

• 专家面对面 •

数字 PCR 的临床应用和挑战

关 明¹, 郭 玮², 刘维薇³, 姜加陶⁴, 田月如¹, 郭 永⁵

(1. 复旦大学附属华山医院检验科, 上海 200040; 2. 复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200040;
3. 上海市第十人民医院检验科, 上海 200072; 4. 上海市胸科医院检验科, 上海 200030;
5. 清华大学生物医学工程系, 北京 100084)

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.001

中图法分类号: R-05

文章编号: 1673-4130(2019)05-0001-04

文献标识码: A



关 明

关明: 随着分子遗传知识的积累, DNA 和 RNA 分子的定量变得越来越重要。人们发明了诸多方法, 以便尽可能精确地量化核酸的数量。在序列特异性定量方法中, 基于聚合酶链反应 (PCR) 的技术一直是较为理想的选择。实时定量 PCR 被认为是生物医学实验室的常规操作, 但

由于其计量的灵敏度有限, 无法满足越来越严格的定量要求, 尤其是当目标浓度较低或存在 PCR 抑制剂干扰精细测定时。此外, 随着下一代测序和单细胞分析等技术的不断发展, 人们对核酸定量的兴趣已经达到了前所未有的单分子水平, 这导致了数字 PCR 技术的繁荣。“限制稀释 PCR”和“单分子 PCR”是最初用来描述这种方法的名称, 直到更流行、更贴切的术语“数字 PCR”被提出, 很快引起了生物医学研究者的广泛关注。数字 PCR 的策略很简单, 就是“分而治之”, 这是一个很好的比喻。DNA 样品分别在独立但相同的分区中进行扩增, 每个反应的全或无检测结果均遵循泊松分布。在计算阳性反应的总和后, 通过泊松校正, 不仅可以得到目标分子的浓度, 还可以得到目标分子的绝对数量。因其高灵敏度和特异性, 数字 PCR 目前正应用于绝对等位基因定量分析、病毒核酸

检测、罕见突变检测、拷贝数变异分析、DNA 甲基化分析、基因重排分析。组织和血液是数字 PCR 技术主要应用的标本类型, 使用脑脊液、尿液、房水等其他体液的新方法也正在开发中。本期主持人邀请了国内从事数字 PCR 研究的多位专家, 一起来探讨数字 PCR 目前在临床应用上的优势与挑战, 同时也展望了今后在该技术领域的发展方向。

1 关明: 与其他传统扩增技术相比, 数字 PCR 在临床常规使用中有何优势?



郭 玮

郭玮: 与传统荧光定量 PCR 技术相比, 数字 PCR 的灵敏度高, 更适合常规临床使用。数字 PCR 的原理是将标准 PCR 反应体系分配至大量微小的反应单元中, 这能大大提高 PCR 反应体系对抑制物的耐受能力。传统的扩增技术的灵敏度只有 1%, 但数字 PCR 可轻松实现单分子检测, 灵敏度可达 0.1% 甚至 0.001%, 这对于临床上痕量核酸标本检测、复杂背景下稀有突变检测, 尤其是循环肿瘤 DNA 检测特别适用。随着检测技术的发展, 现有的数字 PCR 检测平台的工作操作流程相对简单, 兼容性强, 且二维的结果图能更直观地读取数据^[1]。

作者简介: 关明, 男, 研究员, 主要从事临床分子生物学检验以及肿瘤转移和浸润机制的研究。

作者简介: 郭玮, 女, 主任技师, 主要从事临床检验工作。

作者简介: 刘维薇, 女, 主任技师, 主要从事分子诊断相关研究。

作者简介: 田月如, 女, 副主任技师, 主要从事无菌体液病原微生物的快速诊断及细菌耐药机制的研究。

作者简介: 姜加陶, 男, 主任技师, 主要从事临床检验工作。

作者简介: 郭永, 男, 研究员, 主要从事重大疾病的诊断技术开发和转化研究。



刘维薇

刘维薇:此外,数字 PCR 还可以实现绝对定量,突变扩增阻滞系统 (ARMS) 技术只能得到定性结果,传统的绝对或相对定量 PCR 的分析结果高度依赖于标准曲线或者内参基因,无法做到精

