

多重数字聚合酶链式反应技术及其应用

尹居鑫^{1,2} 夏丽萍² 邹哲宇² 牟颖^{* 2}

¹(浙大城市学院, 信息与电气工程学院, 杭州 310015)

²(浙江大学工业控制技术国家重点实验室, 分析仪器研究中心, 杭州 310027)

摘要 数字聚合酶链式反应(PCR)作为一种具有广泛应用前景的核酸检测技术,已经成为当前公认的最为精准的核酸检测技术之一。多重检测是数字 PCR 发展的重要方向,随着微流控技术的发展,多重数字 PCR 技术已越来越成熟。本文综述了近年来多重数字 PCR 的研究进展,重点归纳总结了近五年来多重数字 PCR 技术的实现方式,介绍了多重数字 PCR 技术在液体活检、转基因检测、新冠病毒检测等热点领域的应用。最后,对多重数字 PCR 技术面临的问题和挑战进行了探讨,并展望了该技术未来的发展方向。

关键词 数字聚合酶链式反应; 微流控; 多重检测; 评述

聚合酶链式反应(PCR)自 Mullis 等^[1]于 1985 年提出以来,已经发展出多种相关的新技术,包括实时荧光定量 PCR(qPCR)和数字 PCR(dPCR)。qPCR 是第二代 PCR 技术,该技术通过对荧光信号的实时采集(包括染料法、Taqman 探针法、分子信标等)绘制荧光曲线,结合设置循环阈值(Ct)以及建立标准曲线的方式,从而获得目标核酸序列的拷贝数^[2-3]。qPCR 技术已经成为当前核酸分子诊断的金标准,但是这种依赖标准曲线的相对定量方法容易受到环境因素的影响,并且在检测的精准度与灵敏度上也受到一定的限制,无法满足核酸精准检测的需求。尤其是在新型冠状病毒疫情下各个实验室的检测结果中,均出现假阳性与假阴性的情况^[4]。

微流控技术^[5-6]的发展促进了新兴核酸检测技术即数字 PCR 技术的快速发展。数字 PCR 是第三代 PCR 技术,该技术的基本原理是通过有限稀释将单个核酸分子分散到反应腔室中,并保证每个反应腔室至多只有 1 个目标分子。腔室中的核酸分子可进行指数级别的扩增,最终通过检测阳性腔室,结合泊松分布直接获取目标基因的拷贝数^[7]。该方法无需依赖标准曲线或标准品确定目标基因的拷贝数,能够实现对目标基因的绝对定量检测^[8]。该技术最初的原理是由 Sykes 等在 1992 年提出^[9],尽管在当时未正式称为“数字 PCR”,但在该研究中已经建立了数字 PCR 的基本实验程序。更重要的是,数字 PCR 检测的基本原理即通过有限稀释检测有或无读数的概念被提出^[10]。Vogelstein 和 Kinzler 在 1999 年正式提出了数字 PCR 的概念,并使用 96 微孔板进行了数字 PCR 反应,使得这种精准定量检测核酸的策略得以实现^[11]。近年来,大量研究证明数字 PCR 在灵敏度及精准度方面的优势,使其成为极具潜力的核酸检测技术^[12-13]。

核酸检测在病原微生物检测、液体活检、精准医疗等领域都具有重要的应用价值^[12,14-16]。无论是哪种核酸检测方式,随着实验室中测试数量及指标越来越多,多重检测的重要性与必要性越来越突出。多重数字 PCR 检测是在一次反应中利用多对引物实现多靶标扩增检测的技术,具有高效性、系统性及经济性的优势^[17-19]。数字 PCR 作为一项极具应用前途的核酸检测技术,必然是向多重化检测的目标方向发展。不同于 qPCR 技术的多重检测,基于微流控芯片的数字 PCR 的信号采集方式是通过终点反应结果进行测量,这使得数字 PCR 的多重检测实现方式除了在荧光信号颜色上有区别外,还可在荧光强度、检测区域上有所区别,进而在多个维度上实现多重目标数检测(图 1)。

本文总结了多重数字 PCR 技术的实现方式及其在液体活检、转基因检测、肿瘤筛查、病原微生物

2021-05-28 收稿; 2021-07-29 接受

国家重点研发计划项目(No.2019YFE0103900)和国家自然科学基金项目(No.32071481)资助。

* E-mail: muying@zju.edu.cn

检测等领域的应用。同时,对多重数字 PCR 所面临的问题和未来发展方向进行了探讨和展望。

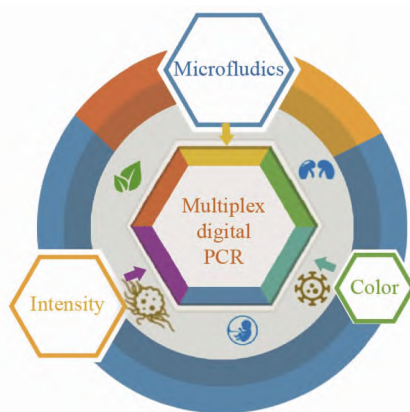


图 1 多重数字 PCR 示意图。在微流控技术、荧光颜色和荧光强度 3 个维度上实现多重检测,多重检测可应用于致病菌的检测、产前诊断、食品安全以及肿瘤检测等领域

Fig.1 Schematic diagram of multiplex digital polymerase chain reaction (PCR). Microfluidic technology, fluorescence color and fluorescence intensity can achieve multiplex detection in three dimensions. Multiplex detection can be applied to the detection of pathogenic bacteria, prenatal diagnosis, food safety, tumor detection and other fields

1 数字 PCR 技术

数字 PCR 通过将核酸分子分散到每个反应腔室进行指数级别扩增,从而产生非常强的荧光信号。通过对阳性数量的腔室进行计数,结合泊松分布^[20],可以直接获得目标基因的初始浓度^[21-22]。微流控技术促进了数字 PCR 的发展,根据样品分散方式的不同,目前主流的数字 PCR 技术可分为液滴式数字 PCR(ddPCR)^[23-24]和芯片式数字 PCR(cdPCR)^[25-26]。

液滴式数字 PCR 是通过将样品分散到 $10^5 \sim 10^6$ 个油包水的液滴中,每个液滴独立作为反应单元进行扩增反应的一类数字 PCR 技术^[27-29]。根据液滴的形成方式不同,目前有多种液滴数字 PCR,常见的包括 T 型芯片、共聚焦“十”字型芯片^[30],近年还发展了基于离心力生成液滴的数字 PCR^[31]、基于阶梯乳化产生纳升液滴阵列的数字 PCR 芯片^[32]、基于表面辅助多因素流体间隔的数字 PCR^[33]、界面振动微滴阵列以及基于毛细管的液滴数字 PCR^[34]等。液滴数字 PCR 方法的优势在于具有灵活的通量及可扩展性,但其液滴的稳定性及可控性相对较差,相应的商品化仪器平台包括 Bio-Rad-Qx 200、Naica Crystal、新羿 TD-1 数字 PCR 仪和达微生物 OsciDrop[®]等。

