字 PCR 在精确度和重复性上优于其他数字 PCR 技术路线, 但要在微流控芯片上实现多重目标物的高通量 PCR 检测, 仍是十分复杂的步骤. 此外, PDMS 薄膜作为微流控数字 PCR 芯片的主要材料, 本身的透气性会影响到 PCR 反应体系的密封性, 从而使芯片的设计变得更加复杂. 微流控技术昂贵的成本也在一定程度上限制了数字 PCR 的发展.

1.4 生物打印

随着喷墨打印技术的发展,生物打印单元的精确度和打印效率已经有了长足发展,目前已经应用于某些特定的研究领域^[53-56],如 3D 细胞打印^[57-61].在数字 PCR 领域,生物打印技术具有的灵活性和潜在高通量特点,使其具有很大的竞争优势.生物打印与数字 PCR 的结合能够诞生一款适合不同实验需求的定制化仪器.应用于数字 PCR 的生物打印技术一般具有以下几个步骤:(i) 打印若干体积均一的微油滴到特定表面,形成油滴阵列;(ii) 将包含 PCR 预混液和核酸样品的微液滴加入到每一个油滴内;(iii) 启动 PCR 热循环反应;(iv) 待反应结束,进行荧光图像的获取和分析.受到生物打印技术的启发,Sun 等人^[62]设计了一种方法,即在疏水疏油表面上打印上百个液滴来进行 qPCR 检测(图 5).每个液滴的体积能够达到 800 pL,而且每个液滴被硅油包裹起来,避免了在热循环中样品的蒸发和交叉污染.

2005 年,虚拟反应室(virtual reaction chamber, VRC)(图 6)的概念第一次应用在 PCR 芯片上.每个 PCR 样品液滴都被一滴矿物油所包裹^[63].其本质也是采用基于打印 PCR 液滴到油滴内的方法进行实时荧光定量 PCR 检测.Neužil 等人^[64]进一步优化了该方案,他们将用于显微镜观察的玻璃盖玻片放置在硅芯片上方,以此消除核酸样品之间的交叉污染.为了实现虚拟反应室的便携式检测,Novak 等人^[65]和

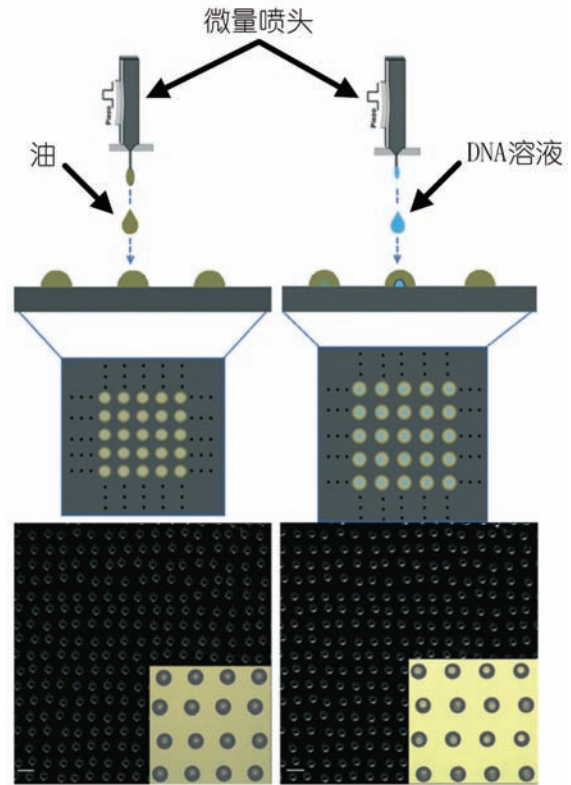


图 5 基于生物打印的数字 PCR 检测(网络版彩图)

打印出的每个液滴的体积大约为 0.8 nL,数量为 400(20×20)个

Neužil 等人^[66]为该系统加入了基于 TaqMan 探针的检测光路和一块用于显示 real-time PCR 反应参数(包

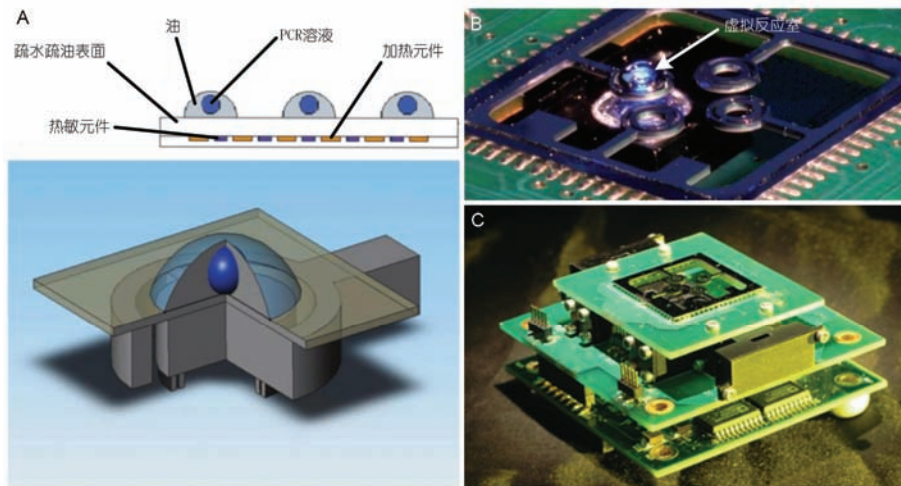


图 6 虚拟反应室(VRC)PCR(网络版彩图)

A: 虚拟反应室结构示意图; B: 检测通量为 4 个样品 VRC 检测装置(其中包含一个标准品,用于参考荧光值); C: 集成在 PCB(印刷电路板)上的便携式 VRC 检测装置

括温度循环参数和荧光强度)的 LCD 显示屏, 虽然功能完备, 但是它的体积却和一部手机一样. 这种便携式的检测设备能够在一些医疗水平较低的地区发挥它即时核酸检测的功能, 以此达到预防和控制公共传染性疾病, 如 H5N1 禽流感病毒的检测^[67].

生物打印技术在适用性, 检测通量和成本方面具有很大优势, 同时得益于喷墨打印技术的不断发展, DNA 打印技术必将在数字 PCR 领域占据一席之地.

1.5 其他方式

目前, 除了上述 4 种主要的核酸样品分散方式, 还有其他一些样品分散方法也应用于研究中. MDH (multiplexed digital-PCR coupled with hydrogel bead-array)即“水凝胶微珠阵列-多重数字 PCR”采用了水凝胶微珠乳化产生微液滴的方法. 该方法可以通过形成的微珠阵列进行多重目标物的检测(图 7)^[68].

