

数字PCR成名史

杨城和¹, 吕弋^{1,2}, 刘睿^{1,*}

¹ 四川大学化学学院, 成都 610064

² 四川大学分析测试中心, 成都 610064

摘要: 数字PCR(聚合酶链式反应)能够带来高灵敏度水平的核酸检测, 甚至实现单分子分析。由于其独特的绝对定量能力和高灵敏度, 数字PCR成为了一种强大的生物分子学工具。本文将从第一人称视角带入数字PCR, 共同体验数字PCR的生活, 以便于读者理解数字PCR的发展背景、技术原理和疫情中的应用。

关键词: 数字PCR; 单分子检测; 低丰度检测; 高灵敏度; 绝对定量

中图分类号: G64; O6

The Rise to Fame of Digital PCR

Chenghe Yang¹, Yi Lü^{1,2}, Rui Liu^{1,*}

¹ College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China.

² Analytical & Testing Center, Sichuan University, Chengdu 610064, China.

Abstract: Digital PCR (Polymerase Chain Reaction) enables highly sensitive nucleic acid detection, allowing for the analysis of individual molecules. With its unique capability for absolute quantitation and high sensitivity, digital PCR has emerged as a powerful tool in biomolecular research. This article presents digital PCR from a first-person perspective, allowing readers to appreciate the evolution, technical principles, and applications of digital PCR during the pandemic.

Key Words: Digital PCR; Single-molecule detection; Low-abundance detection; High sensitivity; Absolute quantitation

PCR (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应)技术自1983年问世以来, 就在病原体、癌基因等疾病分子的诊断领域发挥了巨大的作用, 并且因其能够高效复制DNA片段的特点, 该技术成功荣获了1993年的诺贝尔化学奖^[1]。之后随着荧光技术的发展, 人们在DNA扩增过程中加入荧光物质, 以荧光强度来测定聚合酶链式反应后的产物总量, 实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)诞生了, 但是由于其是大体积反应系统, 反应过程中的非特异性扩增会增加假阳性结果和背景信号, 从而无法获得绝对定量的结果。

近几年随着MEMS (微机电系统)工艺的不断成熟和微流控技术的不断发展, 数字PCR (digital PCR, dPCR)应运而生。作为一种新型的PCR技术, 数字PCR弥补了qPCR的不足, 无需标准物质和标准曲线即可实现核酸的绝对定量, 同时它还能够单个水平分子上进行检测, 可以检测低至0.001%的等位基因频率, 并且在检测低丰度目标时可以提供更高的灵敏度、特异性和准确性^[2]。那么数字

收稿日期: 2024-06-27 录用日期: 2024-09-06; 网络发表: 2024-01-07

*通讯作者, Email: liur@scu.edu.cn

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(22074096); 四川大学大学生创新训练计划项目(C2021118083)

PCR究竟是怎样一步步走向成功的呢？就让我们以第一人称视角，进入数字PCR的内心世界，一起听听数字PCR的冒险经历吧。

1 PCR的故事

在很久以前，热稳定DNA聚合酶尚未被发现时，DNA的体外复制只能通过先高温使双链DNA变性解旋成单链，然后降低温度并加入设计引物、DNA聚合酶、dNTP(脱氧核糖核苷三磷酸)来完成。但是，DNA聚合酶在高温时会失活，因此每一个循环时都要加入新的DNA聚合酶，这样不仅操作繁琐，而且价格昂贵。直到可以耐受90℃以上高温而不失活的Taq DNA聚合酶被发现，扩增过程不再需要每个循环都加入聚合酶，这使得操作变简单的同时，也大大降低了成本。为了继承这些优点，同时继续创新发展，我的父亲PCR(聚合酶链式反应)就建立了我们PCR的大家庭。

我的父亲PCR非常严格，他常常教导我们要成为一种对社会、对科学有贡献的技术，而他会对我们讲述他那时候的故事：“那时候我一个循环只需要两分钟，两、三分钟我就能将需要扩增的目的基因扩增放大几百万倍^[3]。”当他说这些时，他的脸上总是充满了自豪。