芯片式数字 PCR 是在芯片上加工上万级别的腔室阵列,形成固定的微反应腔室^[35-37]。近年来,研究者对芯片不断进行改进,推动了芯片式数字 PCR 技术的发展,突破了该技术在多个方面的瓶颈问题^[38-41]。Quake 研究组基于聚二甲基硅氧烷(PDMS) 材料开发了 Quake 阀芯片^[42]、大规模集成流路芯片^[43]; Hansen 研究组开发了具有百万级别腔室阵列的芯片式数字 PCR^[44]; Ismagilov 研究组开发了滑动式数字 PCR 芯片^[45]。近几年,本研究组围绕芯片式数字 PCR 开发了具有分支结构的无废液式芯片^[46]和一体式数字 PCR 芯片^[47-48]。该方法的优势在于独立性高、反应均一性好,为实时数字 PCR 提供了可能性;其缺点在于芯片加工制作工艺要求高,反应单元数目相对有限。相应的商品化仪器包括 Fluidigm BioMark[™] HD 系统、Thermo Fisher QuantStudio 3D[™]、Qiagen QIAcuity[™]等。数字 PCR 的优势主要体现在:(1)绝对定量:无需建立标准曲线,结果直接读出;(2)精准定量:可以定量至单个拷贝;(3)抗抑制性:通过将反应液分散到成千上万个反应单元中,有效降低了抑制剂对扩增的影响^[10,13,49]。

2 多重数字 PCR 的实现方法

2.1 基于荧光信号颜色的多重数字 PCR 检测

在数字 PCR 中,基于不同荧光信号的多重实现方法通常以探针法为主,用于标记的荧光染料通常

包括 FAM、CY5、VIC 或 HEX 等^[50-51]。该方法通过在数字 PCR 反应体系中采用多对引物扩增不同靶标,不同的特异性荧光探针标记不同荧光染料,并通过相应的荧光通道进行检测^[52-53]。近年的研究除了在商品化数字 PCR 仪基础上进行多重方法开发外,还采用自制的数字 PCR 系统进行多重检测的相关研究。Robinson 等^[54]在 Quantstudio 3D™ 数字 PCR 仪上利用 VIC 和 FAM 信号建立了 miRNA-21 以及 miRNA-499 的双重检测方法。Madic 等^[55]基于 Nacia Crystal™ 数字 PCR 仪开发了针对 EGFR 突变位点的六色数字 PCR 检测方法,可将 EGFR 多个突变位点区分开。在自主开发的数字 PCR 系统实现多重检测方面,Liao 等^[56]研发了基于离心力的透明微液滴数字 PCR 系统,该系统具有与 qPCR 相当的动态检测范围,通过将甜菜碱介导的透明液滴和光学成像组合,大大简化了液滴数字 PCR 的实验过程及液滴的读取流程,实现了更高的灵敏度和准确性;利用 CMOS 相机提供大视野成像以及双波长 (488/532 nm) 检测带有 FAM 和 HEX/VIC 标记的探针实现双重检测,通过拷贝数变异的定量检测结果证明了该系统的定量能力与商品化仪器 Bio-Rad Qx-200 相当(图 2)。

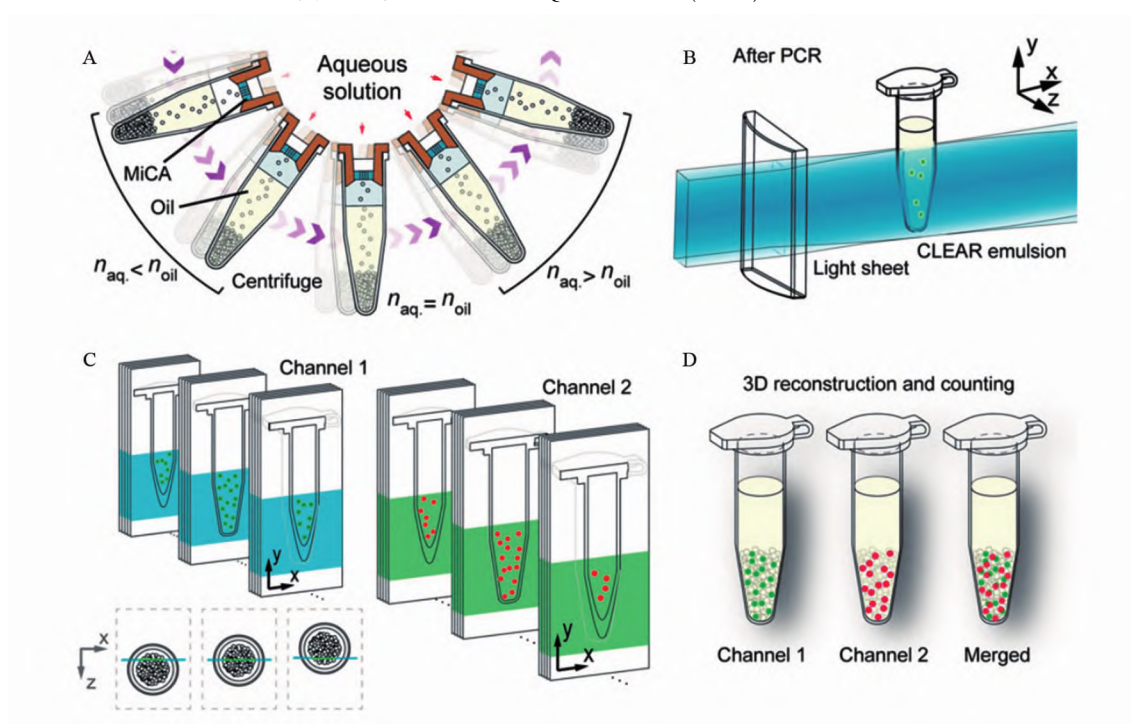


图 2 可应用于多重检测的自制透明液滴数字 PCR 的示意图: (A) 离心产生液滴乳液; (B) 高通量读取 PCR 管中液滴; (C) 双通道光学切片荧光图像,其中记录了所有荧光阳性液滴(红色: HEX/VIC, 绿色: FAM); (D) 基于三维数据的体积重构和双通道图像的精确液滴计数^[56]

Fig.2 Schematic diagram of the home-made transparent droplet digital PCR for multiplex detection: (A) Centrifugation to produce droplet emulsion; (B) High-throughput reading of PCR droplets in a PCR tube; (C) Two-channel optical slice fluorescence image where all fluorescent positive droplets (Red: HEX/VIC, green: FAM) are recorded; (D) Volume reconstruction and accurate droplet counting of dual-channel images based on 3D data^[56]

Bian 等^[57]开发了油饱和液滴数字 PCR 芯片,并利用 FAM 和 VIC 两种荧光染料标记的分子信标实现了对大肠杆菌 O157 和单增李斯特菌的双重检测,检出限可达到 10 CFU/mL。Bai 等^[58]开发了自吸分液式数字 PCR 芯片,建立了针对 lncRNA 的多重检测方法,利用 FAM、HEX 及 CY5 三色荧光通道分别检测 GAPDH、SLC9A3-AS1 和 PCAT6,利用 CCD 相机获取荧光图像,并进行荧光信号统计。该研究为体液中痕量外泌体 lncRNA 的多指标联合检测提供了新方法,并证明了外泌体 lncRNAs 作为肿瘤活检标志物的潜力。