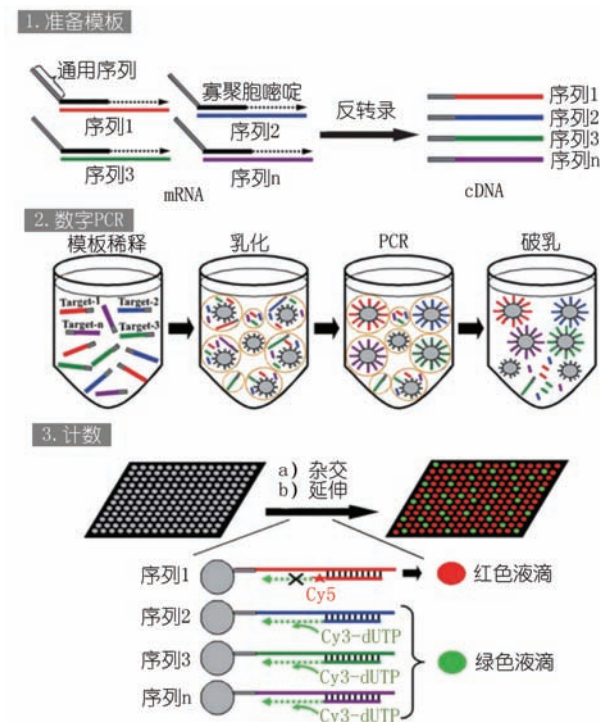


图 7 基于水凝胶微珠阵列的多重数字 PCR^[68] (网络版彩图)

MDHB 主要包括 3 个步骤: 1. 准备模板. 采用通用序列标记的引物进行反转录; 2. 数字 PCR. 基于微乳液的单分子扩增; 3. 计数. 通过水凝胶微珠阵列进行计数, 序列 1 为管家基因, 作为定量参考, 其他序列为结肠直肠癌相关基因

MDHB 的检测极限能够达到 0.1%(即从 1000 个 DNA 分子的背景中检测出一个目标 DNA 模板), 而且, 在以 β -actin 基因作为检测目标物时, 检测灵敏度能够达到 100 个细胞以下.

琼脂糖微珠阵列方法能够将液态的微液滴转变为固态的琼脂糖微珠, 这样, 防止了核酸微滴之间的交叉污染. 该方法使微液滴的操纵和保存变得更加简单(图 8)^[69,70]. PCR 预混液通过微流体芯片上的通道时, 被流动的油相分散为微小的液滴, 琼脂糖凝胶则均匀地包裹在其表面. 通过该方法所得的微滴尺寸大约为 80~100 μm . 包含目标物的琼脂糖微珠会在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下凝固, 可以直接用于荧光显微镜观察. 琼脂糖微珠比流体微滴系统更容易操作, 对于开发分子生物技术相关的下游应用, 如克隆和测序来说, 具有很大优势.

2 定量检测

定量检测过程包括了荧光图像的获取, 处理及数据分析. 为了准确检测目标 DNA 模板的浓度, 就必须精确获取荧光分析结果. 而理想的图像处理系

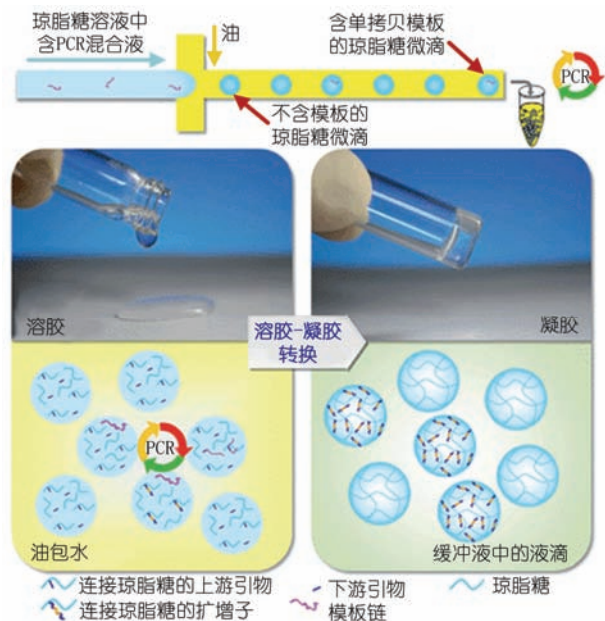


图 8 琼脂糖微珠单拷贝核酸分析方法^[69](网络版彩图)

PCR 溶液通过微流体芯片通道, 被油相分散为微小的液滴, 液滴表面均匀包裹着琼脂糖凝胶. “溶胶-凝胶转换机制”能够防止 PCR 时样品微滴之间的交叉污染, 也使微液滴的操纵和保存更加方便

统必须具备高分辨率、快速检测、假阳性筛选以及高普适性等优点. 在定量检测中, 荧光探针或 DNA 染料被用在数字 PCR 中以检测扩增产物. 通常释放的荧光可以直接被 PMT 或 CCD 测量. 尽管双链嵌合荧光染色(SYBR Green)应用范围极广, 但是该染料在使用过程中缺乏针对序列的特异性, 而荧光探针(如 TaqMan 荧光探针)却恰恰具备这种特性. 采用了荧光探针的 PCR 产物, 甚至是引物二聚体都可以显示出荧光^[49].

目前, 一系列策略已被用于提升数字 PCR 的分辨率和荧光成像质量(图9). 针对微孔数字 PCR 芯片, Dimov 等人^[30]将微孔阵列置于自动滑行扫描系统(Zeiss Axio Imager DIC/荧光显微镜, 德国)中以获得全阵列成像. 曝光区域覆盖了 CCD(帕尔贴冷却, 索尼 ICX285 传感器, 日本)70%的动态范围. 与 Dimov 的做法相似, Zhang 等人^[70]使用倒置荧光显微镜

(Nikon Eclipse Ti-U, 日本)对微孔阵列在 100 倍放大率下曝光了 3 s 实现了全阵列成像. 不同于使用商业化荧光显微镜成像方式, Zhong 等人^[72]自行研发了一种荧光显微镜, 该显微镜具有功率为 20 mW, 488 nm 波长激发光的光源(Cyan; Picarro, 美国), 光源放大两倍后通过物镜聚焦于微流体通道上. 该显微镜使用双通滤波器通过物镜收集荧光(512/25 nm 以及 543/22 nm 分别对应于 FAM 和 VIC 荧光素). 在收集荧光中采用了两个光电倍增管(H5784-20)在 200 kHz 的采样频率下采样, 然后荧光被 USB-625 数据采集卡特征性地记录下来. 同时, 在 850 nm LED 背面光照明的条件下所有的微滴通过同一物镜成像. 此外, 该技术采用了短波滤光片来分离光路中的杂光, 并且由 CCD 相机(Guppy, 德国)拍照. 与 Zhong 等人开发的荧光显微镜不同, Zhu 等人^[47]通过 Maestro Ex IN-VIVO 成像系统(CRI Maestro, 美国)对 PCR 扩增

