

· 综 述 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.18.024

数字 PCR 技术及其在临床检验中的研究进展*

周小匀,周 琰 综述,郭 玮[△] 审校

复旦大学附属中山医院检验科,上海 200032

摘要: 数字聚合酶链反应(dPCR)技术是一种新的分子诊断技术,相比实时荧光定量 PCR(qPCR),它有着更高的精度、灵敏度和特异性。dPCR 目前在生物医学领域已经获得了广泛的应用,如病原体与拷贝数变异检测、miRNA 与单细胞基因表达分析、下一代测序和染色体异常检测等。该文立足于临床检验应用,概述了 dPCR 技术的原理与分类,并将其与 qPCR 和下一代高通量测序(NGS)技术进行了比较分析,介绍了 dPCR 在临床检测中的技术发展及最新成果,探讨了其在临床实际应用中面临的挑战和发展前景。

关键词: 数字 PCR; 实时荧光定量 PCR; 下一代测序

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)18-2738-06

Digital PCR technology and its research progress in clinical testing*

ZHOU Xiaoyun, ZHOU Yan, GUO Wei[△]

Department of Clinical Laboratory, Affiliated Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Digital polymerase chain reaction (dPCR) technology is a new molecular diagnostic technique with higher precision, sensitivity and specificity than real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR). dPCR has now gained the wide application in biomedical fields, such as pathogen detection, copy number variation detection, miRNA and unicellular gene expression analysis, next-generation sequencing and chromosome abnormality detection, etc. Based on clinical testing applications, this paper outlines the principles and classification of dPCR technology and conducts the comparative analysis between this technology with qPCR and next-generation high-throughput sequencing (NGS) technologies. Then this paper introduces the technical development and latest achievements of dPCR in clinical testing, and discuss its facing challenges and development prospects in the clinical practical application.

Key words: digital polymerase chain reaction; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; next generation sequencing

聚合酶链反应(PCR)是一种用于体外扩增和检测低浓度核酸的技术,它可以从少量的起始材料中产生几百万份特定的 DNA 片段的拷贝,目前在分子生物学领域有着非常广泛的应用。传统的终点 PCR 只能提供相对和定性结果,后续的第二代 PCR——实时荧光定量 PCR(qPCR)通过荧光探针或染料进行靶向扩增实现了定量检测,但由于荧光基线估计误差和 qPCR 扩增效率导致的扩增偏差问题,仍然无法提供准确的绝对结果。

1992 年 SYKES 等建立了数字 PCR(dPCR)的基本实验流程之后,“第三代 PCR”——dPCR 技术迅速发展起来并日趋成熟。2003 年, DRESSMAN 等结合 dPCR 技术和流式技术,应用乳状液在单个试管中实现了 PCR 反应体系的分隔。在商业化方面,2006 年, Fluidigm 公司最先推出了基于芯片的 dPCR 平台, Quantalife 公司研制了最早的微滴式 dPCR 系统。如今, dPCR 技术因其在分子检测方面的高灵敏度和高

准确性,已在微量 DNA 检测、罕见突变检测和拷贝数变异等方面得到了广泛应用。

1 dPCR 的原理、分类

1.1 dPCR 的原理 dPCR 核酸分子定量方法的原理是基于荧光 PCR 扩增与计数,但无须 Ct 值和标准曲线即可实现定量。在 dPCR 中,扩增反应被分成数千个独立的部分,分区可以通过微孔板、毛细管、油乳液或阵列来实现。理想情况下,每个单独的反应混合物含有一个或没有目标分子,待分割后的反应扩增至终点,计数阳性(荧光)和阴性分区的数量,即可通过泊松定律精确计算每个分区的 DNA 目标数和原始标本中的拷贝数^[1]。使用 dPCR 准确定量 DNA 须满足以下两个条件:第一, DNA 目标必须随机分布于分区中,理想情况下每个分区不应该包含一个以上的目标分子,但这一稀释需要大量的分割($10^4 \sim 10^5$)才能达到泊松定律的要求。分区的大小也应该一致以使每个分区包含相同数量的目标分子。第二,扩增须有足

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81972000,82172348,81902139);上海市临床重点专科建设项目(shslczdzk03302)。