我和我的兄弟姐妹们也对这些故事充满了好奇：“父亲您是怎么做到的啊？”

他说：“我会通过三步来实现，且听我细细道来。”这时他总会喝一口茶，而我们的兴趣也被勾了起来，“首先，我会将模板DNA加热到93℃变性，使模版DNA双链或者扩增过的DNA双链解离。变性后我会把温度退火降至55℃，使引物与模版DNA单链的互补序列配对结合，最后在72℃、DNA聚合酶的作用下，以dNTP为反应原料，根据碱基互补配对原理和半保留复制原理，延伸合成一条与模版DNA链互补的‘半保留复制链’。这就是全部的步骤了(图1)。”

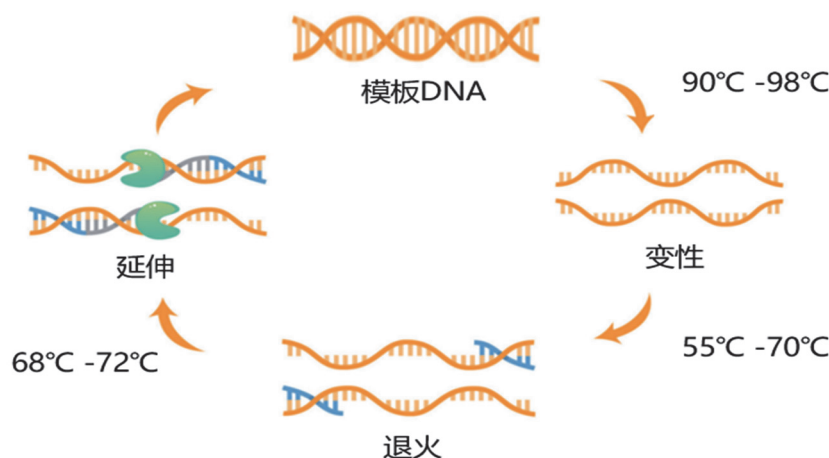


图1 PCR扩增流程^[4]

此时的我们已经明白了：“变性过程是为了让双链解离成单链，以便在退火过程引物可以与单链结合，从而延伸合成一条‘半保留复制链’。”

我的父亲此时总会露出欣慰的笑容，他点点头，说：“没错，看来你们已经完全理解了我的思路，掌握了我的方法，希望以后你们可以将我的方法加以完善，然后总结出你们自己独特的新方法，让咱们家族枝繁叶茂、生生不息。”

2 实时荧光PCR有想法

我的哥哥qPCR(实时荧光定量PCR)是我们之中听得最认真、学得最认真的。他继承了父亲的理念，在父亲的思路里面加入了自己的想法。

在听完父亲的讲话后，我的哥哥又仔细地思考了一下父亲的话，激动地说道：“我懂了，父亲的方法只能通过半保留复制实现定性分析，而如果要实现更为精确的定量分析，只是这样可不行。”说罢，他就将自己锁在房间里，我也有好几天没有再见过他。

直到一天又一次的家庭聚会，我的哥哥出现了，并兴奋地大喊了一句：“成了！”

看着我们兄弟姐妹包括父亲关切的目光，他嘿嘿一笑，对着父亲说：“我把您的方法改进了一下，如果成功的话，我们的技术就可以实现定量分析了。”

父亲也非常惊喜：“讲讲！”

随后哥哥咳了一声，说：“我的想法是向PCR体系中加入荧光信号，让荧光基团连接在产物链上，之后就可以利用荧光信号的积累实时检测整个PCR进程，也可以通过绘制荧光信号的标准曲线对未知模板链进行定量分析了^[5] (图2)。”

