

数字PCR

——原理、技术及应用

Digital PCR:
Theory, Technology & Application

主 编 彭年才



科学出版社

数字 PCR

——原理、技术及应用

Digital PCR: Theory, Technology & Application

主 编 彭年才
副主编 李 政 苗保刚 李 明
编 者 (以姓氏笔画为序)
丁 磊 田 辉 李 明 李 政
张增明 苗保刚 赵书豪 胡 飞
彭年才

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话：010-64030229；010-64034315；13501151303（打假办）

内 容 简 介

数字 PCR 以聚合酶链反应的理论和技术体系为基础，结合现代微机电和光学检测技术，实现单分子水平的核酸精确定量检测。数字 PCR 作为第三代 PCR 技术，是实时荧光定量 PCR 原理与现代微机电、微纳制造工程技术相结合的典范。数字 PCR 的核心是将核酸样品平行划分为大规模单分子水平的微反应单元，然后对众多微反应单元内的靶序列进行扩增和光学检测，实现绝对定量和痕量分析。

本书重点介绍了数字 PCR 的原理和技术特征、仪器系统、实验设计、数据处理和典型应用及最新科研进展。拓展介绍了一些实验细节、微流控工程知识。本书可作为生命科学、仪器科学与技术、医学、药学、检验检疫等相关专业科研人员参考用书，也可作为相关专业本科生研究生教材。

图书在版编目（CIP）数据

数字 PCR：原理、技术及应用 / 彭年才主编. — 北京：科学出版社，2017.3

ISBN 978-7-03-052065-4

I. ①数… II. ①彭… III. ①聚合酶链式反应 IV. ①Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2017）第 042645 号

责任编辑：郝文娜 杨卫华 / 责任校对：张小霞

责任印制：肖 兴 / 封面设计：吴朝洪

版权所有，违者必究。未经本社许可，数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 4 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2017 年 4 月第一次印刷 印张：12 3/4

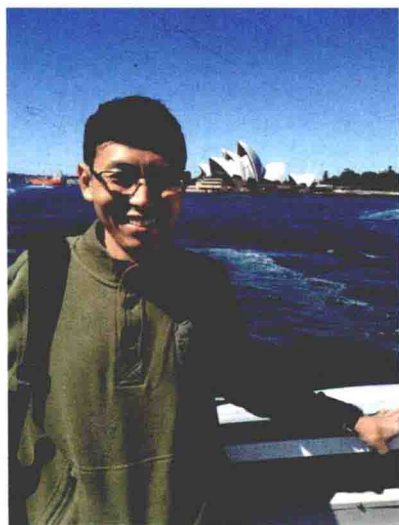
字数：304 000

定价：88.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

主编简介

彭年才，生物医学工程博士，西安交通大学教授，西安天隆科技有限公司和苏州天隆生物科技有限公司董事长，博士生导师，国务院特殊津贴专家，2015 年入选国家创新人才推进计划——科技创新创业人才，陕西省首批“三秦学者”特聘教授，江苏省“双创”领军人才。同时兼任陕西省生命科学检测仪器工程中心主任、陕西省药学会医疗器械专业委员会主任委员、西安市碑林区政协常委和科协副主席、中国微米纳米学会理事、中国生物医学工程学会生物医学光子学专委会常务理事，国家重大仪器专项、863 计划、国家自然科学基金评审专家等职务。自 20 世纪 90 年代初至今，长期专注 PCR 等先进分子诊断基因检测产品产、学、研、用研究开发及推广应用，作为首席科学家主持了“重大疾病检测与预警微系统”国家 863 重点项目和“核酸自动化定量检测与高分辨分析设备研制及应用”国家重大科学仪器设备开发专项，另外主持国家重点研发计划、国家科技支撑计划及省部级重大重点项目十余项。依托西安交大和天隆公司在高通量、高灵敏分子诊断设备与试剂的研究和临床应用、基于微纳芯片的核酸单分子检测、基于微纳制造和微流控技术的 POCT 核酸快速检测分析系统、数字 PCR 系统等方面的研究取得了成果，在 SCI 及国内核心期刊共发表论文 20 余篇、获发明专利授权 16 项、获省部级科技奖励 6 项。在国家自然科学基金和重点科研项目支持下，带领团队成功研发多种型号的核酸提取仪、基因扩增仪、实时荧光定量 PCR 仪、全自动核酸检测工作站等仪器系统和诊断试剂，获 30 多个 CFDA 医疗器械注册证，在禽流感 and 非洲埃博拉出血热等疫情中实现重大应用。