[△] 通信作者, E-mail: guo.wei@zs-hospital.sh.cn。

够效率,让所有包含目标分子的分区都被扩增,且正负分区间须有明确区分。

1.2 dPCR 的分类 目前主流的 dPCR 技术可分为液滴式 dPCR(ddPCR)和芯片式 dPCR(cdPCR)。

ddPCR 使用两种互不相溶的液体,通过两者表面张力和剪切力的共同作用来形成微小的液滴。在 ddPCR 中,微滴发生器每次可以生成数百万个纳升级别的油包水微滴作为样品分散载体,这些液滴将包裹着单拷贝的 DNA 模板和反应液进入反应管扩增,最后通过检测微滴的荧光信号进行定量。该方法的优势在于灵活的通量及可扩展性,但其生成液滴的稳定性及可控性较差。相应的商品化仪器平台包括 Bio-Rad-Qx 200、RainDrop、Naica Crystal、新羿 TD-1 数字 PCR 仪和达微生物 OsciDrop[®] 等。

cdPCR 技术先在芯片上物理加工大量的腔室阵列作为微反应腔室,再将纳升级液体封闭在微孔中进行扩增,最后使用荧光显微镜判读结果。近年来芯片产业的进步大大推动了 cdPCR 的发展: Ismagilov 研究组开发了滑动式 dPCR 芯片^[2];浙江大学研究组开发了具有分支结构的无废液式芯片和一体式 dPCR 芯片^[3]。cdPCR 独立性高、反应均一性好,为实时 dPCR 提供了可能性;但其芯片加工制作工艺要求高,技术操作复杂且实验成本较高。商品化仪器有 ThermoFisher QuantStudio[™] 3D、Clarity、QIAGEN QIAcuity 等。

1.3 dPCR 商业化平台 目前 dPCR 市场中的主要商业品牌有 QX 系列(Bio-Rad 公司,美国),RainDrop 系列(Bio-Rad 公司,美国),BioMark 系列(Fluidigm Corporation 公司,美国)和 QuantStudio 系列(Thermo Fisher 公司,美国)。前两者属于 ddPCR 技术,后两者属于 cdPCR 技术。其他品牌有 Clarity (JN MedSys 公司,新加坡)、Naica(Stilla Technologies 公司,法国)等。

1.3.1 BioMark 系列 Fluidigm Corporation 早在 2006 年就开始着力于将 dPCR 技术商业化。其推出的 BioMark HD 平台,使用数字阵列集成流体电路(IFC)将样品分成 770 个 0.85 nL 体积的分区,通过在每个 IFC 中使用微流体结构,可以将样品和化验溶液加压加载到反应分区中。之后,BioMark HD 执行原位热循环,最后借助平面成像技术进行终点和实时荧光检测。此外,BioMark 系列通过使用多种报告染料对标本目标进行量化,可以有效消除假阳性。

在科研应用方面,ALIKIAN 等^[4]使用基于 BioMark 的 dPCR 平台,对慢性粒细胞白血病 BCR-ABL1 基因拷贝数进行定量,效果明显优于 qPCR。

1.3.2 QuantStudio 系列 Thermo Fisher Scientific 的 QuantStudio 系列包括 QuantStudio 3D dPCR 和 QuantStudio 12 K Flex with OpenArray Plates 等平台。QuantStudio 3D dPCR 芯片具有 20 000 个 0.8 nL 的反应孔。样品加载到芯片上是通过使用预先吸取样品的一次性加载刀片实现,之后自动芯片加载器

可以将样品分配到芯片,该系列设备的价格目前在市场上处于较低水平。

1.3.3 Bio-Rad QX 系列 Bio-Rad QX 系列是目前市场上相当流行的 ddPCR 仪器,目前提供 QX100、QX200 和 QXONE dPCR 等设备。QX200 具有用于液滴生成和荧光检测的独立单元,可生成约 20 000 个纳升大小的液滴。其操作流程:使用定制混合溶液制备样品,然后借助液滴生成油通过流动聚焦形成液滴,最后送入荧光检测器。SUO 等^[5]最近的一项研究显示,使用 QX200 进行新型冠状病毒感染(COVID-19)的检测,可报告范围为 $10\sim 5\times 10^4$ 拷贝/反应,在患者咽拭子标本中,尤其是在病毒载量处于低水平时,较 qPCR 显示出高精度和灵敏度,但 QX200 在使用中需要手动移液,在开放环境中有一定的污染风险。