2.2 荧光强度结合荧光信号颜色的多重数字 PCR 检测

单纯依靠荧光信号种类实现多重目标物分析的方法受仪器的荧光通道限制,很难实现更高阶的多重检测。基于荧光强度实现多重的分析方法的基本原理是利用引物探针浓度线性改变信号强度,根据不同的荧光信号强度对模板进行区分^[59]。在数字 PCR 中,常用的信号标记方式除了 Taqman 探针外, DNA 结合染料(例如 Eva Green)也是常用的信号标记方法。在 qPCR 中, DNA 结合染料可结合所有双链 DNA,使得荧光发射强度与 DNA 数量直接相关。数字 PCR 通过在热循环前将样品分割成数万个独立的反应单元,可在一定程度上解决该问题。McDermott 等^[60]证明基于 DNA 结合染料的 ddPCR 获得的结果在精确度和动态范围上与 TaqMan 探针相同,并且利用 Evagreen 同样可在数字 PCR 中通过改变反应条件使不同靶标扩增产生的荧光强度不同,进而实现多重检测。

然而,这种方法产生的荧光分区在 DNA 数量多或 DNA 质量差的情况下难以精准区分,因此,在实际研究过程中,研究者多是将多色荧光信号结合荧光强度的差别实现多重检测^[52]。Zhong 等^[18]在 RainDrop™ 数字 PCR 系统中采取改变不同荧光探针的浓度结合两种荧光通道的方式建立了多重检测方法,仅使用两个荧光基因就建立了脊髓肌萎缩症的 5 重检测体系,并利用该方法在 20 例病人样本中实现了对 3 个基因(SMN1、SMN2、BCKDHA)的拷贝数变异以及单核苷酸突变(c.815A>G, SMN1)的检测。最近, Xiang 等^[61]利用侵入反应在单碱基识别方面具有高度特异性的优势,将其与数字 PCR 技术联用,开发了“侵入性数字 PCR”(Invader-dPCR),用于检测 EGFR 突变,将 dPCR 平台上突变检测的灵敏度提高了 1000 倍。同时,为了降低检测成本,该研究组还基于 Invader-dPCR 建立了“多重”检测模型。在该模型中, VIC 用于药物敏感性突变, FAM 用于药物抗性突变,在一个 dPCR 芯片中可同时检测 16 种药敏突变、一种耐药突变(T790 M)和野生型 DNA,表明使用荧光强度结合不同荧光通道,再采用 dPCR,是实现多重检测的有效策略(图 3)。

2.3 基于熔解曲线分析的多重方法

熔解曲线的多重分析方法是近年来数字 PCR 中新兴的一种多重分析方法^[62]。由于 PCR 产物的熔解温度(T_m)几乎不取决于扩增效率,因此,使用 T_m 值可提高基因分析的准确性^[63]。Tanaka 等^[64]建立了将数字 PCR 与熔解曲线分析相结合的多重检测体系,并将该方法应用于 KRAS 基因分型检测。结果表明,对于野生型 KRAS、G12R 突变体和 G12D 突变体,微孔中 DNA 的 T_m 峰值分别为 68.7、66.3 和 62.6 °C,并且基因型的 T_m 值标准偏差为 0.2 °C。Nakagaw 等^[65]将 dPCR 与熔解曲线分析结合,进行了多重基因检测,利用具有 2×10^4 个反应微孔的硅基数字 PCR 芯片进行不对称 PCR,可获得更多的单链;在反应过程中捕获荧光信号,并测量每个微孔的 T_m 值,通过荧光强度、探针的染料颜色和 T_m 进行基因分型。由于 PCR 产物的 T_m 并不是高度依赖于 PCR 的扩增效率,通过 T_m 值可提高基因分型的准确性。利用该方法同时鉴定了野生型 KRAS、BRAF 和 8 个突变体,证明了方法的可行性。该研究通过数字 PCR 结合四色熔解曲线,首次证明了十重检测癌症相关突变的可行性(图 4)。

2.4 其它多重检测实现方法

不同于 qPCR 技术,基于微流控芯片的数字 PCR 技术除了在荧光通道以及荧光强度方面进行多重研究外,还可在空间维度方面实现多重检测。通过合理设计芯片,可在一个芯片上划分多个进样孔,进而在芯片中实现多重检测。Shen 等^[66]开发了具有多重体积的多重数字 PCR 滑动芯片,将芯片划分为 5 个检测区域,通过多次进样,实现了芯片上的多重检测。该芯片具有 4 种体积(1、5、25 和 125 nL)的腔室,通过简单的阵列加工,动态范围可以达到 2×10^7 copies/mL(图 5A 和 5B)。然而,在一个芯片上进行多次进样,增加了操作复杂度。本研究组在 2020 年开发了自吸分液式的多重数字 PCR 芯片(图 5C 和 5D),该芯片设计有预包埋成分进样口,在无需外接泵阀的条件下即可实现 6 种不同反应组分的预包埋,仅需 1 次加样便可实现 6 种目标的多重检测。利用该芯片成功检测了 EGFR 的多个突变位点^[67]。

