

数字 PCR 技术的发展和應用

詹 成¹(综述) 燕 丽² 王 琳¹ 金玉麟¹ 陈 力¹ 时 雨^{1△}(审校) 王 群¹

(¹ 复旦大学附属中山医院胸外科 上海 200032; ² 复旦大学附属耳鼻喉科医院放疗科 上海 200031)

【摘要】 数字 PCR(digital PCR, dPCR)技术作为一种全新的核酸检测方法,通过把反应体系均分到大量反应单元中独立地进行 PCR,并根据泊松分布和阳性比例来计算核酸数量。目前 dPCR 主要分为微滴式和芯片式两种。与传统 PCR 技术相比, dPCR 具有高灵敏度、高精度、高耐受性和绝对定量的优点。因此, dPCR 技术在近年来得到了迅速的发展,广泛地应用于稀有突变检测、拷贝数变异分析和复杂样本基因表达检测等方面。

【关键词】 数字 PCR; 微滴式 dPCR; 芯片式 dPCR; 突变检测; 拷贝数变异; 基因表达

【中图分类号】 Q 311 **【文献标志码】** B **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2015.06.017

The development and application of digital PCR

ZHAN Cheng¹, YAN Li², WANG Lin¹, JIN Yu-lin¹, CHEN Li¹, SHI Yu^{1△}, WANG Qun¹

(¹ Department of Thoracic Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

² Department of Radiation Oncology, Eye and ENT Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China)

【Abstract】 As a new detection technology for the quantification of nucleic acid, the digital PCR (dPCR) divides reaction mixes into a large number of units, carries out PCR independently in each units, and then calculates the number of nucleic acids according to Poisson distribution and positive ratio. At present, dPCR can be divided into two major kinds: droplet dPCR and chip dPCR. dPCR has the advantages of higher sensitivity, higher precision, higher tolerance and absolute quantification when compared with the traditional PCR technology. Therefore, dPCR technology has been rapidly developing in recent years, and widely applied to the detection of rare mutations, copy number variation analysis and gene expression detection in complicated samples.

【Key words】 digital PCR; droplet dPCR; chip dPCR; mutation detection; copy number variation; gene expression

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81401875, 81472225) and the Natural Science Foundation of Shanghai, China (14ZR1406000).

自从 PCR 技术在 20 世纪 80 年代被发明以来,这一方法已经成为生命科学研究领域中最基础和最常规的实验方法之一。第一代传统的 PCR 技术采用琼脂糖凝胶电泳的方法来对 PCR 产物进行分析,但这一方法主要适用于定性和半定量研究。在 20 世纪 90 年代初出现了第二代的定量 PCR

(quantitative PCR, qPCR)技术,通过在反应体系中加入荧光染料,检测反应中发出的荧光信号达到阈值的循环数即循环阈值(cycle threshold, Ct)来计算目的酸序列的含量。qPCR 技术因其快速、简易和经济的特点,目前仍被各实验室广泛地使用。但 qPCR 技术所谓的“定量”仍然是相对的,依赖于 Ct

值和标准曲线。qPCR 在目的序列含量低、表达量差异十分微小、反应体系中含大量背景序列或抑制物等情况下,灵敏度和精确度都受到很大限制。在这种背景下,第三代 PCR——数字 PCR (digital PCR, dPCR) 应运而生。

dPCR 技术的原理 dPCR 的原理并不复杂。首先, dPCR 把反应体系均匀分配到大量反应单元中, 每个反应单元中不包含或包含一个到多个目的核酸序列, 目的核酸序列的数量符合泊松分布。然后在每个反应单元中独立地进行 PCR 扩增。扩增结束后, 检测每个反应单元的荧光信号, 最终根据泊松分布和荧光信号阳性的反应单元占有所有反应单元的比例来计算目的核酸序列的拷贝数。在 dPCR 反应中荧光信号的产生过程基本与 qPCR 相同。