1.3.4 Raindrop 系列 Raindrop 采用 ddPCR 技术,可对超过 100 万个皮升大小的液滴进行高通量处理和实时成像。该设备在单个微流体平台上结合了快速液滴生成、片上热循环和广域荧光成像技术。与 QX 系列不同,RainDrop 在生成的单层液滴上使用平面成像技术,并从密封的机载储液器自动输送过滤油以消除污染风险。RainDrop 系统在几个重要应用中都展现出了卓越的分子检测性能,包括低频肿瘤等位基因检测、基因表达、拷贝数变异和单核苷酸多态性(SNP)测量。

对比来看,ddPCR 仪器由于不受芯片制造分辨率的限制,可以利用微流体的优势产生更小的体积,因此 QX200、RainDrop 系列可以生成更高的分区数。基于 cdPCR 的 QuantStudio 3D、Constellation/QIAcuity 也已在小于 2 nL 的体积内实现 10 000 个以上的分区。

2 dPCR 与其他分子诊断技术的比较

2.1 dPCR 与 qPCR 的比较 如表 1 所示,dPCR 和 qPCR 在荧光测定、扩增影响、检测限、定量方式等方面均有不同。由于使用的标准曲线可能是通过不同方法标定的,不同实验室对同一标本进行的 qPCR 检测可能会得到不同的拷贝数。因此 dPCR 的主要优势在于其绝对量化不依赖校准曲线实现,提高了实验室之间结果的准确性和可交换性^[6]。若样品中杂质阻碍了扩增,或靶标、引物、探针序列不匹配降低扩增效率,都会导致 qPCR 定量结果偏低。而 dPCR 定量使用终点检测而非实时扩增,定量受标本中可能存在的扩增抑制剂的影响较小,也较少受到扩增效率不佳的影响^[7],甚至能在不事先提取核酸的情况下对标本进行 dPCR 检测^[8]。dPCR 可以更精确、灵敏地量化一些靶标,例如能够对于监测抗病毒治疗的低病毒载量实现精准定量^[9]。与 qPCR 相比,dPCR 的更高精度也有助于检测和定量罕见变异^[10]以及测定反应中高拷贝数和低拷贝数靶点的比率。

dPCR 也存在一些不足,有限的标本体积会限制检测的下限,有限数量的分区会使得动态范围较小,

分子丢失会导致错误的量化偏低,即在一个分区中并不能确保所有的模板都被扩增。qPCR 仪器能够测量 4~6 种不同染料的荧光,这些染料与样品中不同的目标结合在一起,而大多数 dPCR 仪器可以测量 2 种荧光染料,限制了同一标本中不同目标的多重检测能力。总而言之,dPCR 与 qPCR 因定量方式等方法原理上的差异而各具优势,实验室可以根据不同的检测需求与应用场景选择合适的检测方法。

2.2 dPCR 与下一代高通量测序(NGS)的比较
NGS 包括全外显子组测序、全转录组测序、全基因组测序以及靶向高通量测序等。基于其边合成边测序的核心原理,NGS 可以用来对整个基因组进行测序,也可以被限制在特定的目标区域。因此 NGS 属于非靶向全基因组分析,能够在不事先知道肿瘤中可能存在的畸变位点种类的情况下检测肿瘤特异性改变;而 dPCR 技术则需要根据相关基因位点的特定突变事先设计引物探针来实现检测定量。NGS 的优势在于其通量高、速度快、精度高等,因而在临床疾病分子诊断方面发挥着独特作用。COVID-19 疫情初期,NGS 技