准绝对定量。数字 PCR 在结果判读时仅判断“有/无”两种扩增状态,通过直接计数或泊松分布来进行定量分析,实现了真正意义上的绝对定量。



姜加陶

姜加陶:在 PCR 过程中影响扩增效率的因素众多,比如酶、引物水平、PCR 抑制物等,不能保证其定量分析所依赖的基础——循环阈值 (Ct) 的恒定性,使得相同实验不同次重复检测结果的重

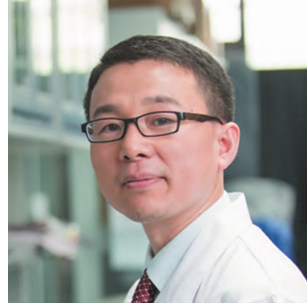
现性较差,甚至可能会得到完全相反的结果。与荧光定量 PCR 不同的是,数字 PCR 通过终点荧光信号计算浓度,不依赖于 Ct 值,因此不受扩增效率影响,能够将误差控制在 5% 以内,实现检测结果的高度重复性。



田月如

田月如:数字 PCR 在减少使用通用引物或探针设计在多样性靶序列导致错配方面也具有优势^[2]。数字 PCR 平台可以与新一代基因测序技术 (NGS) 对接,实现对测序文库的质量控制,提供对测序文库的定量

分析和质量评估信息。一方面,数字 PCR 对 NGS 的测序结果进行验证,确保测序结果可信度;另一方面,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,这是当前其他方法所不具备的优势^[3]。



郭永

郭永:基于以上提到的优势,数字 PCR 尤其适用于临床低丰度核酸分子的检测和定量。举 3 个例子:(1)肿瘤的液体活检,通过检测血浆中的肿瘤循环 DNA (ctDNA),为肿瘤的伴随诊

断、疗效监控和预后判断提供可靠数据^[4];(2)标本中少量病原体检测,比如脑脊液感染、术后菌血症、HBV 和 HIV 用药后的检测^[5];(3)器官移植排斥的监控,可以更早发现急性排斥,紧急干预^[6]。

2 关明:在所有现有的商业产品化的数字 PCR 平台,数字 PCR 都得到了越来越多的研究,特别是对癌症应用领域,数字 PCR 的出现对癌症研究有哪些贡献?

郭玮:数字 PCR 具有高灵敏地检测微量靶核酸的能力,有助于从分子表型层面早期发现肿瘤的耐药突变,提示临床耐药的潜在可能性,优化药物治疗方案。加之其能发现复杂背景下的稀有突变,适用于检测各种体液标本(如血液、胸腔积液、脑脊液、尿液)中的肿瘤相关突变,有助于了解患者体内肿瘤突变的全貌,一定程度上克服肿瘤的异质性^[7]。相比于 NGS,数字 PCR 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。

刘维薇:肿瘤个体化诊疗已经成为业内的共识,基因检测也已在临床实践中得到普及。数字 PCR 技术通过对标本的微滴化处理,能在每个微滴中有效地降低正常体细胞 DNA 背景的干扰,不仅能实现对肿瘤标记物的有效检测,还能定量监测突变频率变化,量化检测标准。目前已有大量文献和实例报道了数字 PCR 技术成功应用于 EGFR、KARS、BRAF、PIK3CA、DNMT3A 等各种癌基因突变检测,以及癌症相关的如 HER2 基因扩增检测^[8-10]。

