

· 综述 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.22.047

## 微滴式数字聚合酶链反应在传染病检测中的应用\*

计震华<sup>1,2</sup>,戴熙廷<sup>1,2</sup>,简苗苗<sup>2,3</sup>,白若兰<sup>2,3</sup>综述,宝福凯<sup>1,2,4△</sup>,柳爱华<sup>2,3,4▲</sup>审校  
昆明医科大学:1.病原生物学与免疫学系;2.云南省高校热带传染病重点实验室;  
3.生物化学与分子生物学系;4.热带医学研究所,云南昆明 650500

关键词:微滴式数字聚合酶链反应; 传染病; 分子检测

中图分类号:Q331

文章编号:1672-9455(2019)22-3379-04

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



1999年,VOGELSTEIN等<sup>[1]</sup>正式提出了数字聚合酶链反应(dPCR)的概念。目前,dPCR主要分为3类:微反应室/孔板数字PCR、微流控芯片数字PCR和微滴式数字聚合酶链反应(ddPCR)<sup>[1-3]</sup>。其中,ddPCR是利用微滴发生器将反应体系一次性生成单分子水平的油包水微滴,再独立地进行循环扩增反应,扩增结束后分别对每个反应单元的荧光信号进行采集,有荧光信号的标记为“1”,无荧光信号的标记为“0”,使用泊松概率分布函数进行计算,最终得出反应体系最初的DNA拷贝量。ddPCR与实时荧光定量PCR(qPCR)采用相同的引物及探针,通过有限稀释法和泊松分布原理直接定量分析,计算出DNA水平。这种技术无须依赖标准曲线和循环阈值(Ct值),并且检测下限可低至单拷贝而达到真正意义上的绝对定量。ddPCR已被运用于低丰度和复杂来源的病原微生物核酸检测、肿瘤标志因子检测、拷贝数变异分析、microRNA表达分析和无创产前检测等众多领域<sup>[4-7]</sup>。

## 1 ddPCR的原理

ddPCR与普通定量PCR最大的区别在于:前者在反应前使用油包水乳化和微流体技术对样品进行微滴化处理,它将含有目的基因的反应体系有限稀释为大量油包水微滴,使每个微滴成为彼此独立的PCR反应体系,且每个微滴不包含待检基因或只含1个到数个待检基因。微滴经PCR反应仪扩增后,光路检测系统对其逐个扫描,读取结果,以出现荧光信号标记为“1”,未出现荧光信号标记为“0”,最后采用泊松分布公式进行校正,计算后得出结果。

ddPCR相较于传统PCR,其最大优势为它不依赖Ct值和标准曲线,而是直接计算模板中的拷贝数,实现真正意义上的绝对定量和绝对检测精度<sup>[8]</sup>。在对反应前体系进行稀释的同时,也稀释了PCR抑制剂,从而减少了背景干扰并使反应体系对PCR抑制剂高度耐受。另外,ddPCR数字化终点信号的读取方式大大降低了定量结果的偏倚<sup>[9]</sup>。ddPCR具有高特异性、高精确度和高敏感性等优点,使其能快速被市场

所接受,实现商业化。目前常见的ddPCR仅有Bio-Rad公司的QX100和QX200数字PCR仪和RainDance公司的Raindrop数字PCR仪,其中QX200 ddPCR仪以逐年增长趋势成为运用较广的平台<sup>[10]</sup>。

## 2 ddPCR在传染病检测中的运用

## 2.1 病毒性传染病

2.1.1 获得性免疫缺陷综合征 人类免疫缺陷病毒(HIV)是造成获得性免疫缺陷综合征的一种慢病毒,早在20世纪就有研究提出,通过对HIV病毒载量的定量检测,可预测患者病变的进程和评价药物疗效<sup>[11]</sup>。除了抗病毒治疗外,HIV病毒载量检测技术还运用于窗口期检测疑似病例,不仅可缩短窗口期检测时间,还可大大减少检测费用。HIV病毒载量检测已被广泛运用于临床HIV的检测,而qPCR是目前检测的标准方法。近年,ddPCR以其高精度、重现性和对目的基因的高耐受性等突出优点被运用于HIV病毒载量检测<sup>[10]</sup>。ddPCR还可用于HIV感染者早期治疗效果判断、治疗性接种HIV疫苗监测、异体干细胞移植治疗HIV疗效监测和延迟反转录治疗HIV疗效监测等<sup>[11]</sup>。