序

20 世纪 90 年代以来，微机电系统、微纳米制造和微流控技术的出现和发展，使得众多科学技术研究进入微尺度领域，很多以往不敢想象的研究工作得以顺利展开，数字 PCR 技术也是在这一技术浪潮中迎来了突破技术瓶颈的最佳契机。借助微流控和微纳米制造技术，使数万乃至数百万个并行 PCR 核酸扩增检测微反应单元的自动制备成为可能，这让核酸检测基因分析的检测灵敏度和特异性都进入了一个前所未有的高度，极大地促进了生命科学检测技术的发展。

另外，“突破微流控芯片、单分子检测、自动化核酸检测等关键技术，开发全自动核酸检测系统”已被写入《“十三五”国家科技创新规划》，成为国家战略。



数字 PCR 技术概念于 1999 年被正式提出，与传统技术不同，数字 PCR 技术将定量 PCR 反应体系分散成大量的微反应单元，然后对众多微反应单元内的靶序列进行“单分子模板 PCR 扩增”和光学检测，实现绝对定量。但在 2006 年第一套基于集成微流控芯片技术的商业化系统推出之前，研究者们基本只能基于手工操作的方式进行烦琐的原始体系分液操作。得益于微纳技术的发展这一难题已经被解决，但必须看到目前国内仍然没有一个本土研发生产的数字 PCR 商业化产品出现，这一方面是因为该技术在微纳芯片及微流控系统集成和制造等领域具有一定的技术壁垒，另一方面也是因为国内从事相关研究工作者缺少对该技术系统深入的了解。

彭年才教授长期从事核酸检测基因分析技术研究和仪器系统研发工作，20 多年来，在困难和艰苦条件下，努力钻研，不懈努力，取得许多重要的成果。在“十一五”和“十二五”国家高技术发展计划，国家重大科学仪器设备开发专项以及国家自然科学基金的支持下，在基因高效均衡扩增、高通量微弱荧光检测、微纳米技术系统集成等方面取得了多项理论创新和技术突破，带领团队研制全自动核酸提取仪、核酸扩增热循环仪、实时荧光定量 PCR 仪等多个专利仪器产品并实现产业化，已经成为国内核酸检测分子诊断仪器研究

和产业化应用的佼佼者。

该团队一直跟踪数字 PCR 国际最新发展前沿，同时在国家研发计划支持下也在国内率先开展了数字 PCR 仪器系统的技术研究和仪器创新研制。本书作者及其团队根据数字 PCR 技术的发展特征，基于自身的理解，并综合国内外数字 PCR 技术和应用进展，从仪器系统、实验设计、数据处理和应用发展等多个角度介绍了数字 PCR 技术的现状。既注重理论的系统性和严密性，也注重内容上的实用性，更重要的是该书除了包含有国内外最新的研究进展以外，也包括了作者本人和他的团队工作实践的第一手资料，是十分难能可贵的。因此，本书是一本有较高学术和科学价值的著作。我很高兴向从事微机电系统技术研究、核酸检测基因分析等有关领域的科技工作者、研究生和高等学校有关专业师生推荐这本参考书。

注：蒋庄德，中国工程院院士，全国人大常委，陕西省科协主席，西安交通大学教授，博士生导师。

蒋庄德

2017 年 1 月 10 日

序 二

与实时荧光定量传统核酸检测技术不同，数字聚合酶链式反应（digital polymerase chain reaction, DPCR）技术不依赖于标准曲线和已知浓度的多个梯度标准品，直接检测样品中核酸的原始浓度，具有绝对定量、高特异、高灵敏检测等诸多优点。该技术自面世以来受到多方关注，2015年3月我国提出精准医疗计划，精准医疗更多集中在人类对恶性肿瘤的诊断和治疗上，这对核酸检测分子诊断提出了更高的精度和灵敏度要求。理论上讲数字PCR技术



可以提供比实时荧光定量PCR更高的检测精度和灵敏度，在极微量核酸样本检测、复杂背景下稀有突变检测、表达量微小差异鉴定和拷贝数变异检测等方面优势更为突出，这为肿瘤等重大疾病的精准靶向诊断提供了新的思路，2015年6月国家卫计委将其列为《肿瘤个体化诊疗检测技术指南》中建议的9种肿瘤个体化诊断方法之一。