3 多重数字 PCR 技术的应用

多重数字 PCR 可通过一次反应即可提供全面、系统的信息,在降低成本并保证精确度的同时,提

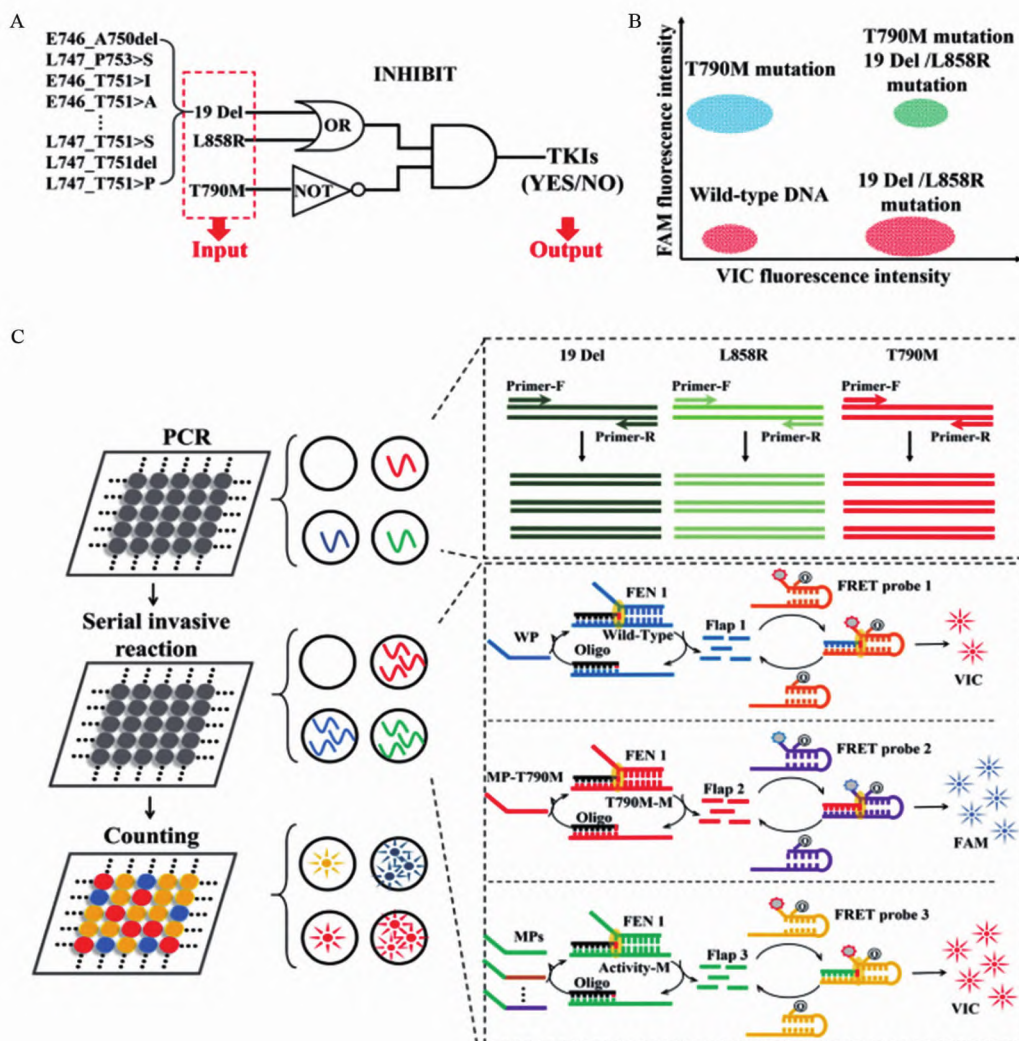


图 3 基于 Invader-dPCR 方法的多重检测示意图: (A) 用于检测 EGFR 突变的 DNA 逻辑传感器的原理; (B) 不同的突变和野生型 DNA 可以通过不同的信号强度组来区分; (C) 多重 Invader-dPCR 方法的示意图。设计了 15 个 19Del 和 L858R 突变的检测探针,具有相同的阅序列(Flap3),与用 VIC 染料标记的 FRET3 探针互补。作为对照,设计了 VIC 标记的 FRET1 探针以捕获 Flap1 标记的野生型 DNA 检测探针。为 T790M 突变设计了另一种标有 Flap2 的检测探针。Flap2 被标记有 FAM 染料的 FRET2 探针捕获以产生 FAM 信号^[61]

Fig.3 Schematic diagram of multiple detection based on the Invader-dPCR method: (A) Principle of DNA logic sensor for detection of EGFR mutations; (B) Different mutant and wild-type DNA distinguished by different signal intensity groups; (C) Schematic diagram of the multiple invader-dPCR method. Fifteen detection probes for 19Del and L858R mutations are designed, with the same valve sequence (Flap3), which are complementary to the FRET3 probe labeled with VIC dye. As a control, a VIC-labeled FRET1 probe is designed to capture the Flap1 label in the detection probe of wild-type DNA. A different detection probe labeled with Flap2 is designed for the T790M mutation. Flap2 is captured by the FRET2 probe labeled with FAM dye to generate FAM signal^[61]

高了检测的效率,因此应用广泛^[63,68-69]。

3.1 肿瘤研究

为了克服传统基于免疫组化的乳腺癌病理分类的缺陷,Chen 等^[70]开发了基于四重数字 PCR 的策略,对乳腺癌亚型进行分类。该方法可用于同时检测雌激素受体 1(ESR1)、孕激素受体(PGR)、erb-b2

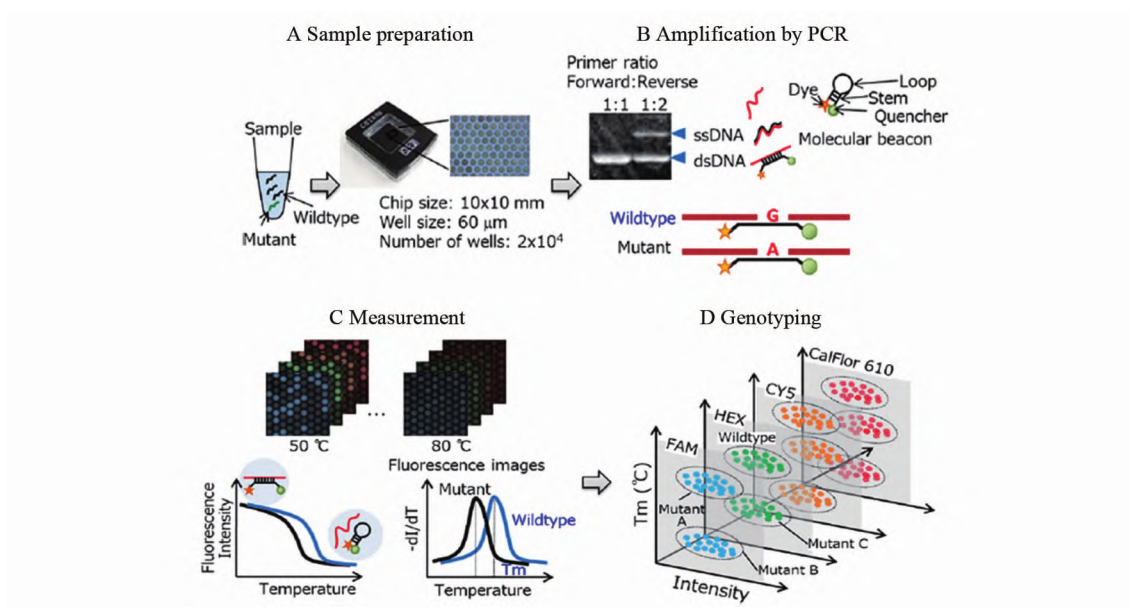


图 4 结合数字 PCR 和熔解曲线分析的多重检测方法: (A) 将包含靶 DNA 的样品加载到具有 2×10^4 微孔的芯片中; (B) 通过不对称 PCR 扩增靶 DNA, 与扩增子杂交的分子信标被用于测量 T_m ; (C) 四色滤光片捕获荧光图像并分析每个微孔的熔解曲线; (D) 基于荧光强度, 染料颜色和 T_m 的基因分型^[65]

Fig.4 A multiplex detection method combining dPCR and melting curve analysis: (A) The sample including the target DNA is mounted in a chip with 2×10^4 microwells; (B) Amplify the target DNA by asymmetric PCR. Molecular beacons hybridized with amplicons are used to measure T_m ; (C) Four-color filter captures fluorescence images and analyzes the melting curve of each microwell; (D) Genotyping based on fluorescence intensity, dye color and T_m ^[65]