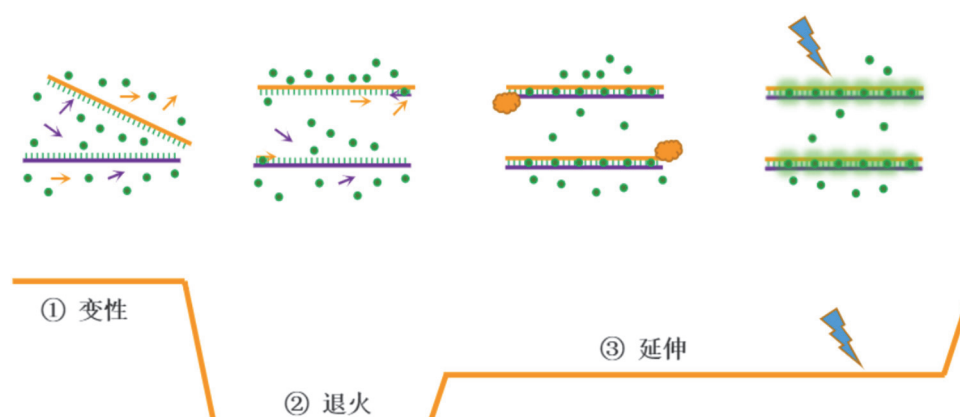


图2 实时荧光PCR流程^[4]

父亲听后很高兴，他说哥哥的思路非常正确，并且让他大胆实践，如果成功肯定会大有作为。事实也正如父亲所料，他很快就被广泛应用于食品科学检测鉴定研究、微生物检测控制分析及临床诊断等领域^[6]。

但是突然有一天，他把我叫到房间说：“其实我的方法是有一些问题的，我发现在反应过程中，底物的消耗和焦磷酸盐分子的积累会导致反应速率逐渐降低，模板链不会再以指数扩增的形式生成产物^[7]。因此不能通过最终产物的量推算模板链的量，只有在指数扩增阶段才可以对模板链进行定量分析，是一种相对定量的分析方法，而且受到阈值循环数(cycle threshold, CT值)和样品中抑制剂的影响也较大，无法准确检测低丰度样品。这些问题就交给你来解决。”

3 数字PCR开辟自己的道路

带着哥哥留下的问题，我开始了新一轮的思考。他的反应体系仍然是大体系，这意味着许多因素都会影响实验结果而导致误差增大。如果我可以把每一个PCR反应体系都提取出来，然后再向里面加入荧光基团，那么有多少荧光信号就代表了有多少个PCR反应，就有多少条模板链。这样得到的实验结果不仅更精准，而且还可以实现低丰度目标物的检测。

说干就干，我先将扩增体系进行极限稀释，分成数百万个独立扩增的PCR反应，使得每个反应中尽可能只含有一个模板分子。之后再对各个反应进行独立的扩增，扩增完成后读取荧光信号对结果的阴阳性进行判断，有荧光信号的反应单元标记为“1”，没有荧光信号的反应单元标记为“2”。但是这样就可以直接通过读出有荧光信号的反应单元来确定目标物分子的拷贝数了吗？其实这只是理想条件下，事实上反应孔中可能会有0个、1个或多个模板分子。因此我引入了泊松统计方法进行数据校准，从而计算出靶分子的拷贝数和浓度^[8]。原理如图3所示。

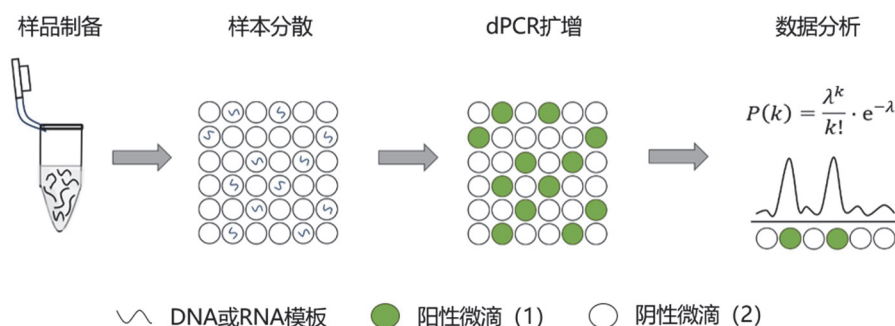


图3 Digital PCR流程和泊松分布公式

$P(k)$: 在 λ 条件下每个反应单元中含有 k 个拷贝目标分子的概率; λ : 每个反应单元包含目标分子的平均拷贝数;
 k : 反应单元内实际存在的目标分子数; e : 自然常数