理论上，定性PCR也能找到稀有的核酸变异，毕竟PCR擅长从分子的大海中捞针。在正确的引物和循环条件下，PCR反应能够将1个分子的模板DNA复制成数百万的扩增子，足以进行测序或者凝胶电泳检测。但这一过程不是定量的，研究者无法用最终反应中的分子数目来推断起始样品中的DNA含量。荧光定量PCR通过在运行中量化反应解决了这一问题，通过绘制随时间变化的荧光强度曲线，能够比较不同样品间给定基因的相对表达量。数字PCR则通过将分子混合物被离散或分隔化到大量的反应室中（越多越好），这样每个室中平均有1个或零个靶基因。对每个区划进行PCR反应后，使用泊松统计将阳性信号的计数转换为一个绝对值来实现原始样本的绝对定量。

数字PCR概念从20世纪90年代就已经被人提出，但由于技术原因直到2006年左右才有第一套商业化的仪器系统出现，最近几年国外一些厂商又陆续有新的仪器系统面世，而我在想要全面了解数字PCR技术时，发现国内外还没有一本能够系统性介绍数字PCR的专业书籍。彭年才教授团队长期致力于PCR仪器装备的国产化和创新研发的工作，近几年着重关注于数字PCR国内外技术发展和仪器设备的技术研究和创新研发，并在核酸

检测分子诊断领域取得了卓越的成绩。当彭教授邀请我为这本书作序时，我感到十分高兴和欣慰，彭教授 20 多年坚持 PCR 仪器技术的研发和产业化实属不易。

《数字 PCR 原理技术及其应用》较为系统地介绍了关于数字 PCR 的原理技术发展、国内外现有仪器系统、实验设计方法、实验数据处理及应用发展等内容，既包含了数字 PCR 领域发展的最新成果与应用进展，也包括了著作团队对系统技术的认识和理解及他们的工作。从内容上看，书中涵盖了数字 PCR 技术相关的丰富内容，对于初学者来说可以迅速帮助他们建立自己的系统知识，而对于那些已经对数字 PCR 技术有一定了解的读者，通过本书可以弥补之前的知识漏洞和不足。在此，我热忱地向那些对数字 PCR 技术感兴趣的科研工作者、临床检验人员及相关行业执业人员推荐这本学术著作。

注：李金明，男，现为国家卫生和计划生育委员会临床检验中心副主任，临床免疫室主任，研究员，中国协和医科大学研究生院博士研究生导师。



2017 年 1 月 20 日

前言

自从 1985 年 PCR 技术被正式发明以来，该技术迅速在生命科学界得到了普遍认同，Kary Mullis 也因此而获得 1993 年的诺贝尔化学奖。从那之后 PCR 技术始终没有停止过朝着“更好、更快、更强”目标前进的步伐，经历了从终点法定性 PCR 检测到实时荧光“相对”定量 PCR，再到绝对定量数字 PCR 技术的发展历程。与传统技术不同，数字 PCR 技术将 DNA 或 RNA 样品分散成大量的微反应单元，然后对众多微反应单元内的靶序列进行单分子模板 PCR 扩增、荧光检测和统计学分析，实现绝对定量，不依赖于标准曲线和已知浓度的多个梯度标准品，直接检测样品中核酸的原始浓度。由于这种检测方式具有比传统荧光定量 PCR 更加出色的灵敏度和精确性，数字 PCR 迅速得到广泛的关注，尤其在痕量核酸样本检测、复杂背景下稀有突变检测、核酸拷贝数变异和基因表达量微小差异鉴定方面表现出的优势已被普遍认可。

作者本人从 1993 年即开始 PCR 检测仪器技术研究，并于 1995 年成为国内最早几个 PCR 仪器技术专利的发明人之一；直至今日，在专注 PCR 仪器及试剂系统创新研发的道路上从未停息过。通过和企业持续不间断的产学研合作，研发形成了从样品前处理、核酸提取、普通 PCR 扩增、实时荧光定量 PCR 系统等系列仪器和包含呼吸道、消化道等感染性疾病及肿瘤个体化用药等荧光 PCR 诊断试剂。并在国家自然科学基金委和科技部的持续资助下，在高分辨溶解曲线分析、数字 PCR 等新兴核酸检测和基因分析技术领域开展研究。