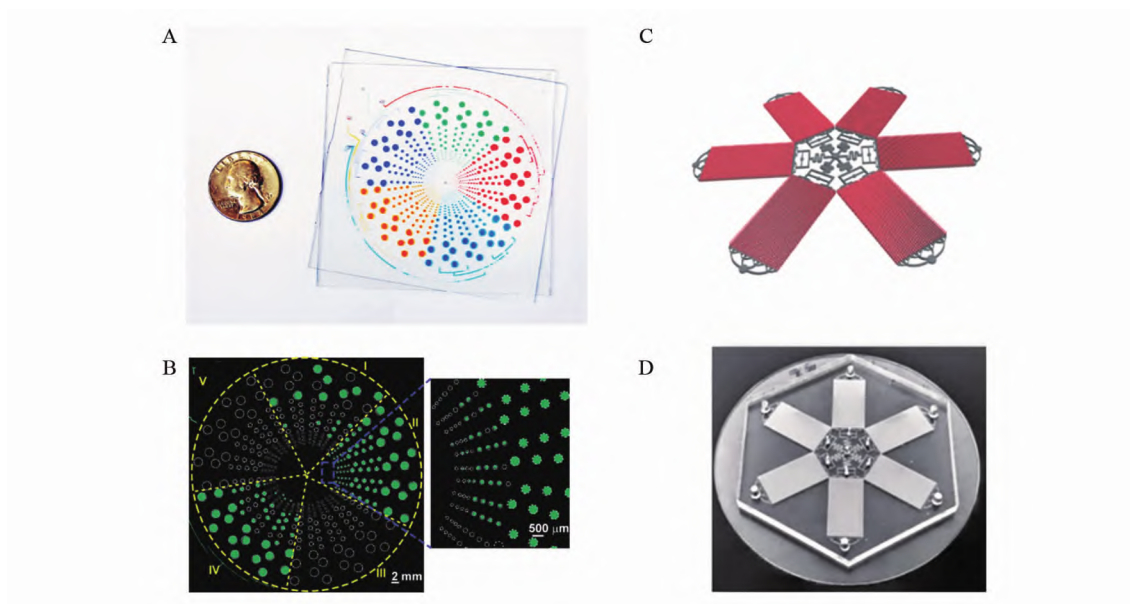


图 5 基于区域划分的用于多重检测的数字 PCR 芯片: (A、B) 滑动芯片照片和多个检测图像^[66]; (C、D) 自吸液多重数字 PCR 芯片的立体结构及实物图^[67]

Fig.5 Digital PCR chip for multiplex detection based on area division: (A, B) SlipChip photos and multiple detection images^[66]; (C, D) 3D structure of self-priming multiplex digital chip and photos^[67]

受体酪氨酸激酶 2 (ERBB2) 和 Pumilio RNA 结合家族成员 1 (PUM1), 所建立的四重数字 PCR 反应具有与免疫组化结果的高度一致性, 其灵敏度及检测时间均优于常规检测方法。Vannitamby 等^[17] 开发了一

种用于检测非小细胞肺癌患者中 PDL1 水平的多重数字 PCR 检测方法,利用 Bio-Rad Qx200™液滴式数字 PCR 开发了一种能同时分析 MMP9、TIMP3 和 PDL1 的多重数字 PCR 检测方法,同时利用基因表达绝对比率准确识别非小细胞肺癌患者体内恶性细胞,并量化 PD-L1 的表达。

3.2 循环肿瘤 DNA(ctDNA) 检测

ctDNA 作为液滴活检的重要标志物,存在于脑脊液、血液等体液中,已成为临床上肿瘤早期诊断、预后判定及用药指导的重要标志物,是多重数字 PCR 的重要应用领域之一^[71-73]。由于数字 PCR 具有从大量野生型分子中精准检测微量突变 DNA 分子的能力,该技术适用于检测样品中的稀有或低丰度等位基因突变,特别是多重数字 PCR 所具备的检测多个突变位点的能力,使得非侵入性准确监测疾病进展成为可能。Yu 等^[74]建立了多重数字 PCR 反应体系,并以血浆中提取的 ctDNA 为样本,评估晚期非小细胞肺癌患者 EGFR 突变情况。结果表明,该方法对 19DEL、L858R 和 T790M 的敏感性分别为 90.9%、87.5% 和 100%,特异性分别为 88.9%、100%和 93.8%。通过对 3 名接受 EGFR-TKI 治疗的患者进行连续 2 个月的动态监测,证明了具有超高灵敏度的多重数字 PCR 技术在定量检测 EGFR 突变中的实用性以及在晚期非小细胞肺癌患者 EGFR-TKI 治疗中的实用性。Hrebien 等^[75]采用多重数字 PCR 分析乳腺癌患者的 ctDNA,采集 71 名女性患者的血样,检测 3 个热突变点 PIK3CA、ESR1 和 ERBB2,以及 AKT1 E17K 位点。利用该方法证明了采用样品保存管的取样方式对 ctDNA 进行突变检测的结果与即时从样品中检测的方式具有高度一致性。Andersen 等^[76]建立了一种用于筛查血浆中的 KRAS、NRAS、BRAF 和 PIK3CA 基因突变的多重数字 PCR 方法,并在已知肿瘤突变状态的胆管癌患者的样本上进行了验证,证明了多重数字 PCR 在多突变位点的精准定量检测能力。作为非侵入性检测的有力工具,游离 DNA (cfDNA) 的质量影响检测结果。Alcaide 等^[77]利用多重数字 PCR 建立了一种简单直接的控制 cfDNA 质量的方法,利用嗅觉受体 OR 基因的不同大小的片段(73~165 bp、166~253 bp、>253 bp)进行验证,无需参考样品和标准曲线,即可估算 cfDNA 的绝对浓度。利用该方法对 117 例血浆样品中的 cfDNA 进行分析,证明了该方法可应用于评估临床样品 cfDNA 的数量、质量和片段大小。Tan 等^[78]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,并设计了两套引物和探针,用于量化 21 号和 18 号染色体的 cfDNA,从而确定样本的状态。利用该技术测试了 60 例临床血浆样本,所有样本均被正确识别,证明了多重数字 PCR 在非侵入性产前诊断的可行性,是一种具有重要应用潜能的产前诊断方法(图 6A)。以 ctDNA 为代表的液体活检作为多重数字 PCR 的重要应用领域,其精准性受到了广泛认可。但是,面对临床上的大量标志物,当前多重数字 PCR 的检测目标数依然不足,因此,提高方法的多重检测目标数,开发新的高阶多重分析方法,是多重数字 PCR 用于临床检测的必经之路。

3.3 二代测序

二代测序是一种通过引入可逆终止末端,在 DNA 复制过程中捕捉新添加的碱基携带的特殊标记,进而确定 DNA 序列的高通量测序技术^[79-80]。DNA 完整性和数量是影响其测序准确性的关键因素,特别是从石蜡包埋的组织中提取的 DNA,由于其质量差异大,会导致测序数据不准确^[81-82]。Didelot 等^[83]建立了一种可检测 DNA 完整性的多重数字 PCR 方法,从 12 个石蜡包埋的肺癌组织中提取 DNA 样品,并检测了 4 种不同的靶标长度(78、159、197 和 550 bp),该方法仅需 1 ng DNA 便可对质量进行评估,同时可以以较低的成本实现可靠的基因组测序(图 6B),通过靶向富集策略减少某些项目的测序量,加快测序的进度,并降低成本。Eiblwieser 等^[84]在多重液滴数字 PCR 中预先扩增患者特异性的 EWS 融合基因,然后采用 Ion S5 系统对该文库进行测序,结果表明,基于多重数字 PCR 的靶向富集与 NGS 的组合提高了鉴定基因组融合序列的成功率。利用该方法对 EWING2008 患者的 ctDNA 水平和临床参数进行分析,发现 ctDNA 拷贝数与患者危险因素之间存在相关性。

3.4 转基因检测

目前,大多数国家对转基因作物(GMOs)的种植和贸易进行监管,并强制要求含有超过一定阈值的转基因生物的食品进行标识,因此,对转基因食品的精准检测尤为重要^[85-86]。随着市场上转基因品系的增加,迫切需要建立一些成本低且精准的高效检测方法。研究表明,数字 PCR 在提高转基因检测灵敏度和监测转基因食品真实性方面具有巨大的应用潜力^[87]。Dobnik 等^[88]利用 Bio-Rad 公司的 ddPCR