我将自己的想法告诉哥哥后,他对这个思路大为赞赏,他说:“我是测量整个体系中荧光信号的变化趋势,然后根据指数扩增阶段来实现定量的目的;而你是把整体体系分成单独的体系,再通过收集终点时的荧光信号,将定量简化为一系列阳性和阴性结果的枚举,从而将信号转化为二进制数字以便于统计。这样做基本实现了单分子检测,避免了模板之间的竞争反应,不仅不依赖于标准曲线对样品进行定量分析,也避免了反应速率变化所带来的陷阱,是一种更精准、灵敏度更高的绝对定量方法啊^[9]!”

听到哥哥的话后我深感振奋,立志要用我独特的方式为核酸检测提供更多的思路和方法。因此在之后我又根据分配样品方式的不同开发出了三种系统,分别是微滴式数字PCR (droplet digital PCR, ddPCR)、芯片式数字PCR (chip digital PCR, cdPCR)和微流体数字PCR (microfluidic digital PCR, mdPCR)。ddPCR是将反应液分割成成千上万有乳液包裹的微液滴,每个微液滴在PCR扩增过程中独立进行,这避免了物质在互相扩散和热扩散过程中的损失,在扩增完成后,就可以利用流式细胞技术对荧光信号逐个进行单独的检测,通过计算含目标荧光的液滴占所有液滴的比例即可定量目的序列的含量^[10]。由于其在不同PCR仪中均可扩增的优势,因此应用广泛。cdPCR则是通过微流控技术把反应液均匀导入芯片上的独立反应仓中进行扩增,通过类似于基因芯片的扫描技术,检测每个反应仓或通孔的荧光信号,从而计算出目的序列的含量^[11]。cdPCR的优势在于其高通量和并行处理能力,但需要特定的仪器来完成扩增和检测过程。mdPCR通过微流体通道对模板进行分液,可以生成纳升(nL)级或更小液滴,虽然可以提供极高的灵敏度,但是其上样过程需借助机械驱动设备,不仅大幅度提高了仪器成本,也提高了操作复杂性。

4 数字PCR的疫情之战

凭借着更高的灵敏度和精确度,我很快就在研究检测病毒、细菌、衣原体、寄生虫感染等领域被委以重任,比如说2020年的一次,我就被分配到了检测新冠病毒的第一线,为抗击疫情做出了卓越的贡献。

严重急性呼吸综合症冠状病毒2号(SARS-CoV-2)引发的新冠疫情对于全球的公共卫生造成了巨大的威胁,它们主要以传染途径多样、传播能力强的特点在全球各处游走。虽然随着时间的推移,人体中的免疫系统已经有了处理该病毒的方法,它们已经不再构成威胁,但是根据病毒族群的发展趋势来看,它们短时间内不会消失,并且还会进化成多种变异毒株,其中Omicron变异株是全球流行的优势毒株^[12],而我的任务就是对它进行高效地检测和鉴定。

在接到这份任务后,我立即查找了前辈检测的相关资料,发现它们使用的引物和探针靶标大多是对O(开放读码框架)基因、N(核衣壳蛋白)基因、E(包膜蛋白)基因所设计的,并不能检测SARS-CoV-2各变异株之间S(刺突蛋白)基因的序列差异,所以我要专门针对于Omicron变异株S基因进行检

测，来为微量RNA病毒检测以及病毒风险监测提供技术支撑。

首先我以变异株的O基因、N基因、E基因和S基因为模板分别进行单重ddPCR扩增，图4结果显示了四种基因均有良好的扩增效果，各基因阴阳性微滴区分明显，并且阴性对照未出现阳性微滴信号。并且我还发现在55 °C退火阶段，四对引物均能与模板链有效结合，说明还可以构建多重ddPCR检测体系。