术仅用 5 d 就获得了病毒全基因组序列^[11]。在肿瘤相关基因位点突变的检测中,NGS 平台对血浆 cfDNA 中 EGFR 突变检测的灵敏度为 0.2%,批内精密度、批间精密度、准确度均为 100%^[12];dPCR 平台的检出限为 0.308 copy/ μ L,准确度为 87.88%^[13]。NGS 也存在一些问题,尤其是在被应用于低水平 RNA 的分析时,这通常与整个转录组(RNAseq)有关。

dPCR 平台可以与 NGS 对接,对测序文库进行质量控制、提供对测序文库的定量分析和质量评估信息。dPCR 可以对 NGS 的结果,如对 SNP、突变及拷贝数变异(CNV)在内的基因组变异等测序结果进行验证,以确保测序结果的可信度。另外,dPCR 所得到的结果还包含反映测序文库质量的信息,如接头与接头二聚体、错误连接片段、过长连接片段等,这种优势是当前其他方法不具备的。总的来说,dPCR 与 NGS 是两种原理完全不同、能够满足不同检测需求的分子检测技术,dPCR 技术能够在质量控制或验证等方面支持 NGS。

表 1 qPCR 与 dPCR 的比较

项目	qPCR	dPCR
荧光测定	每个循环进行实时荧光测定	扩增结束后对每个反映单元的荧光信号进行采集
扩增影响	样品的 PCR 扩增效率可能与校准物的扩增效率不同	直接计数目标分子数而不依靠任何校准物或外标
检测限	低拷贝数的目标 DNA 分子不能通过扩增检测到	单 DNA 模板出现在反应室而未被检出的可能性非常低
定量方式	主要依赖校准物制备的标准曲线确定未知样品浓度,是相对定量方法	通过计数单个分子从而实现绝对定量
多指标检测	多腔室扩增与多荧光通道结合的并行 PCR	多个荧光通道/单波长多强度
应用	基因表达定量、质量控制和检测验证、病原体检测、SNP 基因分型、拷贝数变异、microRNA 分析、病毒定量、siRNA/RNAi 实验等	病毒载体、核酸标准品、基因表达和下一代测序文库绝对定量、稀有等位基因检测、混合物富集和分类等

3 dPCR 在临床检测中的应用

dPCR 在生物医学领域的两个主要应用是罕见突变检测和核酸定量。dPCR 主要应用于病原体检测、CNV 检测、microRNA (miRNA) 表达分析、下一代测序、单细胞基因表达分析和染色体异常检测。

3.1 病原体检测 dPCR 中众多的单个反应分区使研究病原体的单细胞基因组学成为可能。一种名为“IC 3D”的基于液滴的系统已被成功用于在几分钟内检测血液中的单个细菌^[14]。在人类巨细胞病毒(HCMV)检测中,QX100TM 系统(Bio-Rad Laboratories[®])和 BioMarkTM HD 系统(Fluidigm[®])两种 dPCR 系统同时用于标本检测。其中,使用 BioMark 系统检测得到的病毒拷贝数比传统方法检测血浆及 PBS 中提取的 DNA 分别高出 26% 和 53%。PAVŠIĆ 等^[8]以外周血为标本,用 dPCR 对标本中 HIV 的 2-LTR 序列进行检测,结果显示 dPCR 能对治疗过程中 HIV 载量的微量变化进行有效检测,且检测精确度较荧光 PCR 高出至少 20 倍。

微滴式 dPCR 方法已经被建立并用于检测布鲁菌,ddPCR 检出靶标基因拷贝数为 $1 \sim 2.00 \times 10^5$ 拷贝/反应,测得值的对数值与 DNA 浓度的对数值有线性关系,阳性率在布鲁氏菌病疫情相关血液标本 DNA 的检测中远高于培养法和试管凝集法^[15]。利用 ddPCR 技术,结合 Taqman 荧光探针技术对新型冠状病毒(SARS-CoV-2)ORF1ab 基因和 N 基因保守区进行特异性检测的试剂盒经检验符合产品技术要求,获得了欧盟市场准入资质,具有灵敏度高、可定量、操作简便和封闭检测等特点,有利于定量监测 SARS-CoV-2 载量,在 SARS-CoV-2 核酸超敏定量检测方面具有创新性,达到国内领先水平。2022 年,华西医院已开展基于五色荧光 ddPCR 法的血流感染检测,覆盖血流感染中常见的 16 种细菌、8 种真菌、5 种病毒,以及碳青霉烯类、甲氧西林、万古霉素、多黏菌素、青霉素等常见药物相关的 20 个耐药基因。cdPCR 检测肺炎克雷伯菌灵敏度比 qPCR 提高了约 1.5 个数量级,最低检出限可达到 3.77 copy/ μ L^[16]。总的来说,