数字 PCR 最明显的特点就是无须标准曲线和参照，对影响 PCR 效率的抑制物不敏感，大大提高了检测灵敏度、精确度、准确度和重复性，实现了真正意义上的绝对定量。由于数字 PCR 仪器本身具有相当的技术难度，全世界目前仅有少数几家商业化产品正式推向市场，且尚存在一定的技术缺陷；国内仅有一些关于数字 PCR 的技术和应用研究，成套仪器仍为空白。而关于该技术的相关专业书籍国内外均还没有。作者在 2015 年美国圣地亚哥数字 PCR 技术国际会议参会期间，深深感受到这一技术的发展潜力和在低丰度核酸样本检测的巨大优势，尤其是意识到国内外该技术发展的巨大差距。因此，开始组织团队编著了这本涵盖数字 PCR 原理技术、仪器芯片、数据分析、实验设计和应用发展的专业书籍。旨在将目前数字 PCR 技术的发展现状全方位的呈现给读者，也为我国高端科

学仪器及医学诊断装备的研发、微机电系统、光机电检测系统的微型化和集成化贡献自己微薄的力量。

全书共分 6 章, 其中第 1 章介绍了数字 PCR 技术的发展史和基本分析方法; 第 2 章介绍了现有的数字 PCR 仪器系统并进行了对比分析; 第 3 章描述了数字 PCR 实验设计方法和注意事项; 第 4 章介绍了数字 PCR 实验数据处理方法; 第 5 章介绍了数字 PCR 的应用领域; 第 6 章讨论了数字 PCR 技术与其他基因分析技术的对比和发展方向。

本书既包括目前数字 PCR 技术国内外的发展现状, 也包括作者团队近几年的部分研究成果和实验总结, 以及作者团队对这些技术内容的系统认识和理解。本书的系统内容大多是作者和课题组同事及研究生共同完成, 他们是李政、苗保刚、李明、胡飞、赵书豪、张增明、丁磊、田辉、张萌佳、江蕾等, 作者对他们表示最真挚的感谢!

在本书写作过程中得到了中国工程院蒋庄德院士、解放军总医院丛玉隆教授、王成彬主任、中国食品药品检定研究院高尚先主任和国家卫计委临床检验中心李金明主任的大力支持和鼓励, 蒋院士和李主任还为本书出版写了序。在这里, 作者对他们表示最衷心的感谢!

由于作者水平所限, 书中不足之处在所难免, 热忱希望读者批评指正。



2016 年 10 月 5 日
于西安交通大学

目 录

第1章 数字 PCR 技术概论	1
第一节 引言	1
第二节 数字 PCR 技术的发展历史	2
一、数字 PCR 的萌芽	2
二、数字 PCR 概念的提出	3
三、BEAMing 数字 PCR 技术	4
四、微流体数字 PCR	5
第三节 数字 PCR 数学原理	6
第2章 数字 PCR 系统与发展	9
第一节 商业化平台	9
一、基于集成流路 (IFC) 芯片的数字 PCR 仪器平台	10
二、Constellation 数字 PCR 系统	16
三、Clarity™ 数字 PCR 系统	19
四、基于微孔芯片的数字 PCR 系统	23
五、液滴数字 PCR 系统	31
六、Naica™ 液滴数字 PCR 系统	43
七、数字 PCR 仪器系统对比分析	50
第二节 数字 PCR 芯片与试剂关键技术	54
一、芯片设计与加工	54
二、流体驱动控制	55
三、数字 PCR 试剂	55
第三节 数字 PCR 系统新发展	57
一、旋转圆盘芯片平台	57
二、“滑动芯片”技术	58
三、其他新型技术与平台	62
四、数字 PCR 技术评述与展望	68
第3章 数字 PCR 实验设计	74
第一节 概述	74
一、数字 PCR 实验原理和流程	74
二、数字 PCR 实验参考因素	75