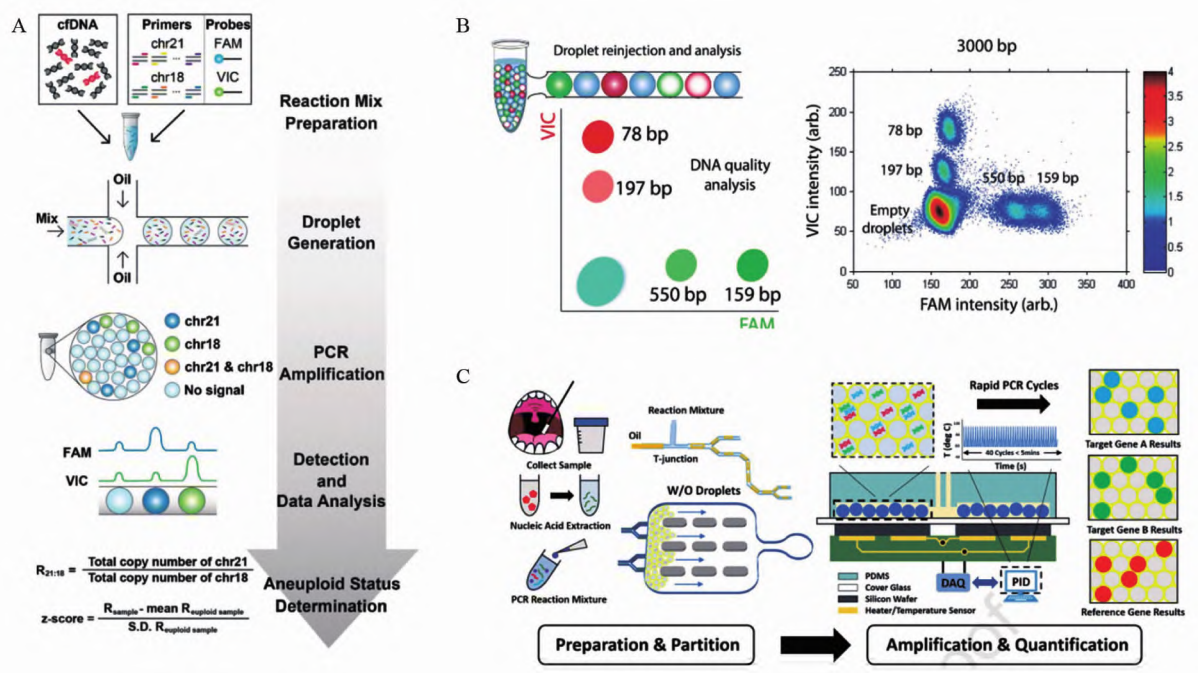


图 6 多重数字 PCR 的应用: (A) 使用多重 ddPCR 的非侵入性胎儿非整倍性检测^[78]; (B) 用于 DNA 质量测定的多重数字 PCR^[83]; (C) 应用于新型冠状病毒检测的超快速数字 PCR^[109]

Fig.6 Application of multiplex digital PCR: (A) Non-invasive fetal aneuploidy detection using multiplex ddPCR^[78]; (B) Multiplex digital PCR for DNA quality determination^[83]; (C) Ultra-fast digital PCR applied to novel coronavirus detection^[109]

平台建立了多重数字 PCR 检测体系,并开发了用于自动化快速分析多重检测数据的新的分析工具,该方法可同时分析 4 种转基因玉米。此外,该研究组还开发了 10-plex 的多重数字 PCR 检测体系,可同时对 12 种欧盟批准的转基因玉米进行监测^[89]。Kosir 等^[90]开发了更高阶的多重 dPCR 检测体系,可对 15 种转基因大豆品系进行定量检测。多重数字 PCR 在保证转基因产品检测的精准性的同时,可降低检测成本,是转基因产品检测有力的支撑工具,为转基因产品的安全性及溯源提供了保障。针对转基因产品品系开发相应的检测试剂盒、不断提高多重检测能力、降低检测成本是未来多重数字 PCR 在转基因产品检测的主要发展方向。

3.5 食源性致病菌

致病性细菌污染严重威胁人类健康,食源性病原菌(包括沙门氏菌、大肠埃希氏菌和单核细胞增生李斯特氏菌等)的相关疾病已引起了广泛关注^[91-93]。低浓度食源性致病菌即可通过乳制品或肉类等产品引起疾病^[94-95],对于高致病性食源性细菌(如布鲁氏菌)^[96]必须建立精准的检测方法^[97-99]。近来,Lei 等^[98]建立了一种针对副溶血弧菌 *tlh*、*tdh* 和 *ureR* 的多重液滴数字 PCR 方法。结果表明,该方法提高了副溶血性葡萄球菌检测的敏感性、特异性及准确性,检出限为 15 CFU/mL。针对单个副溶血弧菌的 4 种基因(*tlh*、*tdh*、*ureR* 和 *orf8*)建立了多重检测方法,对副溶血弧菌的检测灵敏为 39 CFU/mL^[100]。Maheshwari 等^[101]建立了高灵敏的检测亚洲韧皮杆菌和柑橘顽固病螺原体的多重数字 PCR 方法,并证明了该方法比 qPCR 具有更高的灵敏度。该研究还发现,数字 PCR 对抑制剂显示出更高耐受性以及高度一致的检测结果。多重 qPCR 分析的优势在于可降低测试两种病原体的成本,而多重数字 PCR 的优势在于在非常低的浓度下提供了对两种致病菌的绝对定量检测。针对症状相同的食源性致病菌,多重数字 PCR 技术很容易标准化,形成相关的检测试剂盒。但是,由于致病菌具有发病快、症状急的特点,而多重数字 PCR 检测的整个过程通常需要 1~2 h,在时间上限制了其实际应用。因此,开发快速高效的多重数字 PCR 技术以满足致病菌快速检测的要求是当前需要解决的问题之一。

3.6 新冠病毒检测

在新型冠状病毒大流行背景下,实验室诊断测试的安全性和质量面临前所未有的挑战^[102-103]。数字 PCR 在提升检测准确性、降低漏检率等多个方面发挥了重要的作用^[104-106]。多重数字 PCR 是诊断 COVID-19 的替代和补充工具,可以减少漏检率,特别是用于控制 RT-qPCR 所得的模棱两可的结果。De Kock 等^[107]基于 Bio-Rad Qx200 数字 PCR 仪开发了用于 Covid-19 患者筛查的一步式数字 RT-PCR 多重检测方法,可同时检测 SARS-CoV-2 的多个基因,包括 N(N1+N2) 基因、E 基因和 RdRP 基因及人源的 GUSB 管家基因。该方法可在 100 个 GUSB mRNA 拷贝背景下可靠地检测 5 个病毒 RNA 拷贝,并精准定量 10 个病毒 RNA 拷贝,证明 RT-ddPCR 的检测灵敏度不受核酸总背景的影响。Cassinari 等^[108]针对 6 个 SARS-CoV-2 基因组区域开发了一种多重数字 RT-PCR 检测方法。对收集的 130 名 COVID-19 患者的鼻咽拭子和唾液样本进行评估,结果表明,对于鼻咽拭子样品,六重 RT-数字 PCR 与 RT-qPCR 分析结果一致,而六重数字 PCR 检测对鼻咽拭子阳性患者的唾液样本比 RT-qPCR 敏感(85%比 62%)。Yin 等^[109]将液滴数字和快速 PCR 技术结合,利用 FAM、HEX、CY5 建立了检测 SARS-CoV-2 的 ORF1ab、N 以及 RNase P 基因的多重数字 PCR 方法(图 6C)。利用该快速数字多重 PCR 系统分析的阳性和对照病例的临床样本所获得的结果与 qPCR 检测一致。此外,在新冠病毒的检测方法中,良好的参考标准对于检出限的研究至关重要,多重数字 PCR 还可应用于标准品的质量评估,并为测定、质量控制和监管监视提供统一的解决方案^[110]。由于仪器成本及检测成本的问题,面对数量庞大的检测样本,多重数字 PCR 在新冠病毒检测中的应用仍具有局限性。同时,快速的多重数字 PCR 技术对于新冠病毒检测至关重要,因此,通过降低检测成本、开发具有快速升降温能力的 PCR 仪以及兼容性的反应试剂可促进多重数字 PCR 在新冠病毒检测中的应用。