2.1.2 病毒性肝炎 病毒性肝炎是由肝炎病毒引起的以肝脏病变为主的一种传染病。早期ddPCR被运用于乙型肝炎病毒(HBV)等肝炎病原体的定量检测。之后,研究者利用ddPCR定量检测在HBV复制感染过程中有重要意义的超螺旋共价、闭合、环状DNA分子(cccDNA),以实现对抗HBV感染抗病毒治疗的监控<sup>[12]</sup>。MUKAIDE等<sup>[13]</sup>利用ddPCR对目的基因扩增数目的敏感性、特异性较高这一特点用于检测基因突变序列,发现ddPCR可定量检测丙型肝炎病毒(HCV)感染中的基因组突变,这也提示可将ddPCR用于定量检测其他多态性病毒基因组的改变。

2.1.3 流行性感(流)感 流感呈全球性分布,是发病率较高的传染病。流感病毒属于正黏液病毒科,是造成人类和动物患流感的RNA病毒。我国是流感高发区和病毒易变异区,目前检测流感的方法有病毒

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(31560051,81560596,81060134,81371835);云南省自然科学基金项目(2017FE467-001);云南省教育厅科学研究基金项目(2018Y038,2018Y039)。

△ 通信作者,E-mail:baofukai@126.com。 ▲ 通信作者,E-mail:lunaliu123@yahoo.com.cn。

分离鉴定、免疫学检测和流感病毒核酸检测等,但以上方法不易检测出新型变异的流感病毒,而使用 ddPCR 对流感病毒缺陷干扰(DI)颗粒进行检测,可对 DI 颗粒造成的流感病毒表现型变异进行监控<sup>[14]</sup>。在新型流感病毒 H7N9 的治疗中,ddPCR 对病毒载量的持续性监测为临床治疗提供了更多的参考<sup>[15]</sup>。

**2.1.4 巨细胞病毒感染** 人巨细胞病毒(HCMV)感染在我国较为常见,其导致的患者宫内感染是造成流产、死胎以及胎儿先天性智障的一个重要原因,也是免疫力缺陷患者死亡的主要因素。ddPCR 具有较高的敏感性,并且能降低假阴性率<sup>[16]</sup>。有研究发现,使用 3 种不同检测试剂和 2 台 PCR 仪检测 HCMV 病毒载量,结果证明在不依赖标准曲线进行绝对定量的情况下,ddPCR 可以实现不同实验室之间的结果互用<sup>[17]</sup>。

**2.1.5 其他病毒性传染病** 随着 ddPCR 越来越多地被运用到病毒性传染病检测中,检测目的也拓展到更多的领域。经伊蚊叮咬和接触隐性感染者为登革病毒的主要传染途径。因此,登革病毒的连续监控变得尤为重要。研究表明,在登革病毒连续性监控中,ddPCR 明显优于 qPCR<sup>[18]</sup>,表明该技术在疫苗研制、生产中有较高的应用潜力。在此之前,WU 等<sup>[19]</sup>已经发现 ddPCR 对流行性乙型脑炎这种起病急、病程重、预后差的传染病,能起到早发现的作用。