三、数字 PCR 实验设计指南	76
四、数字 PCR 仪器的实验操作	79
第二节 数字 PCR 实验设计分类介绍	83
一、基于数字 PCR 的疾病相关分子标记物检测——液体活检	84
二、基于数字 PCR 的核酸拷贝数变异 (CNV) 及复杂背景下稀有突变检测——应用数字 PCR 的 CNV 分析与稀有突变检测	86
三、基于数字 PCR 的痕量核酸样本精确定量检测——数字 PCR 对 HIV DNA 进行精确定量检测	91
四、基于数字 PCR 对 microRNA 细微差异表达的检测——精确定量唾液中的 miRNA 实现肺癌早期临床诊断	94
五、数字 PCR 实验与实时定量 PCR 实验的对比分析——数字 PCR 与 qPCR 检测拷贝数变异对比分析	96
第三节 数字 PCR 实验常见问题及解决方法	99
第 4 章 数字 PCR 的数学分析和定量特性研究	105
第一节 数字 PCR 定量原理	105
一、基于泊松模型的核酸定量原理	105
二、置信区间和置信度	107
三、反应单元阴阳性的界定	109
第二节 数字 PCR 统计学模型研究	111
一、基于泊松点过程的数字 PCR 分析模型	111
二、多重体积数字 PCR 的数学分析	117
三、数字 PCR 和实时 PCR 用于 CNV 检测的比较研究	119
第三节 数字 PCR 的定量特性研究	123
一、数字 PCR 的动态范围、精度、灵敏度相关研究	123
二、数字 PCR 检测结果不确定度研究	129
第 5 章 数字 PCR 的应用	134
第一节 数字 PCR 应用特点	134
第二节 数字 PCR 在基因组学研究中的应用	136
一、基因表达分析	136
二、基因突变检测	140
三、甲基化水平分析	144
第三节 数字 PCR 技术在转化医学和精准医疗中的应用	146
一、肿瘤个体化诊疗	147
二、疾病超早期诊断——“液体活检”	150
三、无创产前检查	153
四、病原微生物检测和其他疾病防控	158

第四节 数字 PCR 技术在食品安全检测中的应用	161
一、转基因成分检测	162
二、动物源性检测	165
第五节 数字 PCR 技术在环境微生物检测中的应用	168
第六节 数字 PCR 技术的其他应用	170
一、测序文库质控和测序结果验证	171
二、基因编辑	173
第七节 数字 PCR 技术应用发展趋势	176
第 6 章 数字 PCR 与其他基因分析技术的对比及其未来	181
第一节 数字 PCR 与其他基因分析技术的对比和融合	181
一、数字 PCR 与其他 PCR 技术	181
二、杂交技术与数字 PCR	182
三、测序技术与数字 PCR	183
四、评估基因分析技术的一些重要指标	185
第二节 数字 PCR 技术的发展与未来	186
一、数字 PCR 技术自身的发展	186
二、数字 PCR 思想的延伸与应用	187
三、数字 PCR 与生命“大数据”	188

第 1 章

数字 PCR 技术总论

第一节 引言

1953 年沃森和克里克提出 DNA 双螺旋结构及半保留复制模型, 开启了现代生命科学和分子生物学的大幕。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术与分子克隆、DNA 序列分析是整个现代分子生物学研究的基础, 而“如何识别未知核酸序列”和“如何定性定量地检测目标核酸分子”成为分子生物学研究和应用要解决的两个核心问题。

1985 年美国科学家 Kary Mullis 发明的聚合酶链反应 (PCR) 技术, 实现了研究人员梦寐以求的体外无限扩增核酸片段的愿望。这使微量核酸 (DNA 或 RNA) 操作变得简单易行, 同时还可以使核酸研究脱离活体生物。Kary Mullis 也因此获得了 1993 年的诺贝尔化学奖。1988 年 Saiki 等从美国黄石国家森林公园温泉中分离的一株水生嗜热杆菌中提取得到一种耐热 DNA 聚合酶, 从此不必在每次扩增反应后再加新酶, 极大地提高了 PCR 扩增的效率, 这使得 PCR 方法得到了广泛的应用。PCR 扩增技术为研究和解决前述 2 个核心问题奠定了基础。

从 1985 年至今的 30 多年时间里, PCR 分析经历了 3 代技术的发展。最传统的“第一代 PCR”分析技术采用凝胶电泳的方法进行 PCR 产物的定性分析和研究, 但它存在操作烦琐、交叉污染风险大等不足。之后又发展了 PCR 产物的终点荧光定性分析的方法, 但这些技术都无法实现靶基因的定量检测。