姜加陶:数字 PCR 的出现有效弥补了第 2 代 PCR 系统灵敏度低、重复性差、无法进行精确定量等缺点,在癌症研究领域潜力巨大。比如:在癌症早筛领域,目前基于数字 PCR 对易感或高危人群的血液、尿液、唾液等体液标本中核酸水平的肿瘤标志物(如 ctDNA、miRNA 等)可以实现单分子水平的痕量检

测,以及表观遗传学的 DNA 甲基化定量检测,其发现疾病的时间远早于影像学或其他蛋白类标志物,大大提前了疾病发现的窗口期,可以更好地实现早诊断早治疗。另外,利用数字 PCR 技术还可以富集标本中的待测靶基因,用于二代测序辅助建库、文库质控和测序结果验证等,极大地推动了肿瘤精准治疗的进步。

田月如:数字 PCR 由于标本用量少,高敏感性、高特异性的特点,克服了肿瘤组织包埋标本 DNA 质量差、标本量有限等主要问题,为临床检测多种癌症基因突变提供更客观、自动化程度更高的定量检测结果^[11]。目前,数字 PCR 已成为检测多种癌症基因突变最准确、最可靠的工具之一,应用于肿瘤标本的等位基因绝对定量、罕见突变检测、拷贝数变异分析、DNA 甲基化和基因重排等,以及各种恶性肿瘤的诊断、预测和监测^[7]。

郭永:数字 PCR 目前对癌症研究和治疗方面的贡献主要在液体活检领域。WAN 等^[12]研究表明:血液检测与组织检测相比,对指导 EGFR-TKI 治疗的价值结果相当,数字 PCR 可以更好地检出血液 EGFR 突变。王浩教授和吴一龙教授牵头的 BENEFIT 研究结果显示:采用数字 PCR 检测血液 EGFR 突变状态对指导一线吉非替尼靶向治疗具有良好的疗效和安全性^[13]。这些研究为数字 PCR 在液体活检的临床应用提供了循证医学证据,为将来肿瘤分子诊断模式改变打下了基础。数字 PCR 有望成为癌症疗效监控的主要技术手段。

3 关明:作为一种标准,数字 PCR 在病原微生物的定量检测上具有不可比拟的优势,具体表现在哪些方面?

郭玮:病毒等微生物的载量对于阐释疾病病程,后续治疗及疗效评估是至关重要的,即便是载量的轻微波动,因此需要数字 PCR 高精度和稳定的分析。同时在缺乏标准品的检测项目中,数字 PCR 可用于直接定量病原微生物的拷贝数。

刘维薇:在病原微生物的检测(病毒、细菌、支原体等)方面,数字 PCR 利用其灵敏度高的特点,对各种样品中的病原微生物展开广泛的研究。如人类免疫缺陷病毒(HIV)抗逆转录病毒治疗过程中病毒残留的监控;丙型肝炎病毒(HCV)的分子分型;抗甲氧西林金黄色葡萄球菌的院内感染监控;环境微生物不同功能基因之间的连锁分析等^[14]。

姜加陶:在病原体鉴定方面,数字 PCR 的高灵敏度决定了临床标本无需经过病原微生物培养过程即可进行检测,大大缩短了报告周期,使快速检测潜在的病原微生物成为可能,且利于从大量不同的背景核酸中检出病原微生物,对于感染性疾病的诊断和控制意义重大。另外,在耐药基因检测方面,相对于敏感性差、分辨率低的实时荧光 PCR 技术,数字 PCR 能早期(痕量)检测罕见药物抗性相关序列变异,如:乙型肝炎病毒(HBV)、结核分枝杆菌的耐药突变检测、及时、准确地动态监测各种耐药表型和基因型,给临床研究和患者管理带来潜在影响,有助于及时减少患者服用无效药物的数量,及早采用其他备用药物^[15]。