## 2.2 细菌性传染病

**2.2.1 伤寒** 伤寒是最常见的食源性传染病,其病原体——伤寒沙门菌在自然界中生存力极强,可在水和粪便中存活较长时间,在牛奶中既能生存,又能繁殖。肥达试验是伤寒杆菌的经典检测方法,但是近年由于细菌亚型增多和耐药性增加,其检测阳性率逐渐下降。另外,细菌培养这一金标准存在培养时间长和操作烦琐等问题。面对这些亟待解决的问题,分子检测技术开辟了一条新的途径,目前常用的检测方法有 PCR 法、基因芯片法、qPCR、环介导恒温核酸扩增法等。ddPCR 作为新兴的核酸检测技术也被运用于伤寒沙门菌检测中,其抗 PCR 抑制剂的特点使其更适用于检测标本来源复杂的食源性传染病<sup>[20]</sup>。

**2.2.2 结核** 耐多药结核病(MDR-TB)是指结核分枝杆菌至少同时对两种一线抗结核药物耐药,它的出现给全球抗结核工作带来了新的挑战。多项研究提示,于疾病早期快速检测出耐药基因对 MDR-TB 的治疗具有重要意义,现有的多种检测技术可用于检测结核的耐药性,大部分都基于基因分子检测技术<sup>[21]</sup>。其中 dPCR 可以检出 0.1% 的亚型菌株,早期耐药菌株的检出可以提示临床采用针对性的治疗方案,阻止病情恶化和阻断疾病传播,在治疗期间也可通过检测载菌量评估结核治疗结果<sup>[22-23]</sup>。

**2.2.3 细菌感染性腹泻** 大肠埃希菌是肠道正常菌群之一,但仍存在少数致病血清型,致病型大肠埃希菌可引起人畜腹泻或败血症。肠出血性大肠埃希菌(EHEC)通过污染食物、水源而导致感染性腹泻,使用 ddPCR 可以提高食物中该菌的检测阳性率<sup>[24]</sup>。由于微

滴化的处理使背景干扰大大降低,可以直接从人或牲畜粪便标本中确定 EHEC 的血清型,这一检测方法能进一步控制污染源,防止大规模疾病暴发、流行<sup>[25]</sup>。

**2.2.4 沙眼衣原体(CT)感染** CT 感染人体后可引起沙眼、包涵体结膜炎、宫颈炎等多种疾病,是最常见的引起感染性致盲和性传播疾病的病原体。及时获取 CT 的 RNA 载量,在预防疾病感染的同时,也可以监控给药情况,减少非必要药物的使用<sup>[26]</sup>。ddPCR 不仅能快速获取 CT 的 RNA 载量,还能很好地监控疾病预后。新技术的运用对衣原体的感染从预防、治疗到预后都体现出绝对定量的优势,提示 ddPCR 可作为一种补充检测方法运用于衣原体诊断<sup>[27]</sup>。

**2.3 寄生虫类传染病** 世界六大热带传染病中绝大部分为寄生虫感染,寄生虫类传染病感染成为热带、亚热带国家所面临的一个主要的公共卫生问题。镜检是检测寄生虫感染的常规方法,但是其弊端较多,在低水平标本中易出现假阴性结果。ddPCR 作为一种使用前景广阔的检测技术,被广泛报道用于检测寄生虫感染。鉴别诊断淋巴丝虫病的主要病原体班氏丝虫和马来丝虫对疾病用药和治疗有着重要的意义,使用双通道 ddPCR 可快速、精确地鉴定病原体类型,有助于监控大规模药物治疗后该病的流行趋势<sup>[28]</sup>。在低丰度疟原虫感染中,ddPCR 检测疟原虫的结果更加精准,检测数据可以在不同实验室之间直接比较<sup>[29]</sup>。可通过 duplex-ddPCR 对日本血吸虫线粒体基因直接检测,从而实现无细胞 DNA 检测。除此之外,还可使用粪便、尿液、唾液和血清这些易获取的标本对血吸虫的感染进程进行监测<sup>[30]</sup>。