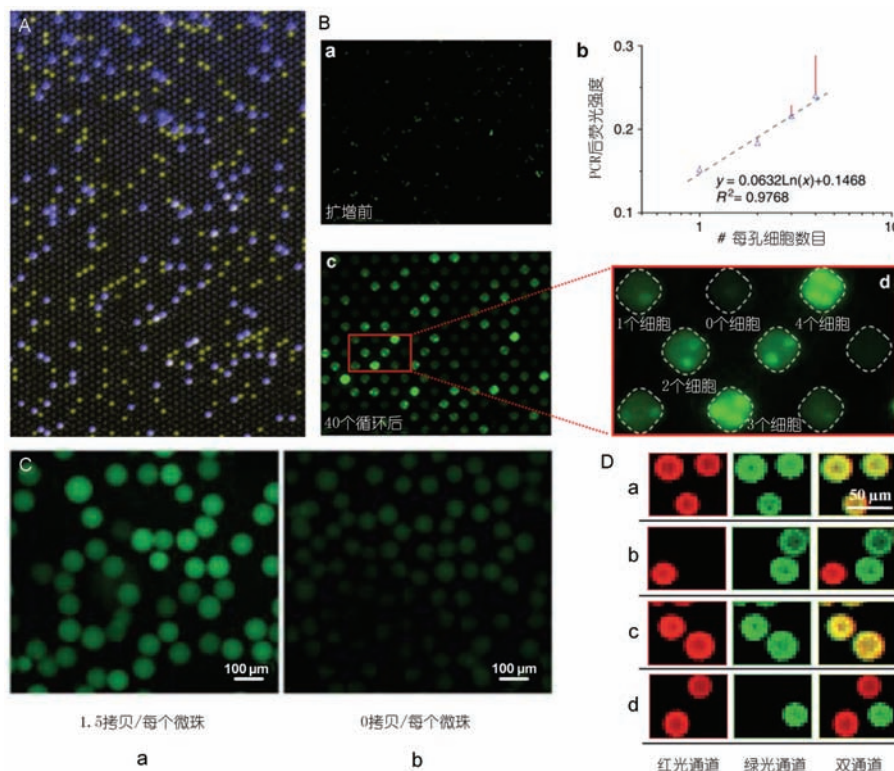


图9 不同数字 PCR 荧光检测的定量结果(网络版彩图)

A: 通过 CCD 捕捉到的经过扩增的 20K 芯片荧光图像. 图像中的不同颜色的点代表两种荧光染料(FAM 和 VIC), 分别对应不同的模板链^[71]; B: 20 pL 微孔 PCR 芯片在扩增前和扩增了 40 个循环之后的终点荧光图像^[30]. 对 Nanog 基因的启动子区域进行扩增之后, 微孔在 40 个循环时的亮度和每个微孔中的细胞数目呈现明显的对数线性关系, 表明微孔的亮度可以作为目标 DNA 初始含量的半定量指示参数; C: 模板浓度为 1.5 个拷贝(左)和 0 个拷贝(右)的琼脂糖微珠经过扩增后的显微荧光图像^[69]; D: 凝胶微滴 PCR(emPCR)中经过扩增后的微珠在 3 种不同的扫描通道(VIC 通道, FAM 通道, 双通道)下的特征荧光图像^[68]

后的芯片进行成像, 荧光图像由广域 CCD 系统获得, 而且图像可以使用荧光显微镜(OLYMPUS, 日本)来放大和观察. 目标荧光在激发光波长为 455 nm 时被激发, 所释放的荧光通过中心吸收波长为 455 nm 的长波长滤光片被 CCD 所接收. 除了上述方法外, Colle 等人^[73]开发了一种无需物镜的芯片成像技术. 该系统由一个电池、一个 LED 灯、一个光子芯片以及一个 CMOS 成像芯片构成. 光子芯片以及 CMOS 成像芯片之间的间隙设计非常小(大约 1 μm), 所以当检测或取样时, 倏逝波对于检测或者利用纳米光栅物镜采样法获得的衍射图像影响微乎其微. 这种无需目镜的芯片成像技术分辨率能够达到 25 μm , 能够满足微阵列和微孔数字 PCR 的荧光图像检测精度, 而且该系统组成简单, 便于集成. 因此, 将这种无物镜检测方式应用在数字 PCR 的成像中会极具潜力.

目前, 对于获取的荧光图像分析使用最广泛的图像软件包括 imageJ, Matlab^[4,30,47], LabView^[71]和 Mathematica^[2]. Dimov 等人^[30]使用了 ImageJ v4.4(NIH, 美国)和 MatLAB 5.3(Math Works, El Segundo CA, 美国)中的自定义脚本分析获取的图像. 另外, 一款由 Fan 开发的 Matlab 软件减弱了 PCR 扩增之前的芯片背景荧光影响. 而且, 该软件能够从最终成像结果中获得不同荧光通道的荧光值^[4]. Strain 等人^[2]则开发了一款自定义算法软件包, 它可将每个荧光通道区分为阳性、阴性或者模糊不清 3 种情况, 通过计数阳性反应微室的数目算出每一单位体积中模板的拷贝数. 对于以上所有的检测方法来说, 数字 PCR 的大多数微反应体系中会有一个待测 DNA 模板(发出信号光)或者没有待测 DNA 模板(只发出背景光), 然而, 数字 PCR 的检测方式属于终点式检测, 一些微反应室在扩增之前就会包含 1 个以上待测 DNA 模板, 数字 PCR 的检测方式无法准确区分出它们(都是野生型 DNA 模板; 都是突变型 DNA 模板; 两种 DNA 模板混合). 此时, 泊松分布(poisson distribution)便可以发挥作用^[7], 来估计这种非正常情况的出现几率. 当实验条件符合数字 PCR 检测时, 可假定单个液滴中加入的模板数量分布遵循泊松分布, 同时也假定阳性微滴遵循二项分布. Zhong 等人^[71]在 LabView 中开发了一种检测阳性反应液滴数量的算法, 该算法适用于固定或手动调节荧光强度阈值的情况.