为了避免传统 PCR 的缺陷, 并对 PCR 扩增产物或基因的表达水平进行定量分析, 1992 年诞生了“第二代 PCR”分析技术——实时荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR (real-time quantification PCR) 在聚合酶链反应“变性—退火—延伸”扩增过程的“延伸”段, 对荧光探针标记的靶基因荧光信号进行实时采集, 通过 3 个参数 (荧光信号 -Ct 值 - 靶基因的起始浓度) 间的关系, 最终确定靶基因的拷贝数或基因的表达水平。荧光定量 PCR 与反转录技术结合 (RT-qPCR), 还可以实现 RNA 的定量检测和基因表达分析。实时荧光定量 PCR 极大地扩展了 PCR 技术在整个生命科学的研究与应用, 例如, 感染性疾病、肿瘤、遗传性疾病、移植配型、个性化用药等众多医学领域。尤其是在临床医学检验和食品安全检测等领域迅速发展, 成为许多病原微生物诊断的金标准。但由于定量 PCR 的绝对定量分析结果最终依赖于 Ct 值和标准曲线, 这是其最大的技术瓶颈, 所以在某种意义上所谓的“定量”也只是相对的。而且在低拷贝靶基因分子、模板浓度差异细微的条件下, 其检测灵敏度、精确度和分辨率都受到了限制。

在低丰度检测、稀有突变检测等日益增大的应用需求背景下, 随着微流控和 MEMS 技术和工艺的成熟, “第三代 PCR”分析技术——数字 PCR 技术应运而生。

数字 PCR (digital PCR, dPCR) 技术是一种核酸分子绝对定量技术。它将一个荧光定量 PCR 反应体系分配到大量微小的反应器中, 在每个微反应器中包含或不包含 1 个或多个拷贝的目标核酸分子 (DNA 模板), 进行“单分子模板 PCR 扩增”。扩增结束后, 通过阳性反应单元 (通过终点荧光信号判断) 的数目和统计学方法计算原始样本中靶基因的拷贝数。

数字 PCR 无须依赖于对照样品和标准曲线就可以进行精确的绝对定量检测。此外, 由于数字 PCR 在进行结果判读时仅判断“有/无”两种扩增状态, 因此也不需要检测荧光信号与设定阈值线的交点, 完全不依赖于 Ct 值的鉴定。所以, 数字 PCR 反应和结果判读受扩增效率的影响大大降低, 对 PCR 反应抑制物的耐受能力大大提高; 数字 PCR 实验中标准反应体系分配的过程可以极大程度上降低与目标序列有竞争性作用的背景序列浓度, 因此, 数字 PCR 技术也特别适合在复杂背景中检测稀有突变。

由于数字 PCR 具有比传统荧光定量 PCR 更加出色的灵敏度、特异性和精确性, 它在极微量核酸样本检测、复杂背景下稀有突变检测、表达量微小差异鉴定和拷贝数变异检测等方面表现出的优势已被普遍认可, 而其在基因表达研究、miRNA 研究、基因组拷贝数鉴定、癌症标志物稀有突变检测、致病微生物鉴定、转基因成分鉴定、单细胞基因表达、NGS 测序文库精确定量与结果验证等诸多方面具有的广阔应用前景, 已经受到越来越多的关注。

从凝胶电泳的定性分析, 到“相对定量”的实时荧光 PCR, 再到数字 PCR 的“绝对定量”分析, 三代 PCR 分析技术都是为了解决“如何定性定量地检测目标核酸分子”这一核心问题, 而无疑数字 PCR 技术是目前最精准、最灵敏的技术手段。

第二节 数字 PCR 技术的发展历史

尽管直到 1999 年, 霍普金斯大学的 Kinzler 和 Vogelstein 在 PNAS 发表题为“Digital PCR”的文章中首次明确定义数字 PCR 的概念, 但是该方法已经以“单分子 PCR”或“有限稀释 PCR”的名义经历了 10 余年的发展, 不过早期的科学家将注意力主要集中在单分子目标 DNA 的 PCR 扩增上而不是扩增后的信号处理及定量分析上。