## 3 分析与展望

自从 20 世纪 PCR 问世以来,该技术就迅速成为生命科学中最常见的检测方法之一。第一代是定性 PCR,它对靶基因进行扩增,得到的扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行分析。第二代为 qPCR,它通过在反应体系中加入能指示反应进程的荧光试剂来实时监测扩增产物的积累,借助荧光曲线的 Ct 值来定量起始靶基因的水平。第三代 PCR 是一种全新的、对核酸进行检测和定量的方法,它采用直接计数目标分子的方式而不依赖于任何校准物或标记物,可确定低至单拷贝水平的待检靶分子的绝对数目。第三代技术很大程度上弥补了前两代技术的不足。第三代 PCR 更适合于罕见的单核苷酸突变检测,对影响扩增效率的各种因素(如 PCR 抑制剂)更耐受,可以在野生型大背景序列中高度特异地检测到罕见突变。

ddPCR 作为第三代 PCR 中较常用的技术已广泛运用于生命科学研究和临床等诸多领域,并取得了大量成果。虽然 ddPCR 的应用大多集中于癌症领域,但是近年其在传染病领域也取得了多项研究成果(表 1)。传染病相关的病原微生物种类复杂,其中包含了细菌、病毒、真菌、衣原体、支原体、立克次体、螺旋体和寄生虫。目前,ddPCR 在传染病研究中的应用主要集中在常见且危害性较大的几种疾病,研究的深度和

广度还有待进一步提高。病毒性传染病分布广泛、具有高度变异性和侵袭性,致使特效药物失效、预防难度加大。过去核酸定量技术检测精度有限,使检测的病毒载量受到限制,然而新技术的运用打破了这一局面。ddPCR 的高精准绝对定量在早期感染检测、治疗效果监控、病毒表型变异监控等方面都显现出明显优势,甚至能检测低丰度和背景复杂的标本,为病毒性传染病的药物研发和预防提供了技术支持。同样,抗菌药物耐药现象的出现给细菌性传染病的治疗带来了极大的挑战。但是,ddPCR 的运用使研究者能更好地了解抗菌药物的耐药机制,以及病原体的来源和分布,有利于更好地选择治疗药物、更早地控制传播范围和完美对疾病的管理等。另外,寄生虫类传染病易发生重复感染,而低丰度检测可以很好地检测出低水平样本,缩短窗口期。ddPCR 还可以实现不同实验室之间结果的直接对比,有利于不同地区间对传染病的监控。

表 1 ddPCR 在病原体检测中的运用

病原微生物	运用
病毒	
HIV	病毒载量检测、诊断治疗
肝炎病毒	定量检测、治疗监测、多态性基因检测
流感病毒	DI 颗粒检测、持续性监测及治疗
HCMV	病毒载量检测
登革病毒	持续性监测、疫苗研发
乙型肝炎病毒	鉴别诊断
细菌	
伤寒沙门菌	低丰度检测
结核分枝杆菌	检测载菌量、诊断及治疗
大肠埃希菌	食品污染检测
沙眼衣原体	检测载菌量、诊断治疗
寄生虫	
班氏丝虫、马来丝虫	鉴别诊断
疟原虫	低丰度检测
日本血吸虫	无细胞 DNA 检测、诊断及治疗

从既往的研究中可以看出,ddPCR 对传染病检测的效能优于传统 qPCR,但仍存在一些问题,如阈值的确定、易出现假阳性、标本水平不能过高、检测成本高等。尽管目前大部分研究都对 ddPCR 抱有积极态度,认为它是极具前景的一项技术,但是还有少数研究者认为其仅仅是对以往的 qPCR 的改进,并不足以替代经典 PCR,只能作为补充技术运用。

综上所述,本文认为 ddPCR 是一项前景广阔的新兴技术。特别是在检测传染病中,其对低丰度病原体更敏感,对检测环境有高耐受力,对复杂的标本有更好的分析力,并且不依赖标准曲线的绝对定量体系,使检测结果在不同实验室之间直接比较成为可能。除此之外,ddPCR 还能用于传染病传播控制和流行病学调查。随着研究不断地深入,新一代 PCR 技术能更好地运用在更多传染病检测中。