事实上, 这些图像处理方法之间存在着较大的

差异. 对不同的样品分散方式所对应的不同图像处理方法进行了客观评价(表 2). 不同的图像处理方法之间具有互相补充的优缺点.

3 数字 PCR 的生物医学应用

目前, 数字 PCR 生物临床应用主要在探测核酸稀有突变和临床样品中的核酸定量^[74]. 稀有突变主要指一个独特的稀有 DNA 分子可以在大量 DNA 分子中被检测到^[8]. 目前, 稀有突变通常使用实时定量 PCR 来进行检测, 虽然实时定量 PCR 大大缩减了检测效率, 但是引物或探针也经常会因为结合到非目标物的野生型序列而受到干扰. 随着研究的深入, 已有结果显示有限稀释的方法能减少野生型序列在扩增中产生的比例, 同时也显著提高了检测灵敏度. 所以说, 数字 PCR 具有绝对度量样品中 DNA 模板数量的能力. Morisset 等人^[75]已经使用二重数字 PCR 技术, 不需制定参考曲线就可测得 MON810 转运基因和 Hmaize 内参基因的绝对数量, 而且其核酸的检测灵敏度可以达到 5 个拷贝数. 依照现有数字 PCR 在生物医学中的应用, 根据其发挥作用的不同领域, 主要包括以下几方面(图 10): 病原微生物的检测、拷贝数变异研究、miRNA 表达分析、下一代测序文库定量、单细胞基因表达分析与染色体异常探测. 除此之外, 稀有癌症目标检测和创建精确的参考和标准以及转基因成分的鉴定也是数字 PCR 技术的潜在应用领域.

3.1 病原微生物的检测

数字 PCR 的高通量扩增和荧光分析技术具有的优势使研究者们准确地检测细菌数目和病毒载量成为可能. 采用名为“IC 3D”的高通量扩增微滴系统成功在几分钟内检测出全血中的大肠杆菌(*Escherichia coli*)浓度^[76]. Looft 等人^[77]使用数字 PCR 芯片在不同药物干预下准确测定了猪肠道细菌(*Prevotella*)的数量.

表 2 不同分散方法的检测参数比较^{a)}

样品分散方法/ 检测原理	假阳性概率	便携性	检测速度
微孔/CCD	*	***	****
油包水/PMT	****	**	*
微流控/CCD	***	****	***
生物打印/扫描	**	*	**

a) CCD: 电荷耦合器; PMT: 光电倍增管

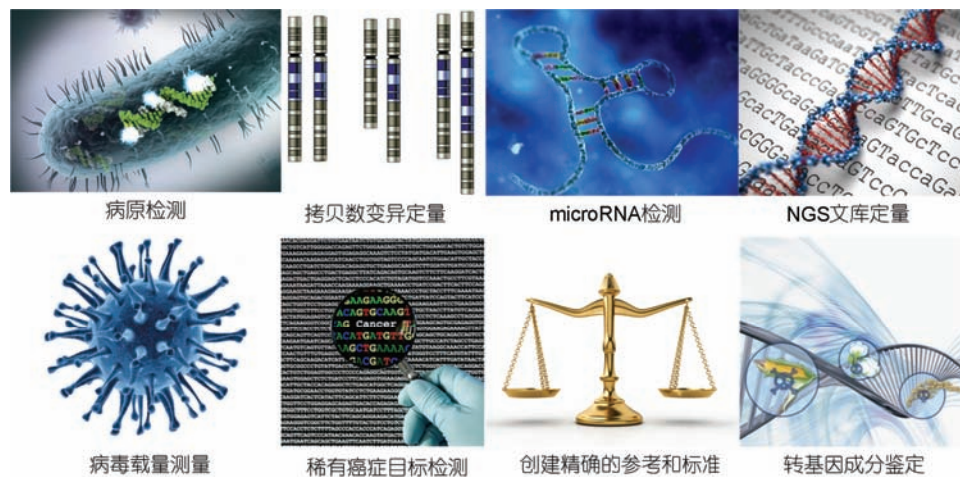


图 10 数字 PCR 在生物医学中的应用(网络版彩图)

数字 PCR 的高敏感性有利于 HIV 含量的测定^[78-80]. Oliveira 等人^[81]对脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中细胞和外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)的 HIV 核酸进行微滴式数字 PCR 检测. HIV 核酸拷贝数的定量以持家基因 RPP30 作为参考标准, 最终得出结论: 脑脊液细胞球中的 HIV DNA 检出率为 64%, 且 53% 的样品含有 HIV RNA. 人巨噬细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是一种疱疹病毒组 DNA 病毒, 能够引起以生殖泌尿系统、中枢神经系统和肝脏疾患为主的各系统感染, 严重的导致死亡. 初步诊断一般采用细胞染色镜检; 病毒核酸的快速诊断则采取 DNA 探针原位杂交方法; 而酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 IgM 抗体和 IgG 抗体, 则适用于病毒早期感染和流行病学调查. 为了准确地检测 HCMV 体内含量, Pavsic 等人^[82]同时使用了两种数字 PCR 平台, 即 QX100™ Droplet Digital™ PCR system (Bio-Rad Laboratories) 和 Biomark™ HD system (Fluidigm®)对样品进行检测. 采用 QX100 系统时, 病毒样品直接扩增检测比从血浆提取 DNA 得到的病毒 DNA 拷贝数高 18%, 比从 PBS 溶液提取 DNA 得到的拷贝数高 35%. 对于 Biomark 系统, 则分别达到了 26% 和 53%.

总的来说, 在病原微生物检测方面, 数字 PCR 排除了目标物浓度过低和样品中抑制剂两方面的干扰, 能够稳定地得到可信度较高的检测结果.