dPCR 技术的发展 早在 1992 年, 在 qPCR 技术成熟之前, Sykes 等^[1] 使用有限稀释 (limiting dilution)、PCR 和泊松分布模型的方法, 检测了复杂背景下低丰度的 IgH 重链突变基因, 进行了极其精细的定量研究, 灵敏度可达 2/160 000。虽然当时并未明确称这一方法为“数字 PCR”, 但此研究已经奠定了 dPCR 的雏形, 并且明确了 dPCR 检测中一个极其重要的原则, 即以“终点信号的有或无”(all-or-none end point) 作为定量方法, 这也是后来这一方法被命名为 dPCR 的主要原因^[2]。1999 年, Vogelstein 等^[3] 首次正式提出了 dPCR 的概念, 他们在结肠癌患者粪便中检测 KRAS 基因突变时, 首先把样本分配到 384 孔板中, 然后分别用不同荧光检测突变基因和正常基因, 通过计算突变基因和正常基因的比例来得出突变率。

虽然 dPCR 技术的原理并不复杂, 然而早期在第一步的样品分配的环节上却遇到了难以突破的困难, 在分配的数量和均匀性上都很难达到要求, 这一困难极大地限制了 dPCR 技术的发展。直到近几年来, 随着油包水乳化微滴、集成微流体通路 (integrated fluidic circuit, IFC)、纳米制造等技术的出现和快速发展, dPCR 技术终于突破了技术瓶颈, 成功地实现了商业化。

目前商业化的 dPCR 技术可以分成两大类: 微滴式 dPCR (droplet dPCR, ddPCR) 和芯片式 dPCR (chip dPCR, cdPCR) 技术。ddPCR 技术以 Biorad 公司的 QX200 系统以及 Raindance Technologies 公司的 RainDrop 为代表, 其原理是把每个样本的

反应液均匀分割成 2 万个 (QX200) 或 100 个 ~ 1 000 万个 (RainDrop) 乳液包裹的微液滴, 在每个微滴内分别进行 PCR 扩增反应。然后 ddPCR 通过类似于流式细胞技术的方法逐个对液滴的荧光信号进行检测, 计算含目标荧光的液滴占有所有液滴的比例来检测目的序列的含量。cdPCR 技术以 Fluidigm 公司的 BioMark HD 系统以及 Life Technology 公司的 QuantStudio 3D 系统为代表, 在这一技术中, 反应液通过微流控等技术被均匀导入芯片上的反应仓或通孔中进行 PCR 反应, 然后通过类似于基因芯片的方法扫描每个反应仓或者通孔的荧光信号, 进而计算目的序列的含量。目前, 每张芯片上集成有相互独立的 1 万 ~ 4 万个 (BioMark HD) 反应仓或者 2 万个 (QuantStudio 3D) 通孔。

dPCR 技术的优势和应用 dPCR 技术较 qPCR 技术有着以下的优势: (1) 高灵敏度。dPCR 本质上将一个传统的 PCR 反应变成了数万个 PCR 反应, 在这数万个反应单元中分别独立检测目的序列, 从而大大提高了检测的灵敏度。(2) 高精确度。dPCR 通过计算在数万个反应单元中阳性反应单元数量和比例, 可以精确地检测出变化很小的目的序列差异。(3) 高耐受性。dPCR 技术第一步反应体系分配的过程, 可以使背景序列和 PCR 反应抑制物被均匀分配到每个反应单元, 而大部分反应单元中并不含有目的序列, 低丰度的目的序列被相对富集于某些反应单元中, 从而显著地降低了这些反应单元中背景序列和抑制物对反应的干扰。另外, dPCR 在对每个反应单元进行结果判读时仅判断阳性/阴性两种状态, 不依赖于 Ct 值, 受扩增效率的影响大为降低, 对背景序列和抑制物的耐受能力也大大提高。(4) 绝对定量。PCR 直接计算目的序列的拷贝数, 无需依赖于 Ct 值和标准曲线就可以进行精确的绝对定量检测。

dPCR 的以上优点使得 dPCR 特别适合于以下方面的应用:

稀有突变检测 在大量野生型基因存在的情况下精准地检测低含量的突变基因是目前的研究难点之一, 竞争性反应严重影响突变基因的检测^[4]。而 dPCR 技术从背景序列中检测低丰度目的序列的能力和高灵敏度的特点使得这一技术特别适合在复杂背景中检测稀有突变。

上皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)-酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine

kinase inhibitor, TKI)类分子靶向药物在目前非小细胞肺癌治疗中发挥着重要作用,但几乎所有从EGFR-TKI药物获益的肺癌患者最终都会产生耐药性,EGFR的T790M突变是这一耐药性产生的重要原因之一。Isobe等^[5]采用dPCR检测了肺癌术后采用EGFR-TKI靶向药物治疗并最终复发的患者所切除的原发灶、复发灶活检样本以及血清游离DNA(cell-free DNA, cfDNA)中T790M突变,发现对于复发灶T790M突变阳性和阴性的患者,原发灶T790M的突变频率分别为 $0.78\% \pm 0.36\%$ 和 $0.07\% \pm 0.09\%$,血清cfDNA中T790M的突变频率分别为 $0.018\% \pm 0.023\%$ 和 $0.010\% \pm 0.014\%$ 。Reid等^[6]采用dPCR研究恶性黑色素瘤患者循环肿瘤细胞中BRAF基因V600E和V600K突变,结果表明dPCR在灵敏度上高于qPCR 200倍,检测下限为0.0005%。这些研究结果表明dPCR在检测稀有突变上的巨大优势和超高的灵敏度。目前已有大量研究采用dPCR从患者血清、细胞和组织内检测疾病相关的稀有突变,为诊断和治疗提供了重要的参考^[7-10]。

拷贝数变异分析 拷贝数变异(copy number variations, CNV)研究需要极高的定量精度以区别不同拷贝数之间的微小差异,而dPCR具有高精度的特点,通过精确计定量目标基因与参照基因(拷贝数为1的基因,例如CEP17或RNaseP),并计算它们的比值,从而得到目标基因的拷贝数,对不同拷贝数的分辨精度远高于qPCR和测序。

Qin等^[11]采用dPCR技术检测样本中的CYP2D6和ERBB2基因CNV,结果表明dPCR技术在CNV检测上有着很高的分辨率,可以有效地区分低达15%的拷贝数差别(例如区分拷贝数为6和7时)。而Whale等^[12]和Weaver等^[13]的研究同样表明了dPCR技术在CNV检测上的优势,分别可以有效区分17%和25%的CNV,并且随着所用的反应室数目的升高其分辨率可以进一步提升。Bharuthram等^[14]比较了dPCR和qPCR对CCL4L1和CCL4L2基因CNV的检测结果,发现dPCR的准确性和重复性都很高,而qPCR在基因拷贝数较高时准确性明显下降。Davis等^[15]研究脑编码DUF1220结构域CON2亚型的序列拷贝数与认知能力的关系时,采用dPCR技术验证基因芯片的结果,研究显示dPCR可以较好地区分CON2的编码序列多达26~33个的拷贝数。

复杂样本基因表达检测 dPCR在石蜡包埋样本、血液、粪便、食品、土壤、淤泥、标本等样本的肿瘤标志物检测、病原微生物检测、转基因成分鉴定及含量分析和环境生物学、法医学、动物学等涉及基因表达的研究中得到了广泛地应用。这些样本中含有大量PCR反应的抑制物,极大地影响了PCR反应效率。另外,在某些检测中,难以制备测定标准曲线所需的标准物质。dPCR不受PCR抑制物的影响、不依赖标准曲线的优势,使其特别适合于这些复杂样本中基因表达的准确定量检测。

Dingle等^[16]系统比较了dPCR和qPCR对十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate sodium salt, SDS)、乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA)、肝素等常见PCR抑制物的耐受程度,结果表明dPCR对SDS和肝素的耐受程度远高于qPCR。Witwer等^[17]在研究动物进食前后血浆植物来源的miRNA含量变化时,采用dPCR技术来避免qPCR特异性低、重复性差的问题。Morisset等^[18]分别采用dPCR和qPCR在玉米种子中检测MON810转基因成分,对比发现dPCR的灵敏度、重复性和对抑制物的耐受性均高于qPCR。Moser等^[19]把含胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 1, IGF1)的腺相关病毒载体注射入小鼠骨骼肌,随后采用dPCR检测小鼠血中IGF1,发现dPCR有非常高的灵敏度和重复性。目前已有大量针对复杂样本基因表达的研究采用dPCR进行检测,研究结果均体现了dPCR在这方面的优势^[20-26]。