田月如:数字 PCR 技术尤其在病原体待测标本较难获取且稀有的情况下尤为有用。复旦大学附属华山医院一项将数字 PCR 用于青光眼睫状体炎综合征(PSS)患者的房水中病原体检测的研究发现,人巨细胞病毒(HCMV)可能是我国 PSS 的最主要致病因素,高达 45% 的 PSS 患者的房水标本中检出了 HCMV,比例显著高于国内的相关报道^[16],未发现 PSS 患者房水中存在单纯疱疹病毒(HSV)、巨细胞病毒(EBV)和水痘带状疱疹病毒(VZV)。该研究发现微滴式数字 PCR 法比荧光定量 PCR 的检测结果更加灵敏、准确,更适合用于房水标本中微量病毒的检测,此外,微滴式数字 PCR 法的高灵敏度可以避免对患者进行重复穿刺取样,减少患者在被穿刺取样过程中的恐惧和痛苦。这也是全球首家关于在房水这样的特殊体液中应用数字 PCR 的报道。

郭永:在细菌/病毒的核酸载量测定方面,荧光定量 PCR 技术的最大瓶颈在于需要依赖标准曲线,而且扩增效率的差异会直接导致实验室内或者不同实验室之间的荧光定量 PCR 检测结果的偏差。数字 PCR 基于单分子层面的计数可以摆脱对标准品的依赖,且不受 PCR 抑制物的影响,从而实现病原微生物核酸的精准绝对定量,表现出较高的可重复性。利用数字 PCR 进行核酸的病毒载量测定,依赖其灵敏度高的特点,可以用于早期诊断和用药的低拷贝病毒的监控。

4 关明:毫无疑问,作为一种新型核酸检测技术,数字 PCR 即将进入临床使用,在进入临床前还有哪些质量管理问题需要解决?

郭玮:性能确认方面,数字 PCR 属于实验室自建

检测方法,正式进入临床使用前,临床实验室应进行全面的性能确认^[17]。临床指南和建议的缺失使得各实验室间对性能确认的要素和判断标准存在差异,导致临床使用结果的差异,因此不同分液原理的数字 PCR 平台间需要进行检测结果比对。各种数字 PCR 方法与传统检测方法之间的检测结果的一致性也需要大量的比对和验证实验。只有如此,才能保证数字 PCR 技术可以成熟地进入临床检测。

刘维薇:数字 PCR 临床检测尚无国家或行业统一标准,且缺乏商品化的室内质控品,因此需要建立适宜的室内质控措施,建立规范化的标准检测分析流程。数字 PCR 的灵敏度较高,操作过程极易受到污染源污染,因此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,是保证检测结果准确性和可靠性的前提。

姜加陶:数字 PCR 操作对技术要求相对较高,需要加强人员培训。因为数字 PCR 的灵敏度很大程度上取决于生成的反应单元的数目,而反应单元的生成数目比如微滴式数字 PCR 的微滴生成数则高度依赖于技术人员的操作熟练程度,目前数字 PCR 尚不能很好地实现自动化,因此对技术人员的操作培训尤为重要;结果报告方面,如何合理地审核和报告低丰度的检测结果,也是临床实验室在临床实践前需要考虑的要点。

田月如:数字 PCR 每个反应有限的标本体积限制了分析的检测下限,由于有限数量的分区限制了小动态范围。分区中并非所有模板均被扩增,任何时候均可能出现分子断流导致假性低量化,这在定量 RNA 时尤其突出,某些 RNA 靶点逆转录可能不完整,标本中并非所有拷贝均被检测到。此外,对于较大的扩增子数字 PCR 尚不能准确量化。标本吞吐量较低,污染风险高均是数字 PCR 面临的主要问题。目前,大多数数字 PCR 仪器只能测量两种荧光,限制了同一样品中不同目标的多重检测能力。如果数字 PCR 的具体应用需要纳入内部控制,则可能需要基于不同染料浓度或染料混合物的更复杂的多重策略。数字 PCR 平台反应液的选择仍受商业仪器的限制,不同厂家试剂和平台的结果尚存在差异^[18]。

郭永:数字 PCR 技术极其灵敏,需要进行技术设计防污染管理,通过芯片和其他耗材的设计,尽量避免微液滴和外界环境接触的机会,做到不开盖扩增检

测,减少假阳性。

5 光明:目前已经商业化的数字 PCR 是或者基于“油包水”分散液滴,或者基于芯片分散,基于“泊松”分布的理论,随着微流控方法被用于数字 PCR 平台的开发,可以设想未来还有哪些在技术上能促进数字 PCR 的新技术和新算法?