参考文献

[1] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR[J]. PNAS,

1999,96(16):9236-9241.  
 [2] OTTESEN E A, HONG J W, QUAKE S R. Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria[J]. Science, 2006, 314(584):1464-1467.  
 [3] HINDSON B J, NESS K D, MASQUELIER D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. Anal Chem, 2011, 83(22):8604-8610.  
 [4] WANG Y, COOPER R, BERGELSON S, et al. Quantification of residual BHK DNA by a novel droplet digital PCR technology[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 159:477-482.  
 [5] NAJIM O, HUIZING M, PAPADIMITRIOU K, et al. The prevalence of estrogen receptor-1 mutation in advanced breast cancer: the estrogen receptor one study (EROS1) [J]. Cancer Treat Res Commun, 2019, 19:e100123.  
 [6] LAPROVITERA N, GRZES M, PORCELLINI E, et al. Cancer site-specific multiple microRNA quantification by droplet digital PCR[J]. Front Oncol, 2018, 8:447-452.  
 [7] TAN C, CHEN X, WANG F, et al. A multiplex droplet digital PCR assay for non-invasive prenatal testing of fetal aneuploidies[J]. Analyst, 2019, 144(7):2239-2247.  
 [8] SELVARAJ V, MAHESHWARI Y, HAJERI S A, et al. Development of a duplex droplet digital PCR assay for absolute quantitative detection of “Candidatus Liberibacter asiaticus” [J]. PLoS One, 2018, 13(5):e0197184.  
 [9] HUI L S, BEARD S, HANNAN N J. Measuring fetal brain and lung transcripts in amniotic fluid supernatant: a comparison of digital PCR and RT-qPCR methods[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2018, 31(23):3191-3196.  
 [10] RUTSAERT S, BOSMAN K, TRYPSTEEN W, et al. Digital PCR as a tool to measure HIV persistence[J]. Retrovirology, 2018, 15(1):16-23.  
 [11] FAHEY J L, TAYLOR J M, MANNA B, et al. Prognostic significance of plasma markers of immune activation, HIV viral load and CD4 T-cell measurements[J]. AIDS, 1998, 12(13):1581-1590.  
 [12] MU D, YAN L, TANG H, et al. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system[J]. Biotechnol Lett, 2015, 37(10):2063-2073.  
 [13] MUKAIDE M, SUGIYAMA M, KORENAGA M, et al. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70 [J]. J Virol Methods, 2014, 207(1):169-177.  
 [14] SCHWARTZ S L, LOWEN A C. Droplet digital PCR: a novel method for detection of influenza virus defective interfering particles [J]. J Virol Methods, 2016, 237(1):159-165.  
 [15] YAN Y, JIA X J, WANG H H, et al. Dynamic quantification of avian influenza H7N9(A) virus in a human infection during clinical treatment using droplet digital PCR [J]. J Virol Methods, 2016, 234(1):22-27.  
 [16] SEDLAK R H, COOK L, CHENG A, et al. Clinical utili-