3.2 拷贝数变异研究

拷贝数变异(copy number variation, CNV)是人类遗传变异的重要来源, 并且与大量人类疾病紧密相关. 由于生物体突变存在于大量正常组织, 且一般丰度都很低, 所以在待测样品(组织或血液)中检测体细胞突变具有一定难度. 现有大部分数字 PCR 仪器可以探测到 1~100 个拷贝数的变异范围^[83]. 基于芯片的数字 PCR 已被用于检测生殖细胞中线粒体 DNA 的拷贝数变异^[84]. Stabley 等人^[27]在 Quant studio 3D™ 数字 PCR 系统的帮助下证实了近端脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)的病变严重关系与 SMN2 基因拷贝数呈负相关关系. Tian 等人^[52]利用名为“localized temporary negative pressure assisted microfluidic device”的自制设备测定了角蛋白 19 在肺癌细胞 A549 中的含量, 并发现荧光斑点的数目和稀释因子之间有紧密的联系. 同样是针对肺癌研究, Pender 等人^[85]和 Lin 等人^[86]分别对鼠类肉瘤病毒癌基因(kirsten rat sarcoma viral oncogene, KRAS)和表皮生长因子受体基因(epidermal growth factor receptor, EGFR)的突变拷贝数进行了数字 PCR 定量, 其中对 KRAS 基因突变的检测限达到了 2000:1(即在 2000 个含野生 KRAS 基因的 DNA 分子中检测到 1 个含突变 KRAS 基因的 DNA 模板), 远优于 Sanger 测序(10:1)和下一代测序^[87](50:1). 在重度浆液性卵巢癌研究中, Schwarz 等人^[88]通过数字 PCR 技术定量检测到了 NF1 缺失和 TP53p.R175H 突变在卵巢癌病变组织中的准确数量. 以上研究均是围绕基因或者突变位点

的拷贝数变异检测所开展. 随着同类研究工作越来越多, 说明拷贝数变异研究已成为数字 PCR 的主流应用, 并且研究人员对此类应用的关注度也日益增高.

3.3 miRNA 表达分析

microRNA(miRNA)是一类内生的、长度约为 20~24 个核苷酸的小 RNA 片段, 广泛存在于动植物和某些病毒体内, 其在细胞内具有多种重要调节作用, 主要作用是通过多个 RNA 分子之间的组合来精细调控某个基因的表达^[89,90]. 对于癌症检测来说, miRNA 是极具前途的癌症循环标志物, 在癌症早期诊断和病灶监测方面具有很大应用前景^[91,92]. 然而, 目前仍然缺少 miRNA 表达水平的标准化检测方法. 而基于微液滴的数字 PCR 能够完成核酸的精确量化, 提供目标序列的绝对定量结果, 当然也能够用于 miRNA 的丰度检测. Davide 等人使用 Quant Studio 3D™数字 PCR 系统, 对肺癌病人血浆中 5 种肺癌的 miRNA 标志物(mir-16-5p, mir-21-5p, mir-126-3p, mir-486-5p 和 mir-660-5p)进行定量检测. 为了验证检测结果的正确性, 他们合成了与肺癌病人血浆样本、癌组织和细胞系同源的寡核苷酸序列, 经过梯度稀释后再进行数字 PCR 检测, 然后对比两种检测结果. Li 等人^[5]采用数字 PCR 对肺癌病人和正常人体内的两种肺癌相关的 miRNA 分子进行了检测, 最终得到了目标 miRNA 分子拷贝数和 cDNA 含量之间的线性关系, 且跨越了 7 个数量级. 为了验证 miRNA 介导的昆虫与宿主之间的跨界交流 (cross-kingdom communication), Ling 联合 T-A 克隆, Sanger 测序和微滴数字 PCR 分别在 5 个时间点测定了幼蚕(*Bombyx mori*)的血淋巴中特定 miRNA 片段的含量^[93], 并发现幼蚕体内均检测到了桑树(*Morus alba* L.)中合成的 8 种 miRNA 分子, 其中 miR166b 不仅存在于血淋巴中, 也能在幼蚕的脂肪体内检测到.

3.4 下一代测序文库定量

对于下一代测序技术(next generation sequencing, NGS), 研究人员需要为测序平台选择大小合适的测序文库^[94]. 文库过小会降低序列读取水平, 文库过大会造成大量无用数据, 而对合适大小的文库进行准确的测定能够帮助研究者获得最佳的测序结果. 数字 PCR 不用考虑其他方法(如实时定量 PCR)中不同长度扩增子产生的扩增偏倚, 它获得的是数字化结

果(即 0 或 1). 因此, 数字 PCR 技术为下一代测序技术提供了可靠的参照和绝对参考标准^[95,96]. White 等人^[95]在数字 PCR 协助下准确量化了 454 和 Solexa 测序文库, 首次在 454 测序平台上完成了皮克级样品的测序. 通过数字 PCR, 测序需要的样品量减少至几十或几百皮克, 而且不需进行测序前的预扩增步骤. 同时, 这种方法又消除了标准曲线(出自 qPCR)造成的复制偏差. 与此不同, Eastburn 实现了一种被称为“MESA(microfluidic droplet enrichment for sequence analysis), 用于序列分析的微流控液滴富集”的目标模板富集技术. 当采用 MESA 方法时, 来自 5 个不同基因座的 250 kb 大小的目标基因组 DNA 片段被富集了大约 31.6 倍^[97]. MESA 首先分离出基因组 DNA 片段, 并且进行基于 TaqMan 探针检测的液滴 PCR 反应, 以此鉴别该片段是否包含目标序列, 而且其中阳性微滴在介电电泳的作用下能够被回收, 再通过酶促反应去除扩增子, 获得的样品用于进一步测序. 该方法能够在目的基因座内进行更加全面的基因多态性分析, 适用于诸多遗传变异相关的研究和诊断方面的应用.

3.5 单细胞基因表达分析

单细胞基因表达分析有助于深层次研究细胞发育的机理. 通常对单细胞进行下游的检测分析时, 往往需要对单细胞基因组进行预扩增, 以增加目标 DNA 模板的数量. 然而, 随着预扩增循环数的增加, 会导致扩增偏倚, 一部分基因会对其他基因造成损害. 而数字 PCR 能够在较低目标物水平下产生更准确的定量结果, 因此, 不需要大量预扩增循环数. 为了研究大范围, 并行的单细胞转录组, 研究者将单细胞和修饰有条码引物的微珠一同包裹在纳升级别的油包水微滴中, PCR 检测结果表明具有不同分子标记的细胞显示出差异的转录信号^[98,99]. Swennenhuis 等人^[100]制作了一种可以自动分散单细胞的芯片, 该芯片由 6400 个微孔构成, 每个微孔底部有一个大约 5 μm 的小洞, 一旦有单个细胞停留在这个小洞上, 就会阻止其他细胞流进该微孔, 进而进入其他微孔. 通过该方法, 能够在微孔中快速高效地形成大量单细胞, 对每个细胞的转录组进行分析.