在病原体检测中, dPCR 已经被证明能够成功检出各种样品中低目标浓度的待测物且结果可靠, 已在临床检测中有一定的应用。

3.2 CNV 检测 CNV 是人类遗传变异的重要来源, 与大量的人类疾病密切相关。dPCR 能够检测拷贝数变异, 检测限低至 1 个拷贝。基于微孔的 dPCR 已经被用于检测生殖系核质体中的线粒体 DNA (mtDNA) 拷贝数。此外, 一种称为“局部临时负压辅助微流控装置”的自制装置已被证明可量化 A549 肺癌细胞系中角蛋白 19 的数量, 并且观察到荧光斑点的数量与稀释因子之间存在良好的相关性^[17]。在肺癌研究中, PENDER 等^[18] 和 LIN 等^[19] 分别通过 dPCR 成功检测到了 KRAS 基因突变和 EGFR 基因的拷贝数。KRAS 基因突变的检测限为 2 000 : 1 (在 2 000 个野生 KRAS 基因中检测到一个 KRAS 基因突变), 灵敏度高于 Sanger 测序 (10 : 1) 和下一代测序 (50 : 1)。除了肺癌, 在高级别浆液性卵巢癌 (HG-SOC) 的检测中, HGSOc 组织中缺失的 NF1 缺失和突变型 TP53 p. R175H 的数量已经被成功定量^[20]。基于 ddPCR 技术检测融合基因转录本的方法可对外泌体中的微量 PML-RARA 转录本进行绝对定量, 为无创动态监测急性早幼粒细胞白血病患者血清外泌体中 PML-RARA 融合基因的表达水平提供了可能^[21]。总之, 关于基因拷贝数变异或突变的检测目前已在 dPCR 领域引起广泛研究兴趣, 并逐渐成为 dPCR 应用的一大主流领域。

3.3 miRNA 表达分析 在癌症的液体活检中, miRNA 被认为是一种很有价值的循环生物标志物, 可用于癌症的早期诊断^[22]。其中, ddPCR 因其高特异度和高灵敏度, 已成为一种快速而准确的癌症早期诊断方法。microwell-based dPCR (Thermo Fisher Scientific®) 已被用于检测肺癌, 检测 5 种 miRNA 生物标志物 (miR16-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, miR-486-5p 和 miR-600-5p) 在肺癌患者血浆、细胞裂解液和组织中的拷贝数^[23]。也有研究使用 ddPCR 进行急性早幼粒细胞白血病的检测, 在低浓度的靶基因下仍然表现出良好的批间和批内重复性^[24]。在癌症研究中的其他应用包括帮助乳腺癌患者血清中 miRNAs 的诊断^[25]、分析直肠癌患者血浆中 miR-155 和 miR-99b 的表达情况^[26]等。以上说明, ddPCR 有望成为一种高特异度、高灵敏度、低成本且便捷的癌症检测方法。

3.4 新一代测序验证 二代测序是一种高通量的测序技术, 它通过引入可逆终止末端, 捕捉 DNA 复制过程中新添加碱基携带的特殊标记来确定 DNA 序列。不同于传统的 qPCR, dPCR 精确的结果定量不依赖于不同的扩增子长度, 为高通量测序提供了灵敏度和绝对校准。该方法成功地减少了 1 000 倍以上的标本量, 且由于不需要预先放大, 可以最大限度地减少偏差的不良影响。EIBLWIESER 等^[27] 使用多重 ddPCR 预先扩增患者特异性的 EWS 融合基因, 然后再采用 Ion S5 系统对该文库进行测序, 得出基于多重

dPCR 的靶向富集与 NGS 的组合提高了鉴定基因组融合序列成功率的结论。

此外, 微流控液滴富集序列分析 (MESA) 是一种新的基于 dPCR 的目标富集技术。MESA 技术可以将来自 5 个不同基因组位点的 250 kb 定向基因组 DNA 富集至 31.6 倍^[28], 然后提取基因组 DNA 片段进行基于 TaqMan 探针的微滴式 dPCR, TaqMan 阳性液滴经介电泳法回收, 然后通过酶促反应去除扩增子后进行测序。该方法仅需要少量的 DNA 就能全面识别目标位点内的遗传多态性, 非常适合生物医学领域的遗传变异研究。