一、数字 PCR 的萌芽

早在 1988 年 PCR 技术的发明人 Kary Mullis 在 *Science* 上发表文章指出: β -globin 基因的含量从没有稀释的常规 DNA 样品中 1 个基因组中有 1 个拷贝, 稀释到 10^6 个基因组中只有 1 个拷贝, 经过 40 个 PCR 循环过程 β -globin 基因都能够扩增到可以检测到的数量。1990 年耶鲁大学医学院的 Claiborne Stephens 等应用单分子稀释 (single molecular dilution, SMD) PCR 和泊松统计的方法研究单倍体 DNA。

1992 年, 南澳洲弗林德斯医学中心的科学家 Sykes 等描述了基于样品有限稀释、PCR 和泊松分布数据校正模型的定量方法。采用两步 PCR (巢式 PCR) 检测复杂背景下低丰度的免疫球蛋白重链 (IgH) 突变基因, 并进行了极其精细的定量研究, 虽然当时这

种方法并没有被冠以“数字 PCR”之名，但是建立了数字 PCR 基本的实验流程，并提出了数字 PCR 检测中一个极其重要的原则——以“终点信号的有或无”（All-or-none end point）作为判断标志。

二、数字 PCR 概念的提出

到了 1999 年，Kinzler 和 Vogelstein 等提出了数字 PCR 的概念，并在 96 孔板和 384 孔板中进行结肠癌的致癌突变基因 Kras 的定量分析。如图 1-1A 所示，数字 PCR 可以包括 2 个部分。首先，DNA 模板被稀释到平均每 2 个反应孔内有 1 个拷贝的浓度，并在经过优化的实验条件下进行 PCR 扩增；其次，通过加入荧光探针，针对每个孔的荧光信号进行分析，以判断 PCR 扩增产物中是否存在野生型和突变型序列及对应的比率关系。鉴于突变类型的多样化，为简化实验过程，他们设计了 2 种带有不同荧光基团的分子信标探针分别与 PCR 产物杂交，其中一种探针作为对照可以与野生型和突变型 2 种产物杂交，另一种探针只能与野生型序列杂交，通过检测每个孔内的荧光信号就可以得到同一样品中等位基因（野生型与突变型）的数目和比值，并利用统计学方法分析样品间的显著性差异。图 1-1B 展示了利用分子信标法进行基因突变分析的原理，通过一对通用引物得到包括野生型和突变型在内的 PCR 产物，再经过不对称 PCR（asymmetric PCR）得到单链 DNA 分子与 2 种荧光分子信标分别杂交，利用荧光颜色区别野生型和突变型，通过具有不同荧光反应单元数量的多少和比率进行分析。

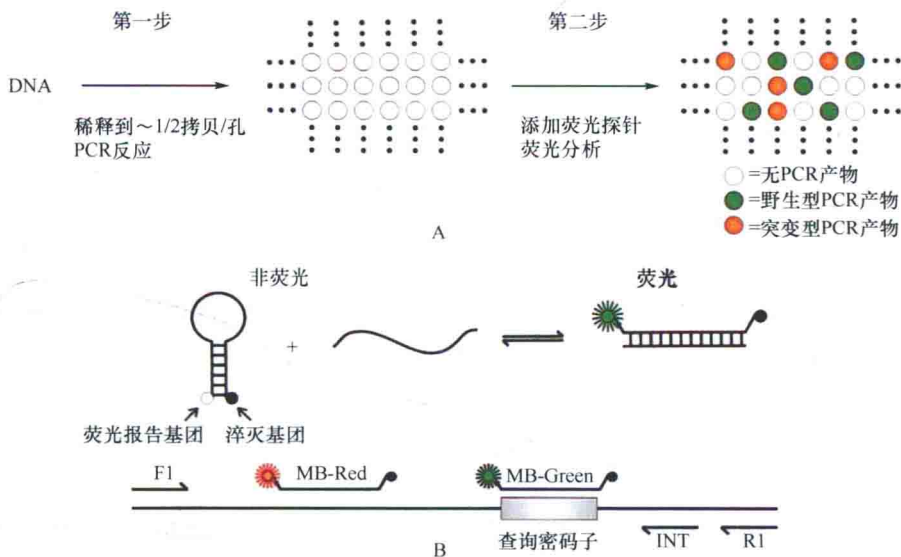


图 1-1 数字 PCR 技术原理

A. 数字 PCR 过程：第一步稀释样本并分配至每个反应单元进行 PCR 反应，第二步荧光分析；B. 分子信标基因突变分析原理

Kinzler 和 Vogelstein 的原始“数字 PCR”方法是一项单调乏味、需要手工操作的工作。虽然结果表明数字 PCR 是“一种非常强大、可信和准确的”稀有突变检测方法，但它也是劳动密集型的技术，难以广泛应用。