4 结论与展望

作为一种新兴的核酸分子检测技术,数字 PCR 具有高灵敏度和高准确度,是核酸检测的有效方法,具有广阔的应用前景。不同于 qPCR,数字 PCR 是一种以微流控芯片为载体的终点信号检测方法,更加适用于高阶多路复用,在各个领域都有广泛的应用价值,尤其适合于液体活检、肿瘤筛查、产前诊断、致病菌及病毒检测等领域。此外,在各领域相关的生物标志物的数量不断增加的形势下,相关检测研究也面临着新的挑战。在保证精准检测的同时,以最佳方式利用有限样本、避免重复检测的需求越来越突出。多重数字 PCR 在节省检测样本及检测成本的同时,可准确可靠地进行多靶标检测,是满足目前核酸检测需求的理想选择。虽然数字 PCR 具有比 qPCR 技术更好的精确性和灵敏度,但由于数字 PCR 发展起步较晚,并且成本较高,qPCR 依然是临床核酸检测的标准技术。发展多重检测的前提是保证其标准化和规范化,2009 年 qPCR 实验指南提出的最小信息原则(MIQE)^[111]规范了 qPCR 的实验流程及检测方案,并得到了有效推广利用,促进了 qPCR 的发展。类似地,dPCR 的 MIQE^[112]近年也被提出并得到长足的发展^[113]。标准方案的出现有助于数字 PCR 技术的规范化,保障该技术的理性发展,提高资源的有效利用并促进其推广应用。

基于商业化平台的多重数字 PCR 多通过多色荧光通道实现多重检测,尽管这种策略可增加检测靶标的数量,但是多个荧光通道也增加了仪器成本以及体系的复杂性。仪器还需要专门的软件分析定义补偿矩阵,从而避免荧光信号之间的光谱重叠。此外,反应体系的竞争性、引物探针的多次设计优化等问题依然无法避免。目前,对于多重数字 PCR 实现技术,最重要的是优化引物和探针,以实现液滴或者腔室中荧光信号的清晰分离,尤其是在多重反应期间应根据适当的阈值设置优化测定性能。在实际分析优化过程中,具有中间荧光信号强度的分区(即介于阴性和阳性之间)经常会有较大差异,进而导致结果不准确。因此,建立一个多重的反应体系,时间成本、仪器和试剂成本均相对较高。微纳米加工技术的发展有力地促进了多重数字 PCR 的发展,利用芯片设计简单有效地实现多重检测或许是未来实现多重数字 PCR 检测的有效方式之一。

目前,多重数字 PCR 的研究取得了一定的进展,开发新的多重检测方法、提高多重检测的稳定性、降低开发和使用成本,将是促进该技术推广应用的必经之路。

References

- [1] MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1986, 51: 263-273.
- [2] POSTOLLEC F, FALENTIN H, PAVAN S, COMBRISSE J, SOHIER D. *Food Microbiol.*, 2011, 28(5): 848-861
- [3] WHITE A K, VANINSBERGHE M, PETRIV O I, HAMIDI M, SIKORSKI D, MARRA M A, PIRET J, APARICIO S, HANSEN C L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108(34): 13999-14004.
- [4] TEDIM A P, ALMANSA R, DOMINGUEZ-GIL M, GONZALEZ-RIVERA M, MICHELOUD D, RYAN P, MENDEZ R, BLANCA-LOPEZ N, PEREZ-GARCIA F, BUSTAMANTE E, GOMEZ J M, DONCEL C, TRAPIELLO W, KELVIN A A, BOOTH R, OSTADGAVAHI A T, ONEIZAT R, PUERTAS C, BARBE F, FERRERR, MENENDEZ R, BERMEJO-MARTIN J F, EIROS J M, KELVIN D J, TORRES A. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2021: e13501.
- [5] MANZ A, GRABER N, WIDMER H M. *Sens. Actuators, B*, 1990, 1(1-6): 244-248.
- [6] WHITESIDES G M. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373.
- [7] POHL G, SHIH I. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2004, 4(1): 41-47.
- [8] ZOU Y, MASON M G, WANG Y, WEE E, TURNI C, BLACKALL P J, TRAU M, BOTELLA J R. *PLoS Biol.*, 2017, 15(11): 96-104.
- [9] SYKES P J, NEOH S H, BRISCO M J, HUGHES E, CONDON J, MORLEY A A. *Biotechniques*, 1992, 13(3): 444-449.
- [10] BAKER M. *Nat. Methods*, 2012, 9(9): 541-544.
- [11] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [12] SALIPANTE S J, JEROME K R. *Clin. Chem.*, 2019, 66: 117-123.
- [13] SREEJITH K R, OOI C H, JIN J, DAO D V, NGUYEN N T. *Lab Chip*, 2018, 18(24): 3717-3732.
- [14] FINOTTI A, ALLEGRETTI M, GASPARELLO J, GIACOMINI P, SPANDIDOS D A, SPOTO G, GAMBARI R. *Int. J. Oncol.*, 2018, 53(4): 1395-1434.
- [15] KIM J, JOHNSON M, HILL P, GALE B K. *Integr. Biol.*, 2009, 1(10): 574-586.
- [16] KOVARIK M L, ORNOFF D M, MELVIN A T, DOBES N C, WANG Y L, DICKINSON A J, GACH P C, SHAH P K, ALLBRITTON N L. *Anal. Chem.*, 2013, 85(2): 451-472.
- [17] VANNITAMBY A, HENDRY S, IRVING L, STEINFORT D, BOZINOVSKI S. *Lung Cancer*, 2019, 134: 233-237.
- [18] ZHONG Q, BHATTACHARYA S, KOTSOPOULOS S, OLSON J, TALY V, GRIFFITHS A D, LINK D R, LARSON J W. *Lab Chip*, 2011, 11(13): 2167-2174.
- [19] SHEN F, DU W B, DAVYDOVA E K, KARYMOV M A, PANDEY J, ISMAGILOV R F. *Anal. Chem.*, 2010, 82(11): 4606-4612.
- [20] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. *Sensors*, 2018, 18(4): 1271.
- [21] SIMANT D, JIAN Q, RAMESH R. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2876.
- [22] WHALE A S, COWEN S, FOY C A, HUGGETT J F. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58177.
- [23] HINDSON C M, CHEVILLET J R, BRIGGS H A, GALLICHOTTE E N, RUF I K, HINDSON B J, VESSELLA R, TEWARI M. *Nat. Methods*, 2013, 10(10): 1003-1005.
- [24] LIN B, TIAN T, LU Y, LIU D, HUANG M, ZHU L, ZHU Z, SONG Y, YANG C. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2021, 60(14): 7582-7586.
- [25] WU Z, BAI Y, CHENG Z, LIU F, WANG P, YANG D, LI G, JIN Q, MAO H, ZHAO J. *Biosens. Bioelectron.*, 2017, 96: 339-344.
- [26] ROBINSON S, FOLLO M, HAENEL D, MAULER M, STALLMANN D, HEGER L A, HELBING T, DUERSCHMIED D, PETER K, BODE C. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2018, 39(7): 1217-1227.
- [27] HINDSON C M, CHEVILLET J R, BRIGGS H A, GALLICHOTTE E N, RUF I K, HINDSON B J, VESSELLA R L, TEWARI M. *Nat. Methods*, 2013, 10(10): 1003.
- [28] CHEN J, LUO Z, LI L, HE J, LI L, ZHU J, WU P, HE L. *Lab Chip*, 2018, 18(3): 412-421.