哺乳动物 DNA CpG 岛上的二核苷酸甲基化^[101]是一种很常见的基因修饰, 在基因的表现遗传调控^[102]、基因组印记^[103]、转座子下调^[104]和 X 染色体

失活等方面扮演了重要角色. 单细胞限制甲基化分析 (single-cell restriction analysis of methylation, SCRAM)就是对单细胞进行多重位点甲基化水平的分析. SCRAM 主要包括以下步骤: 单细胞的分离和裂解; 采用甲基化敏感的限制性内切酶对基因组 DNA 消化; 针对多重位点进行两轮 PCR 扩增, 并以此判定目标位点的甲基化水平高低^[46]. Brouzes 等人^[105]和 Mazutis 等人^[106]基于液滴微流控技术, 能够在 2~6 h 内筛选多达 100 万个杂交瘤单细胞. 由于单个细胞被限制在微液滴中, 所以最终检测到的目标物必定来源于该细胞, 这样的分区方法克服了传统流式细胞术和荧光激活细胞分选的局限性. 除此之外, 基于数字 PCR 的单细胞基因表达分析还有望应用在循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)的筛选和检测中^[107]. Weaver 等人^[108]总结了目前用来高通量地产生单细胞的微纳技术, 为数字 PCR 更广泛地应用于单细胞基因表达分析打下了基础. 单细胞基因的表达分析与数字 PCR 技术的结合必定成为定量 PCR 发展史上里程碑式的事件.

3.6 染色体异常探测

染色体异常就是指染色体 DNA 的一部分缺失, 增加或不规则变化^[109]. 而染色体突变在严格意义上指一段染色体的变化, 它涉及多个基因^[110]. Stahl 等人^[111]通过微滴式 PCR 阵列在若干个数量级上准确测定了造血干细胞中嵌合体的数量, 而且该结果已被实时定量 PCR 和 STR-PCR(短串联重复 PCR)所证实. 利用微滴发生器的油包水数字 PCR 已经用于确定 DNA 序列变异导致的构象变化, 而不需要进行克隆或者单分子稀释^[112]. 值得关注的是该过程无需进行

繁琐的基因克隆和人为稀释步骤, 大大减少了操作的时间和复杂程度.

4 总结与展望

综上所述, 因为其独一无二的检测精确性, 数字 PCR 在生物医学领域中具有广泛的应用. 然而, 具有高通量、微体系、高灵敏度的数字 PCR 技术在进一步发展中仍受制于一些因素^[113]. 尚需解决以下问题: (i) 如何不借助仪器, 在微孔板或者微流控芯片上进行简单、稳定且高效的液体(液滴)操纵, 以产生单分子的 PCR 体系; (ii) PCR 热循环和液体操纵过程中微体系之间的良好独立性如何实现; (iii) 如何能在不影响数据质量和检测速度的同时做到检测系统小型化; (iv) 借助微体系分割, 数字 PCR 检测到的样品浓度极限能够达到什么数量级.

随着微纳加工、荧光成像、微流控等领域的快速发展, 在高精度、短时间核酸检测需求的推动下, 数字 PCR 领域面临的问题将会被一一解决, 从而实现分子诊断领域的跨越式发展. 数字 PCR 是一项非常有前景的 DNA 定量检测技术, 然而目前依然处于实验研究阶段. 虽然市场上已经存在商品化的数字 PCR 平台, 但这些产品大多价格昂贵且功能集成化程度较低, 同时对于多目标物的检测能力较弱. 这些方面也限制着数字 PCR 技术的应用与普及, 同时也正是该领域的研究者应该去解决的问题. 期待在不久的未来, 整个数字 PCR 检测系统在交叉领域发展的推动下, 可以实现结构的极大简化, 功能的高度集成以及成本的最大削减, 并被应用于生物医学检测的最前沿领域, 最终走进人们的日常生活.

参考文献

- 1 Shen F, Sun B, Kreuz J E, et al. Multiplexed quantification of nucleic acids with large dynamic range using multivolume digital RT-PCR on a rotational slipchip tested with HIV and hepatitis C viral load. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 17705–17712
- 2 Strain M C, Lada S M, Luong T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS One*, 2013, 8: e55943
- 3 Lo Y M, Lun F M, Chan K C, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 13116–13121
- 4 Fan H C, Quake S R. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 2007, 79: 7576–7579
- 5 Li N, Ma J, Guarnera M A, et al. Digital PCR quantification of miRNAs in sputum for diagnosis of lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140: 145–150
- 6 Tadmor A D, Ottesen E A, Leadbetter J R, et al. Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR. *Science*, 2011, 333: 58–62
- 7 Perkel J M. The digital pcr revolution. *Science*, 2014, 344: 212–214

- 8 Vogelstein B, Kinzler K W. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9236–9241
- 9 Witters D, Sun B, Begolo S, et al. Digital biology and chemistry. *Lab Chip*, 2014, 14: 3225–3232
- 10 Hindson C M, Chevillet J R, Briggs H A, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*, 2013, 10: 1003–1005
- 11 Streets A M, Huang Y. Microfluidics for biological measurements with single-molecule resolution. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 69–77
- 12 McCaughan F, Dear P H. Single-molecule genomics. *J Pathol*, 2010, 220: 297–306
- 13 Zhang C, Xing D. Single-molecule DNA amplification and analysis using microfluidics. *Chem Rev*, 2010, 110: 4910–4947
- 14 Li L, Sui Z-W, Wang J, et al. Progress of digital pcr for single DNA quantification. *Prog Biochem Biophys (in Chinese)*, 2012, 39: 1017–1023
- 15 Day E, Dear P H, McCaughan F. Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*, 2013, 59: 101–107
- 16 Huggett J F, Foy C A, Benes V, et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin Chem*, 2013, 59: 892–902
- 17 Barrett A N, Chitty L S. Developing noninvasive diagnosis for single-gene disorders: the role of digital PCR. *Methods Mol Biol*, 2014, 1160: 215–228
- 18 Zimmermann B G, Grill S, Holzgreve W, et al. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat Diagn*, 2008, 28: 1087–1093
- 19 Heazlewood J L, Morisset D, Štebih D, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS One*, 2013, 8: e62583
- 20 Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One*, 2008, 3: e2876
- 21 Mazutis L, Araghi A F, Miller O J, et al. Droplet-based microfluidic systems for high-throughput single DNA molecule isothermal amplification and analysis. *Anal Chem*, 2009, 81: 4813–4821
- 22 Heyries K A, Tropini C, VanInsberghe M, et al. Megapixel digital PCR. *Nat Methods*, 2011, 8: 649–651
- 23 Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 2011, 83: 8604–8610
- 24 Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*, 2012, 84: 1003–1011
- 25 Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nat Methods*, 2012, 9: 541–544
- 26 Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin Biochem*, 2015, 48: 948–956
- 27 Stabley D L, Harris A W, Holbrook J, et al. SMN1 and SMN2 copy numbers in cell lines derived from patients with spinal muscular atrophy as measured by array digital PCR. *Mol Genet Genomic Med*, 2015, 3: 248–257
- 28 Sefrioui D, Sarafan-Vasseur N, Beaussire L, et al. Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. *Dig Liver Dis*, 2015, 47: 884–890
- 29 Morishita S, Takahashi K, Araki M, et al. Melting curve analysis after T allele enrichment (MelcaTle) as a highly sensitive and reliable method for detecting the JAK2v617F mutation. *PLoS One*, 2015, 10: e0122003
- 30 Dimov I K, Lu R, Lee E P, et al. Discriminating cellular heterogeneity using microwell-based RNA cytometry. *Nat Commun*, 2014, 5: 3451
- 31 Witters D, Knez K, Ceyskens F, et al. Digital microfluidics-enabled single-molecule detection by printing and sealing single magnetic beads in femtoliter droplets. *Lab Chip*, 2013, 13: 2047–2054
- 32 Dong L, Meng Y, Sui Z, et al. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Sci Rep*, 2015, 5: 13174
- 33 Teh S Y, Lin R, Hung L H, et al. Droplet microfluidics. *Lab Chip*, 2008, 8: 198–220
- 34 McDermott G P, Do D, Litterst C M, et al. Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Anal Chem*, 2013, 85: 11619–11627
- 35 Jahn M, Vorpahl C, Turkowsky D, et al. Accurate determination of plasmid copy number of flow-sorted cells using droplet digital PCR. *Anal Chem*, 2014, 86: 5969–5976
- 36 Doi H, Uchii K, Takahara T, et al. Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA

- surveys. *PLoS One*, 2015, 10: e0122763
- 37 Lemos D R, Babaeijandaghi F, Low M, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med*, 2015, 21:786–794
- 38 Dressman D, Yan H, Traverso G, et al. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8817–8822
- 39 Chen W W, Balaj L, Liao L M, et al. Beaming and droplet digital PCR analysis of mutant IDH1 mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2: e109
- 40 Tian Q, Yu B, Mu Y, et al. An integrated temporary negative pressure assisted microfluidic chip for DNA isolation and digital PCR detection. *RSC Adv*, 2015, 5: 81889–81896
- 41 Song Q, Gao Y, Zhu Q, et al. A nanoliter self-priming compartmentalization chip for point-of-care digital PCR analysis. *Biomed microdevices*, 2015, 17: 64
- 42 Ottesen E A, Hong J W, Quake S R, et al. Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria. *Science*, 2006, 314: 1464–1467
- 43 Wang J, Lin M, Crenshaw A, et al. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics*, 2009, 10: 561
- 44 Ramakrishnan R, Qin J, Jones R C, et al. Integrated fluidic circuits (IFCs) for digital PCR. *Methods Mol Biol*, 2013, 949: 423–431
- 45 Nixon G, Garson J A, Grant P, et al. Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus. *Anal Chem*, 2014, 86: 4387–4394
- 46 Cheow L F, Quake S R, Burkholder W F, et al. Multiplexed locus-specific analysis of DNA methylation in single cells. *Nat Protoc*, 2015, 10: 619–631
- 47 Blow N. PCR's next frontier. *Nat Methods*, 2007, 4: 869–875
- 48 Zhu Q, Qiu L, Yu B, et al. Digital PCR on an integrated self-priming compartmentalization chip. *Lab Chip*, 2014, 14: 1176–1185
- 49 White A K, Heyries K A, Doolin C, et al. High-throughput microfluidic single-cell digital polymerase chain reaction. *Anal Chem*, 2013, 85: 7182–7190
- 50 Shen F, Du W, Kreutz J E, et al. Digital PCR on a slipchip. *Lab Chip*, 2010, 10: 2666–2672
- 51 Kreutz J E, Munson T, Huynh T, et al. Theoretical design and analysis of multivolume digital assays with wide dynamic range validated experimentally with microfluidic digital PCR. *Anal Chem*, 2011, 83: 8158–8168
- 52 Tian Q C, Song Q, Xu Y N, et al. A localized temporary negative pressure assisted microfluidic device for detecting keratin 19 in A549 lung carcinoma cells with digital PCR. *Anal Methods*, 2015, 7: 2006–2011
- 53 Mironov V, Reis N, Derby B. Review: bioprinting: a beginning. *Tissue Eng*, 2006, 12: 631–634
- 54 Derby B. Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures. *J Mater Chem*, 2008, 18: 5717–5721
- 55 Norotte C, Marga F S, Niklason L E, et al. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials*, 2009, 30: 5910–5917
- 56 Seol Y J, Kang H W, Lee S J, et al. Bioprinting technology and its applications. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 46: 342–348
- 57 Mironov V, Boland T, Trusk T, et al. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 2003, 21: 157–161
- 58 Lutolf M P, Gilbert P M, Blau H M. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*, 2009, 462: 433–441
- 59 Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 773–785
- 60 Billiet T, Gevaert E, De Schryver T, et al. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials*, 2014, 35: 49–62
- 61 Pati F, Jang J, Ha D H, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun*, 2014, 5: 3935
- 62 Rose D. Microfluidic technologies and instrumentation for printing DNA microarrays. *Micro Biochip Technol*, 2000, 19–38
- 63 Zhang C, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 4223–4237
- 64 Neuzil P, Zhang C, Pippner J, et al. Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: e77
- 65 Novak L, Neuzil P, Pippner J, et al. An integrated fluorescence detection system for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip*, 2007, 7: 27–29