郭玮:微流控技术的发展使得数字 PCR 的操作相对便捷,且液滴生成的固相体系相对稳定。随着新技术和算法的发展,数字 PCR 将获得卓越的置信水平和真实可信的数据结果,同时推动其在不同检测和应用需求方面的应用,如单细胞核酸检测、T790M/C797S 的顺式或反式的鉴定。数字 PCR 是一种新兴的检测方法。作为一种全新的思路 and 手段,临床对其应保持一种包容的心态。此检测平台将有助于临床深入到分子生物学研究的更高层次。

刘维薇:数字 PCR 更擅长对已知极微量核酸标本、复杂背景下稀有突变和表达量微小差异的标本进行检测,而测序技术主要针对未知核酸或复杂标本进行分析。如果未来可以有对液滴的检测更加直观的检测技术,无疑能更好地推动数字 PCR 在临床的实际应用^[19]。

姜加陶:首先,比较容易想到的是开发多靶点检测的多重数字 PCR 检测,可以通过两种方式实现,(1)使用多种荧光染料来标记不同的待测靶基因,利用多个荧光检测通道来实现;(2)采用单波长多强度技术,使用一种荧光染料,但是扩增结束时不同靶基因对应染料的荧光强度不同^[20]。其次,目前的数字 PCR 大多采用荧光检测手段,虽然较为便捷和灵敏,但需要依赖昂贵的光学仪器和摄像设备,而且 PCR 结束后离线检测耗时耗力且容易引入污染,设想未来可以发展一种能够在线监测、且低成本、高速度、高通量的检测方法,比较有前景的是电化学生物传感器。另外 3D 打印微流控芯片技术相对于传统的微流控加工技术具有设计加工快速、材料适应性广、集成化程度高、精度更高、成本更低的特点,对于微流控芯片数字 PCR 技术的推广应用具有积极的意义^[21]。

田月如:与已有分散方法相比,基于打印的样品分散法具有更好的效果,该平台具有自动化和反复使用的特点。液体弹珠样品分散法可以满足手持数字 PCR 设备的所有要求,各种移动技术均可用于液体弹珠。该方法将惰性疏水物质包裹在内部含 PCR 混合

物的液滴上,使得进行热循环相对简单。此外,惰性疏水粉末不与 PCR 混合物反应,避免污染。焦耳加热法因其加热时间控制简易,与活性 TEC 结合,使加热、冷却的最佳斜坡速率优化了扩增效率,不失为一种理想的数字 PCR 热循环方法。基于 LED 的照明系统几乎可以满足未来数字 PCR 系统的所有要求。低成本数码相机作为探测器。数据处理模块及整个设备可以由低廉的微型计算机控制。使用自主开发的图像处理和输出量化的软件大大降低系统成本。基于智能手机的荧光检测仪也在一定程度上降低硬件复杂性和成本。这些新技术都将在未来促进数字 PCR 的发展^[22]。

郭永:数字 PCR 的发展方向包括:(1)提高检测通量,可对多个靶标多个标本并行检测;(2)提高检测自动化程度,实现一键式检测的自动化检测流程;(3)提高检测速度,进一步降低检测时间;(4)提高检测动态范围;(5)降低检测成本。这些提高,将会使数字 PCR 用于更多分子检测。目前,非常需要国产高端科学仪器和医疗器械能够站起来。人们高兴地看到有识专家,与国产技术合作、评估和指导,一起推动技术的进步,体现了新时代专家的气度和远见。