3.5 单细胞基因表达分析 由于不需要预扩增, dPCR 可以在不存在扩增偏移的情况下进行单细胞基因表达分析, 这凸显了它替代传统 qPCR 的潜力, 能够对细胞发育机制进行更深入的研究。例如, 在一项对单细胞转录组的研究中, 使用条形码引物对微珠进行修饰, 每个与微珠结合的单细胞被封装在油包水的小滴中^[29]。甲基化单细胞限制分析 (SCRAM) 已经用于分析单细胞多位点甲基化水平。SCRAM 主要包括以下步骤: 单细胞的分离和裂解, 甲基化敏感限制性内切酶对基因组 DNA 的消化作用, 两个周期的多位点 PCR 扩增, 目标甲基化状态的确定^[30]。Westbrook 的团队总结了产生高通量单细胞的微纳米技术, 并为在单细胞基因表达分析中使用 dPCR 奠定了基础^[31]。dPCR 在单细胞基因表达分析中的应用引起了研究者的广泛兴趣。

3.6 染色体异常分析 染色体异常是指染色体某一片段的缺失、添加或不规则变化。传统的产前诊断方法如侵入性羊膜穿刺、绒毛膜取样等可能会造成胎儿丢失。无创产前筛查 (NIPS) 或通过 dPCR 检测胎儿的染色体异常对胎儿的影响较小, 检测更加准确, 已成为目前新的诊断方法。2012 年, BARRETT 等^[32] 借助 dPCR 对孕妇血浆中的无细胞胎儿 DNA (cffDNA) 进行了镰状红细胞贫血检测。TAN 等^[33] 采用锁核酸 (LNA) 探针的多重 ddPCR 检测准确地识别了胎儿非整倍体, 证明了多重 dPCR 在非侵入性产前诊断中应用的可行性, 是具有重要应用潜能的产前诊断方法。在胎儿染色体的 21-三体、18-三体、13-三体检测中, 使用 dPCR-NIPT 检测技术能够在细胞游离 DNA (cfDNA) 分数低至 5%、提取的 cfDNA 浓度低至 0.2 ng/ μ L 的情况下检测出三体瘤^[34]。在 283 份临床标本检测中, dPCR-NIPT 测定显示检测灵敏度为 100.00%, 特异度为 95.12%, 优于现有的方法。在胎儿的非整倍体染色体诊断中, JACKY 等^[35] 提出了一种虚拟分区 ddPCR 分析方法, 该方法根据荧光强度划分多个阈值, 以确定每个阳性液滴中目标基因的数量。这种算法减少了分区误差, 从而提高了基于复用 ddPCR 进行三体细胞鉴定的准确性。

dPCR 还可以准确反映标本中的 Y 染色体微缺失状况, 优化后的 dPCR 方法检测标本的浓度可低至 0.1 mg/L, 该值远低于常规 qPCR 的检测限 (1

mg/L),可开发成为男性不育症及其他生殖诊断中的重要技术^[36]。

4 展 望

目前,dPCR 在病原体鉴定和病原微生物的定量检测上具有突出优势:临床标本无须经过病原微生物培养过程即可进行高灵敏度的检测,缩短了报告周期,且可以从多种高浓度的背景核酸中检出病原微生物,使快速检测潜在的病原微生物成为可能,对于感染性疾病的诊断和控制具有重大意义。此外,dPCR 在肿瘤领域的应用也正在不断被拓宽,它适用于检测各种体液标本中的肿瘤相关突变,可辅助分析患者的肿瘤突变,能够部分克服肿瘤的异质性;此外,dPCR 可以从分子表型层面发现肿瘤的早期耐药突变,从而提示医生耐药出现的可能性,帮助调整用药方案。同时,dPCR 能大幅降低体细胞中背景 DNA 的干扰,实现对肿瘤标志物的有效检测,还能定量监测突变频率变化,量化检测标准。目前 dPCR 技术已经成功应用于 EGFR、KARS、BRAF、PIK3CA 等各种癌基因突变检测,以及癌症相关基因(如 HER2 基因)的扩增检测。相比于 NGS,dPCR 对实验室人员和设施的要求低,操作流程简易,报告时间快速,便于临床实验室工作的开展。