- 66 Neuzil P, Novak L, Pipper J, et al. Rapid detection of viral RNA by a pocket-size real-time PCR system. *Lab Chip*, 2010, 10: 2632–2634
- 67 Pipper J, Inoue M, Ng L F, et al. Catching bird flu in a droplet. *Nat Med*, 2007, 13: 1259–1263
- 68 Qi Z, Ma Y, Deng L, et al. Digital analysis of the expression levels of multiple colorectal cancer-related genes by multiplexed digital-PCR coupled with hydrogel bead-array. *Analyst*, 2011, 136: 2252–2259
- 69 Leng X, Zhang W, Wang C, et al. Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR. *Lab Chip*, 2010, 10: 2841–2843
- 70 Zhang W Y, Zhang W, Liu Z, et al. Highly parallel single-molecule amplification approach based on agarose droplet polymerase chain reaction for efficient and cost-effective aptamer selection. *Anal Chem*, 2012, 84: 350–355
- 71 Thermo Fisher Scientific®, QuantStudio™ 3D digital PCR system user guide, 2013.06 (pub. No. Man0007720).
- 72 Zhong Q, Bhattacharya S, Kotsopoulos S, et al. Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab Chip*, 2011, 11: 2167–2174
- 73 Colle F, Vercruyse D, Peeters S, et al. Lens-free imaging of magnetic particles in DNA assays. *Lab Chip*, 2013, 13: 4257–4262
- 74 Huggett J F, Whale A. Digital PCR as a novel technology and its potential implications for molecular diagnostics. *Clin Chem*, 2013, 59: 1691–1693
- 75 Morisset D, Stebih D, Milavec M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS One*, 2013, 8: e62583
- 76 Kang D K, Ali M M, Zhang K, et al. Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using integrated comprehensive droplet digital detection. *Nat Commun*, 2014, 5: 5427
- 77 Looft T, Allen H K, Casey T A, et al. Carbadox has both temporary and lasting effects on the swine gut microbiota. *Front Microbiol*, 2014, 5: 276
- 78 Yukl S A, Boritz E, Busch M, et al. Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the berlin patient. *PLoS Pathogens*, 2013, 9: e1003347
- 79 Kiselinova M, Pasternak A O, De Spiegelaere W, et al. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA. *PLoS One*, 2014, 9: e85999
- 80 Perez-Santiago J, Schrier R D, de Oliveira M F, et al. Cell-free mitochondrial DNA in CSF is associated with early viral rebound, inflammation, and severity of neurocognitive deficits in HIV infection. *J Neurovirol*, 2015, 1–10
- 81 Oliveira M F, Gianella S, Letendre S, et al. Comparative analysis of cell-associated HIV DNA levels in cerebrospinal fluid and peripheral blood by droplet digital PCR. *PLoS One*, 2015, 10: e0139510
- 82 Pavsic J, Zel J, Milavec M. Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 408: 67–75
- 83 Marx V. PCR: paths to sensitivity. *Nat Methods*, 2014, 11: 241–245
- 84 Wang T, Sha H, Ji D, et al. Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell*, 2014, 157: 1591–1604
- 85 Pender A, Garcia-Murillas I, Rana S, et al. Efficient genotyping of KRAS mutant non-small cell lung cancer using a multiplexed droplet digital PCR approach. *PLoS One*, 2015, 10: e0139074
- 86 Lin C C, Huang W L, Wei F, et al. Emerging platforms using liquid biopsy to detect EGRF mutations in lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15: 1427–1440
- 87 陈文辉, 罗军, 赵超. 固态纳米孔: 下一代 DNA 测序技术——原理, 工艺与挑战. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44: 649–662
- 88 Schwarz R F, Ng C K, Cooke S L, et al. Spatial and temporal heterogeneity in high-grade serous ovarian cancer: a phylogenetic analysis. *PLoS Med*, 2015, 12: e1001789
- 89 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431: 350–355
- 90 Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281–297
- 91 Ma J, Li N, Guarnera M, et al. Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis. *Biomarker Insights*, 2013, 8: 127–136
- 92 Ono S, Lam S, Nagahara M, et al. Circulating microRNA biomarkers as liquid biopsy for cancer patients: pros and cons of current assays. *J Clin Med*, 2015, 4: 1890–1907
- 93 Jia L, Zhang D, Xiang Z, et al. Nonfunctional ingestion of plant miRNAs in silkworm revealed by digital droplet PCR and transcriptome analysis. *Sci Rep*, 2015, 5: 12290
- 94 Bizouarn F. Introduction to digital PCR. *Methods Mol Biol*, 2014, 1160: 27–41

- 95 White R A, 3rd, Blainey P C, Fan H C, et al. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 2009, 10: 116–128
- 96 Kim H, Bartsch M S, Renzi R F, et al. Automated digital microfluidic sample preparation for next-generation DNA sequencing. *J Lab Auto*, 2011, 16: 405–414
- 97 Eastburn D J, Huang Y, Pellegrino M, et al. Microfluidic droplet enrichment for targeted sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: e86
- 98 Macosko E Z, Basu A, Satija R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 2015, 161: 1202–1214
- 99 Klein A M, Mazutis L, Akartuna I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*, 2015, 161: 1187–1201
- 100 Swennenhuis J F, Tibbe A G, Stevens M, et al. Self-seeding microwell chip for the isolation and characterization of single cells. *Lab Chip*, 2015, 15: 3039–3046
- 101 凡时财, 李承哲, 裴云飞. 人类基因组 DNA 甲基化数据分析的研究现状. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45: 450–459
- 102 Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003, 33 Suppl: 245–254
- 103 Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 21–32
- 104 Goll M G, Bestor T H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 481–514
- 105 Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, et al. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 14195–14200
- 106 Mazutis L, Gilbert J, Ung W L, et al. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc*, 2013, 8: 870–891
- 107 Pfitzner C, Schroder I, Scheungraber C, et al. Digital-Direct-RT-PCR: a sensitive and specific method for quantification of CTC in patients with cervical carcinoma. *Sci Rep*, 2014, 4: 3970
- 108 Weaver W M, Tseng P, Kunze A, et al. Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 114–123
- 109 Hoefnagel D. Chromosome abnormalities and genetic counselling. *Trans N Engl Obstet Gynecol Soc*, 1965, 19: 57–61
- 110 Rieger R, Michaelis A, Green M M. *Glossary of Genetics and Cytogenetics: Classical and Molecular*. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012
- 111 Stahl T, Bohme M U, Kroger N, et al. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 2015, 43: 462–468
- 112 Regan J F, Kamitaki N, Legler T, et al. A rapid molecular approach for chromosomal phasing. *PLoS One*, 2015, 10: e0118270
- 113 Brenan C, Morrison T. High throughput, nanoliter quantitative PCR. *Drug Discov Today Technol*, 2005, 2: 247–253

Advances in absolute quantitative PCR and biomedical applications

CAO Lei^{1,2}, XU XiaYu^{1,2}, GAO Bin^{1,2,3}, LI ShiChao^{1,2}, WEN Ting⁴, LI YingHui⁵,
LU TianJian² & XU Feng^{1,2}

*1 Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology,
Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;*

2 Bioinspired Engineering and Biomechanics Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

3 Department of Endocrinology and Metabolism, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

4 Dian Di Biotech Company, Xi'an 710049, China;

5 State Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application, Chinese Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China

Since 1985, Mullis invented the *in vitro* polymerase chain reaction (PCR), PCR has been developed to the third generation, which is the absolute quantitative digital PCR. In the past three decades, PCR has played a significant role in molecular diagnosis aiming at genetic disease, pathogen, oncogenes and forensic identification. In this review, we first briefly introduce the development of PCR and then review and discuss the technical route and applications of absolute quantitative digital PCR. Finally, the challenges and future perspectives in biomedicine are summarized.

absolute quantification, polymerase chain reaction, micro-well, water in oil, microfluidics

doi: 10.1360/N052015-00332