参考文献

- [1] KANAGAL-SHAMANNA R. Digital PCR: principles and applications[J]. *Methods Mol Biol*, 2016(1392): 43-50.
- [2] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: a technology review[J]. *Sensors*, 2018(18): 1271.
- [3] ALIKIAN M, ELLERY P, FORBES M, et al. Next-generation sequencing-assisted DNA-based digital PCR for a personalized approach to the detection and quantification of residual disease in chronic myeloid leukemia patients [J]. *J Mol Diagn*, 2016, 18(2): 176-189.
- [4] WATANABE M, KAWAGUCHI T, ISA S, et al. Ultrasensitive detection of the pretreatment EGFR T790M mutation in non-small cell lung cancer patients with an EGFR-activating mutation using droplet digital PCR[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(15): 3552-3560.
- [5] PERSAUD D, GAY H, ZIEMNIAK C, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(19): 1828-1835.
- [6] BECK J, BIERAU S, BALZER S, et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(12): 1732-1741.
- [7] OLMEDILLAS-LÓPEZ S, GARCÍA-ARRANZ M, GARCÍA-OLMO D. Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology[J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21(5): 493-510.
- [8] OXNARD G R, PAWELETZ C P, KUANG Y, et al. Non-invasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free serum DNA[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(6): 1698-1705.
- [9] MIOTKE L, LAU B T, RUMMA R T, et al. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(5): 2618-2624.
- [10] HUANG J T, LIU Y J, WANG J, et al. Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 290-296.
- [11] TONG Y, SHEN S, JIANG H, et al. Application of digital PCR in detecting human diseases associated gene mutation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(4): 1718-1730.
- [12] WAN R, WANG Z, LEE J J, et al. Comprehensive analysis of the discordance of EGFR mutation status between tumor tissues and matched circulating tumor DNA in advanced non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(9): 1376-1387.
- [13] WANG Z, CHENG Y, AN T, et al. Detection of EGFR mutations in plasma circulating tumour DNA as a selection criterion for first-line gefitinib treatment in patients with advanced lung adenocarcinoma (BENEFIT): a phase 2, single-arm, multicentre clinical trial[J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(9): 681-690.
- [14] BOSMAN K J, NIJHUIS M, VAN HAM P M, et al. Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir [J]. *Sci Rep*, 2015(5): 13811.
- [15] KUYPERS J, JEROME K R. Applications of digital PCR for clinical microbiology [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(6): 1621-1628.
- [16] CAO G, TAN C, ZHANG Y, et al. Digital droplet polymerase chain reaction analysis of common viruses in the aqueous humour of patients with Posner-Schlossman syndrome in Chinese population [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2018(9): 1.
- [17] MILOSEVIC D, MILLS J R, CAMPION M B, et al. Applying standard clinical chemistry assay validation to droplet digital PCR quantitative liquid biopsy testing [J]. *Clin Chem*, 2018, 64(12): 1732-1742.
- [18] KUYPERS J, JEROME K R. Applications of digital PCR for clinical microbiology [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(

6);1621-1628.

- [19] PAVŠIĆ J, ŽEL J, MILAVEC M. Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(1):67-75.
- [20] WHALE A S, HUGGETT J F, TZONEV S. Fundamentals of multiplexing with digital PCR[J]. *Biomol Detect Quantif*, 2016(10):15-23.
- [21] AU A K, HUYNH W, HOROWITZ L F, et al. 3D-Printed

Microfluidics[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(12):3862-3881.

- [22] SREEJITH K R, OOI C H, JIN J, et al. Digital polymerase chain reaction technology -recent advances and future perspectives[J]. *Lab Chip*, 2018, 18(24):3717-3732.

(收稿日期:2018-08-27 修回日期:2018-12-16)