同时,dPCR 也面临一些挑战,包括检测下限受限、动态范围小、RNA PCR 中目标逆转录不完整导致检测不到所有的拷贝等。cdPCR 成本高、通量低的问题也对其提出了挑战。在检测低拷贝数标本时,ddPCR 较不稳定,需要重复检测以获得合格的数据。dPCR 临床检测还没有统一的行业标准,缺乏商品化的室内质控品,同时由于灵敏度较高,检测过程中容易遭受外源污染,因此需要做好实验室内部质量控制,建立规范、标准的检测操作流程和结果评估分析体系,加强人员培训,在大量比对和验证实验的基础上才能够进入临床实验室。

参考文献

- [1] HUGGETT J F, COWEN S, FOY C A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1):79-88.
- [2] SHEN F, DAVYDOVA E K, DU W, et al. Digital isothermal quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on SlipChip [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(9):3533-3540.
- [3] YIN J, ZOU Z, HU Z, et al. A "sample-in-multiplex-digital-answer-out" chip for fast detection of pathogens [J]. *Lab Chip*, 2020, 20(5):979-986.
- [4] ALIKIAN M, WHALE A S, AKIKI S, et al. RT-qPCR and RT-digital PCR: a Comparison of different platforms for the evaluation of residual disease in chronic myeloid leukemia [J]. *Clin Chem*, 2017, 63(2):525-531.
- [5] SUO T, LIU X, FENG J, et al. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1):1259-1268.
- [6] TANG L, SUN Y, BUELOW D, et al. Quantitative assessment of commutability for clinical viral load testing using a digital PCR-based reference standard [J]. *Clin Microbiol*, 2016, 54(6):1616-1623.
- [7] SEDLAK R H, NGUYEN T, PALILEO I, et al. Superiority of digital reverse transcription-PCR (RT-PCR) over real-time RT-PCR for quantitation of highly divergent human rhinoviruses [J]. *Clin Microbiol*, 2017, 55(2):442-449.
- [8] PAVSIĆ J, ZEL J, MILAVEC M. Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(1):67-75.
- [9] HUDECOVA I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids [J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(15):948-956.
- [10] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: a technology review [J]. *Sensors (Basel)*, 2018, 18(4):1271.
- [11] 黄斐,张春燕,郭玮,等. SARS-CoV-2 核酸检测的现状和问题 [J]. *检验医学*, 2021, 36(5):554-559.
- [12] 高姚怡,黄斐,沈敏娜,等. 多平台检测循环游离 DNA 突变在非小细胞肺癌患者中的应用评估 [J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(10):948-955.
- [13] SONG X, GONG J, ZHANG X, et al. Plasma-based early screening and monitoring of EGFR mutations in NSCLC patients by a 3-color digital PCR assay [J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(9):1437-1444.
- [14] WATANABE M, KAWAGUCHI T, ISA S, et al. Ultra-sensitive detection of the pretreatment EGFR T790M mutation in non-small cell lung cancer patients with an EGFR-activating mutation using droplet digital PCR pretreatment EGFR T790M mutation in NSCLC patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(15):3552-3560.
- [15] 田国忠,姜海,薛盼盼,等. 布鲁氏菌微滴式数字 PCR 方法的建立与应用 [J]. *中国人兽共患病学报*, 202, 37(4):301-305.
- [16] 台萃,旷代,张萍,等. 肺炎克雷伯菌的芯片式数字 PCR 检测方法的建立 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49(3):1200-1213.
- [17] 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 [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2015, 3(4):248-257.
- [18] 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 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0139074.
- [19] LIN C C, HUANG W L, WEI F, et al. Emerging platforms using liquid biopsy to detect EGFR mutations in lung cancer [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(11):1427-1440.
- [20] SCHWARZ R F, NG C K Y, COOKE S L, et al. Spatial and temporal heterogeneity in high-grade serous ovarian cancer: a phylogenetic analysis [J]. *PLoS Med*, 2015, 12(2):e1001789.
- [21] 朱慧,王哲颖,丁小青,等. 微滴式数字 PCR 技术检测外

泌体 PML-RARA 融合基因的表达[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(3): 747-752.

[22] 吴艳, 陈杰. 血中游离 microRNA 检测在肿瘤液体活检中的应用和进展[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(2): 146-148.