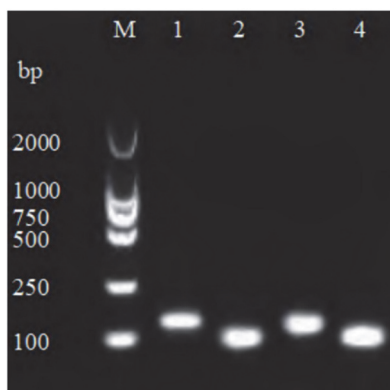


图4 各基因单重ddPCR扩增后产物电泳图^[13]

M: DL2000; 1: ORF1ab基因扩增产物; 2: N基因扩增产物;
3: E基因扩增产物; 4: S基因扩增产物

在实验中，我不断改变四种基因引物与探针的配比和使用量来进行重复扩增实验，每次实验只控制单一变量，结合阴阳性微滴间荧光差值和检测拷贝数筛选出最佳引物探针组合，确保扩增后的一维散点图阴阳性明显区分且中间弥散微滴数较少，最终确定了多重ddPCR反应体系^[13]。

在找到具体方法后，我激动地找到了我的哥哥，并和他一起检测了20份临床样本，经过实验结果比较，我们的检测结果一致，都检出了阳性结果18个^[13]，并且我的检出限更低，灵敏度更高，用于微量新冠病毒也能准确快速地检出，哥哥也说我的方法可以应用于临床诊断了。

这就是我抗击疫情的故事，虽然我仍然存在一些局限和不足，但是我可以及时监测和定量Omicron变异株，对于以后SARS-CoV-2未知变种的研究出了一份力，我相信通过不断完善自我，我在检测病毒、细菌等病原体的检测上会更高效、更精准。

5 结语

虽然数字PCR的故事告一段落了，但是他的传奇经历还在继续，让我们共同期待数字PCR在更多领域的优异表现，我相信有着绝对定量、高灵敏度、高精密度的特点，不管走到哪里他都会发出他独特的光芒。

参 考 文 献

- [1] 燕慧泉, 张仁琼, 王磊, 黄苑, 付立波. 科技管理研究, 2017, 37 (7), 157.
- [2] 王国飞, 王雪亮, 周靖. 国际检验医学杂志, 2024, 45 (8), 1006.
- [3] 巩莉, 刘秀红. 中国食品工业, 2024, No. 5, 83.
- [4] 干货! 常用PCR技术及原理. [2025-01-02]. <https://www.yeasen.com/news/detail/1268>
- [5] 秦爱, 王娟, 邓方进, 余秋地, 周朝旭, 李根容, 肖昭竞. 食品科学, 2024, 45 (18), 350.
- [6] 索晓雄, 李柯帆, 赵一萌, 刘彩霞, 闫艳, 杜晨晖, 裴香萍. 分子植物育种, 2025, in press.

- [7] 叶安徒. DNA聚合酶的分子改造及其在探针法qPCR中的应用[硕士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2023.
- [8] Pinheiro, L. B.; Coleman, V. A.; Hindson, C. M.; Herrmann, J.; Hindson, B. J.; Bhat, S.; Emslie, K. R. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (2), 1003.
- [9] 黄晓彦, 陈淑慰, 李昀哲, 徐勿. 农业与技术, **2024**, *44* (11), 172.
- [10] Quan, P. L.; Sauzade, M.; Brouzes, E. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2018**, *18*, 1271.
- [11] Duewer, D. L.; Kline, M. C.; Romsos, E. L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (30), 9061.
- [12] Sun, Z. Y.; Chai, J. T.; Xu, J. C. *Chin. J. Virol.* **2023**, *39* (2), 517.
- [13] 郑巧, 林华, 徐浩, 安徽, 薛昌华, 张婧, 韩国全. 生物技术通报, **2024**, *40* (2), 80.