三、BEAMing 数字 PCR 技术

2003 年, Dressman 等提出了一种基于磁珠和微乳液的固相数字 PCR 方法——BEAMing 技术基于 4 个主要组分——珠子 (beads)、乳浊液 (emulsion)、扩增 (amplification) 与磁性 (magnetics), 原理如图 1-2 所示。BEAMing 技术将 DNA 模板与连接引物的磁珠以极低的浓度 (比如单拷贝) 包裹在油水两相形成的纳升至皮升级液滴中进行 PCR 扩增, 扩增产物富集在磁珠表面, 破乳收集后进行检测分析, 其具体步骤如下。

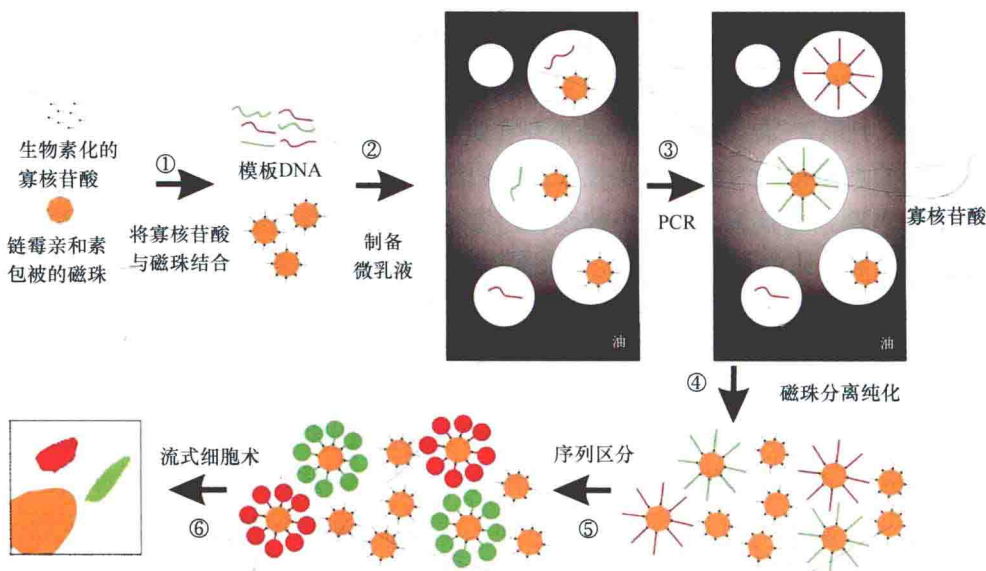


图 1-2 BEAMing 技术的原理

1. 将链霉亲和素与磁珠共价结合, 并在磁珠表面包被一层生物素化的寡核苷酸。
2. 将包含磁珠和 DNA 模板及 PCR 扩增所需成分的水溶液与油相混合搅拌, 制备出微乳液。
3. 当磁珠与 DNA 模板在一个微乳滴中同时存在时, 磁珠表面结合的寡核苷酸将作为引物参与 PCR 扩增, 野生型和突变型 DNA 模板将在磁珠表面进行复制。
4. 扩增结束后进行破乳, 利用磁性分离纯化磁珠。
5. 变性后, 将磁珠孵育在能够区分不同 DNA 模板序列的寡核苷酸探针中, 然后利用荧光标记的抗体对磁珠上结合的杂交探针进行标记, 可以使含有 PCR 扩增产物的磁珠在激光激发后能够发出红色或绿色荧光。
6. 最后利用流式细胞技术对磁珠进行荧光计数。

随后, Vogelstein 等对 BEAMing 技术进行了适当调整, 以满足低丰度基因突变检测与定量分析的需求, 其具体过程如图 1-3 所示。首先对血浆中分离和纯化的 DNA 片段进行预扩增反应, 并在扩增引物中加入已知的标记序列, 完成目的基因片段的富集与标记, 然后依次进行乳化、磁珠表面的扩增和破乳及磁珠富集等过程, 最后通过单碱基延伸完成荧光的标记并利用流式细胞技术对磁珠进行荧光统计分析。