[23] CONTE D, VERRI C, BORZI C, et al. Novel method to detect microRNAs using chip-based QuantStudio 3D digital PCR[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 849.

[24] WANG G, YAN G, SANG K, et al. Circulating lnc-LOC as a novel noninvasive biomarker in the treatment surveillance of acute promyelocytic leukaemia[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 481-490.

[25] MANGOLINI A, FERRACIN M, ZANZI M V, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR [J]. Biomark Res, 2015, 3(1): 12-20.

[26] 侯冰冰. 基于微滴式数字 PCR 技术探讨结直肠癌血浆中 miR-155、miR-99b、let-7a 的表达与肝转移相关性的研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.

[27] EIBLWIESER J, KRUMBHOLZ M, SEMPER S, et al. Multiplex droplet digital PCR-based targeted enrichment NGS for identification of tumor markers in Ewing Sarcoma (EwS)[J]. Klin Padiatr, 2019, 231(3): 159-166.

[28] EASTBURN D J, HUANG Y, PELLEGRINO M, et al. Microfluidic droplet enrichment for targeted sequencing [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(13): e86.

[29] KLEIN A M, MAZUTIS L, AKARTUNA I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells[J]. Cell, 2015, 161(5): 1187-1201.

[30] CHEOW L F, QUAKE S R, BURKHOLDER W F, et al. Multiplexed locus-specific analysis of DNA methylation in single cells[J]. Nat Protoc, 2015, 10(4): 619-631.

[31] WEAVER W M, TSENG P, KUNZE A, et al. Advances in high-throughput single-cell microtechnologies[J]. Curr Opin Biotechnol, 2014, 25: 114-123.

[32] BARRETT A N, MCDONNELL T C, CHAN K C, et al. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia [J]. Clin Chem, 2012, 58(6): 1026-1032.

[33] 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.

[34] DAI P, YANG Y, ZHAO G, et al. A dPCR-NIPT assay for detections of trisomies 21, 18 and 13 in a single-tube reaction-could it replace serum biochemical tests as a primary maternal plasma screening tool? [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 269-286.

[35] JACKY L, YURK D, ALVARADO J, et al. Virtual partition digital PCR for high precision chromosomal counting applications[J]. Anal Chem, 2021, 93(51): 17020-17029.

[36] 袁通阔, 张红国, 尹焕才, 等. 基于数字 PCR 技术的 Y 染色体微缺失检测方法开发[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2021, 44(1): 47-55.

(收稿日期: 2023-01-13 修回日期: 2023-07-15)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.18.025

盆底器官脱垂动物模型构建研究进展*

袁佳坤¹, 陈国庆², 王琼¹, 于霞³综述, 陈颖^{1Δ}审校

1. 电子科技大学医学院附属妇女儿童医院/成都市妇女儿童中心医院妇产科, 四川成都 610091;
2. 电子科技大学医学院, 四川成都 610091;
3. 电子科技大学医学院附属妇女儿童医院/成都市妇女儿童中心医院检验科, 四川成都 610091

摘要: 盆底器官脱垂 (POP) 是中老年妇女常见的盆底功能障碍性疾病, 40 岁以上女性的患病率约为 40%, 近年来其发病率仍在不断提高。因此, POP 已成为一个国际性的社会化医疗难题, 动物模型的建立对该疾病的发病机制显得尤为重要。该文总结了近几年来, 国内外 POP 动物模型研究现状, 从动物选择的优缺点、模型的构建等方面进行了阐述, 旨在为 POP 的研究提供参考。

关键词: 盆底器官脱垂; 动物模型; 综述文献

中图法分类号: R711.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)18-2743-05

Research advances in animal model construction of pelvic floor organ prolapse*

YUAN Jiakun¹, CHEN Guoqing², WANG Qiong¹, YU Xia³, CHEN Ying^{1Δ}

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Women's and Children's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China/Chengdu Municipal Women's and Children's Central Hospital, Chengdu, Sichuan 610091, China;
2. School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu,

* 基金项目: 四川省成都市科技项目 (2021-YF05-00595-SN)。

Δ 通信作者, E-mail: cherry-414@yeah.net。

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1167.R.20230803.1451.002\(2023-08-04\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1167.R.20230803.1451.002(2023-08-04))