- ty of droplet digital PCR for human cytomegalovirus[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(8): 2844-2848.
- [17] HAYDEN R T, GU Z, SAM S S, et al. Comparative performance of reagents and platforms for quantitation of cytomegalovirus DNA by digital PCR[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(10): 2602-2608.
- [18] ABACHIN E, CONVERS S, FALQUE S, et al. Comparison of reverse-transcriptase qPCR and droplet digital PCR for the quantification of dengue virus nucleic acid [J]. Biologicals, 2018, 52(1): 49-54.
- [19] WU X L, LIN H, CHEN S J, et al. Development and application of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for sensitive and rapid detection of Japanese encephalitis virus[J]. J Virol Methods, 2017, 248(1): 166-171.
- [20] WANG M, YANG J J, GAI Z T, et al. Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of Salmonella typhimurium in milk[J]. Int J Food Microbiol, 2018, 266(1): 251-256.
- [21] TRAMONTANA A R, LESLIE D E, NOLAN A, et al. Pulmonary extensively drug-resistant tuberculosis in Melbourne: local control of a global health challenge[J]. Med J Aust, 2018, 208(10): 427-429.
- [22] PHOLWAT S, STROUP S, FOONGLADDA S, et al. Digital PCR to detect and quantify heteroresistance in drug resistant mycobacterium tuberculosis [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57238.
- [23] SONG N, TAN Y, ZHANG L Y, et al. Detection of circulating Mycobacterium tuberculosis-specific DNA by droplet digital PCR for vaccine evaluation in challenged monkeys and TB diagnosis[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 1-9.
- [24] MCMAHON T C, BLAIS B W, WONG A, et al. Multiplexed single intact cell droplet digital PCR (MuSIC ddPCR) method for specific detection of enterohemorrhagic E. coli (EHEC) in food enrichment cultures[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 332-341.
- [25] PAQUETTE S J, STANFORD K, THOMAS J, et al. Quantitative surveillance of shiga toxins 1 and 2, Escherichia coli O178 and O157 in feces of western-Canadian slaughter cattle enumerated by droplet digital PCR with a focus on seasonality and slaughterhouse location [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195880.
- [26] BUTCHER R, HOUGHTON J, DERRICK T, et al. Reduced-cost Chlamydia trachomatis-specific multiplex real-time PCR diagnostic assay evaluated for ocular swabs and use by trachoma research programmes [J]. J Microbiol Methods, 2017, 139(1): 95-102.
- [27] SCHACHTER J. Will droplet digital PCR become the test of choice for detecting and quantifying ocular chlamydia trachomatis infection? Maybe not [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2013, 13(8): 789-792.
- [28] JONGTHAWIN J, INTAPAN P M, LULITANOND V, et al. Detection and quantification of Wuchereria bancrofti and Brugia malayi DNA in blood samples and mosquitoes using duplex droplet digital polymerase chain reaction [J]. Parasitol Res, 2016, 115(8): 2967-2972.
- [29] KOEPFLI C, NGUITRAGOOL W, HOFMANN N E, et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 39183.
- [30] WEERAKOON K G, GORDON C A, WILLIAMS G M, et al. Droplet digital PCR diagnosis of human schistosomiasis: parasite Cell-Free DNA detection in diverse clinical samples [J]. J Infect Dis, 2017, 216(12): 1611-1622.

(收稿日期: 2019-02-16 修回日期: 2019-05-16)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.22.048

## 免疫层析试纸条检测技术的研究进展\*

周梦婕<sup>1,3</sup>, 李小盼<sup>2</sup>, 代荣阳<sup>1</sup>综述, 阎锡蕴<sup>3△</sup>, 段德民<sup>2,3▲</sup>审校

1. 西南医科大学生物化学与细胞生物学系, 四川泸州 646000; 2. 吉尔生物科技(天津)有限公司, 天津 300270; 3. 中国科学院生物物理研究所蛋白质与多肽药物实验室, 北京 100101

**关键词:** 免疫层析; 胶体金试纸条; 荧光试纸条; 纳米酶试纸条

**中图分类号:** R446.1; R446.6

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-9455(2019)22-3382-05

免疫层析试纸条检测技术是 20 世纪 70 年代兴起的适用于患者床旁检测或家庭检测的检验技术, 相较于酶联免疫吸附试验(ELISA), 其具有普适性、快捷性等优点。免疫层析试纸条检测技术具有操作简便、结果快速且稳定、不需要大型设备及成本低廉等

优点, 因此在临床诊断等领域迅速普及。免疫层析试纸条检测技术随着纳米标记材料的不断进步(从胶体金到荧光微球、量子点, 再到纳米酶)而不断发展, 展现出巨大的潜能。免疫层析试纸条的应用范围也从生物大分子检测扩展到环境监测、食品卫生检测、疾

\* 基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX10101004002004); 北京市自然科学基金面上项目(7162126); 北京市现场物证检验工程技术研究中心开放课题(2016CSEKFKT04)。

△ 通信作者, E-mail: yanxy@ibp.ac.cn; ▲ 通信作者, E-mail: dmduan@ibp.ac.cn。