结语 dPCR是一个拥有巨大潜力的新兴技术,具有高灵敏度、高精度、高耐受性和绝对定量的优点,已经在稀有突变检测、CNV分析和复杂样本基因表达检测等方面有着广泛的应用。dPCR技术将会进一步发展完善,应用范围也会大大扩展。

参 考 文 献

- [1] Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, *et al.* Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution [J]. *Biotechniques*, 1992, 13(3): 444-449.
- [2] 李春勇. 数字PCR技术原理及应用[J]. *生物技术世界*, 2014, 84(11): 10-13.
- [3] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [4] Roma C, Esposito C, Rachiglio AM, *et al.* Detection of EGFR mutations by TaqMan mutation detection assays

- powered by competitive allele-specific TaqMan PCR technology[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:385087.
- [5] Isobe K, Hata Y, Tochigi N, *et al.* Usefulness of nanofluidic digital PCR arrays to quantify T790M mutation in EGFR-mutant lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2015, 12(1):31–37.
- [6] Reid AL, Freeman JB, Millward M, *et al.* Detection of BRAF-V600E and V600K in melanoma circulating tumour cells by droplet digital PCR[J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(15):999–1002.
- [7] Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, *et al.* Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(5):1087–1097.
- [8] Wang Z, Chen R, Wang S, *et al.* Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA by digital PCR for prognosis of EGFR-TKI treatment in advanced NSCLC [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e110780.
- [9] Sanmamed MF, Fernandez-Landazuri S, Rodriguez C, *et al.* Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1):297–304.
- [10] Bacher U, Dicker F, Haferlach C, *et al.* Quantification of rare NPM1 mutation subtypes by digital PCR[J]. *Br J Haematol*, 2014, 167(5):710–714.
- [11] Qin J, Jones RC, Ramakrishnan R. Studying copy number variations using a nanofluidic platform[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(18):e116.
- [12] Whale AS, Huggett JF, Cowen S, *et al.* Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(11):e82.
- [13] Weaver S, Dube S, Mir A, *et al.* Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution[J]. *Methods*, 2010, 50(4):271–276.
- [14] Bharuthram A, Paximadis M, Picton AC, *et al.* Comparison of a quantitative Real-Time PCR assay and droplet digital PCR for copy number analysis of the CCL4L genes[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 25:28–35.
- [15] Davis JM, Searles VB, Anderson N, *et al.* DUF1220 copy number is linearly associated with increased cognitive function as measured by total IQ and mathematical aptitude scores[J]. *Hum Genet*, 2015, 134(1):67–75.
- [16] Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, *et al.* Tolerance of droplet-digital PCR vs. real-time quantitative PCR to inhibitory substances [J]. *Clin Chem*, 2013, 59(11):1670–1672.
- [17] Witwer KW, McAlexander MA, Queen SE, *et al.* Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs; limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs[J]. *RNA Biol*, 2013, 10(7):1080–1086.
- [18] Morisset D, Stebih D, Milavec M, *et al.* Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e62583.
- [19] Moser DA, Braga L, Raso A, *et al.* Transgene detection by digital droplet PCR[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e111781.
- [20] Rothrock MJ, Hiett KL, Kiepper BH, *et al.* Quantification of zoonotic bacterial pathogens within commercial poultry processing water samples using droplet digital PCR[J]. *Adv Microbiol*, 2013, 3(5):403–411.
- [21] Tadmor AD, Ottesen EA, Leadbetter JR, *et al.* Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR[J]. *Science*, 2011, 333(6038):58–62.
- [22] Kiselinova M, Pasternak AO, De Spiegelaere W, *et al.* Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e85999.
- [23] Racki N, Morisset D, Gutierrez-Aguirre I, *et al.* One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(3):661–667.
- [24] Strain MC, Lada SM, Luong T, *et al.* Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e55943.
- [25] Racki N, Dreo T, Gutierrez-Aguirre I, *et al.* Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples[J]. *Plant Methods*, 2014, 10(1):42.
- [26] Kim TG, Jeong SY, Cho KS. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(13):6105–6113.

(收稿日期:2015-02-06;编辑:王蔚)