- [29] WANG P, JING F, LI G, WU Z, CHENG Z, ZHANG J, ZHANG H, JIA C, JIN Q, MAO H. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 74: 836-842.
- [30] DING Y, CHOO J, DEMELLO A J. *Microfluid. Nanofluid.*, 2017, 21(3): 58.
- [31] CHEN Z T, LIAO P Y, ZHANG F L, JIANG M C, ZHU Y S, HUANG Y Y. *Lab Chip*, 2017, 17(2): 235-240.
- [32] NIE M, ZHENG M, LI C, SHEN F, LIU M, LUO H, SONG X, LAN Y, PAN J Z, DU W. *Anal. Chem.*, 2019, 91(3): 1779-1784.
- [33] LIU W W, ZHU Y, FENG Y M, FANG J, FANG Q. *Anal. Chem.*, 2017, 89(1): 822-829.
- [34] XU P, ZHENG X, TAO Y, DU W. *Anal. Chem.*, 2016, 88(6): 3171-3177.
- [35] WANG Y Z, SOUTHARD K M, ZENG Y. *Analyst*, 2016, 141(12): 3821-3831.
- [36] COHEN D E, SCHNEIDER T, WANG M, CHIU D T. *Anal. Chem.*, 2010, 82(13): 5707-5717.
- [37] THOMPSON A M, GANSEN A, PAGUIRIGAN A L, KREUTZ J E, RADICH J P, CHIU D T. *Anal. Chem.*, 2014, 86(24): 12308-12314.
- [38] KAUR N, TOLEY B J. *Analyst*, 2018, 143(10): 2213-2234.
- [39] ZHOU S, GOU T, HU J, WU W, DING X, FANG W, HU Z, MU Y. *Biosens. Bioelectron.*, 2019, 128: 151-158.
- [40] WU Q, JIN W, ZHOU C, HAN S, YANG W, ZHU Q, JIN Q, MU Y. *Anal. Chem.*, 2011, 83(9): 3336-3342.
- [41] TIAN Q, MU Y, XU Y, SONG Q, YU B, MA C, JIN W, JIN Q. *Anal. Biochem.*, 2015, 491: 55-57.
- [42] UNGER M A, CHOU H P, THORSEN T, SCHERER A, QUAKE S R. *Science*, 2000, 288(5463): 113-116.
- [43] THORSEN T, MAERKL S J, QUAKE S R. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584.
- [44] HEYRIES K A, TROPINI C, VANINSBERGHE M, DOOLIN C, PETRIV O I, SINGHAL A, LEUNG K, HUGHESMAN C B, HANSEN C L. *Nat. Methods*, 2011, 8(8): 649-651.
- [45] SHEN F, DAVYDOVA E K, DU W, KREUTZ J E, PIEPENBURG O, ISMAGILOV R F. *Anal. Chem.*, 2011, 83(9): 3533-3540.
- [46] ZHU Q, XU Y, QIU L, MA C, YU B, SONG Q, JIN W, JIN Q, LIU J, MU Y. *Lab Chip*, 2017, 17(9): 1655-1665.
- [47] TIAN Q, YU B, MU Y, XU Y, MA C, ZHANG T, JIN W, JIN Q. *RSC Adv.*, 2015, 5(100): 81889-81896.
- [48] YIN J, ZOU Z, HU Z, ZHANG S, ZHANG F, WANG B, LV S, MU Y. *Lab Chip*, 2020, 20(5): 979-986.
- [49] DINGLE T C, SEDLAK R H, COOK L, JEROME K R. *Clin. Chem.*, 2013, 59(11): 1670-1672.
- [50] MORLEY A A. *Biomol. Detect. Quantif.*, 2014, 1(1): 1-2.
- [51] HUGGETT J F, COWEN S, FOY C A. *Clin. Chem.*, 2015, 61(1): 79-88.
- [52] WHALE A S, HUGGETT J F, TZONEV S. *Biomol. Detect. Quantif.*, 2016, 10: 15-23.
- [53] GANOVA M, ZHANG H, ZHU H, KORABECNA M, NEUZIL P. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 181: 113155.
- [54] ROBINSON S, FOLLO M, HAENEL D, MAULER M, STALLMANN D, ANDREAS L, HELBING T, DUERSCHMIED D, PETER K, BODE C, AHRENS I, HORTMANN M. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2018, 39(7): 1217-1227.
- [55] MADIC J, JOVELET C, LOPEZ J, ANDRE B, FATIEN J, MIRAN I, HONORE A, MEZQUITA L, BESSE B, LACROIX L, DRONIOU M. *Oncotarget*, 2018, 9(100): 37393-37406.
- [56] LIAO P Y, JIANG M C, CHEN Z T, ZHANG F L, SUN Y, NIE J, DU M J, WANG J B, FEI P, HUANG Y Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2020, 117(41): 25628-25633.
- [57] BIAN X, JING F X, LI G, FAN X, JIA C, ZHOU H, JIN Q, ZHAO J. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 74: 770-777.
- [58] BAI Y A, QU Y L, WU Z H, REN Y J, CHENG Z L, LU Y X, HU J, LOU J T, ZHAO J L, CHEN C, MAO H J. *Biosens. Bioelectron.*, 2019, 142: 111523.
- [59] DENIS J A, GUILLERM E, COULET F, LARSEN A K, LACORTE J M. *Mol. Diagn. Ther.*, 2017, 21(6): 587-600.
- [60] MCDERMOTT G P, DO D, LITTERST C M, MAAR D, HINDSON C M, STEENBLOCK E R, LEGLER T C, JOUVENOT Y, MARRS S H, BEMIS A, SHAH P, WONG J, WANG S L, SALLY D, JAVIER L, DINIO T, HAN C X, BRACKBILL T P, HODGES S P, LING Y F, KLITGORD N, CARMAN G J, BERMAN J R,

- KOEHLER R T, HIDDENESSEN A L, WALSE P, BOUSSE L, TZONEV S, HEFNER E, HINDSON B J, CAULY T H, HAMBY K, PATEL V P, REGAN J F, WYATT P W, KARLIN-NEUMANN G A, STUMBO D P, LOWE A. *Anal. Chem.*, 2013, 85(23): 11619-11627.
- [61] XIANG Z, ZOU B, ZHANG L, MA X, QI X, WEI W, SONG Q, ZHOU G. *Sens. Actuators, B*, 2020, 320: 128362
- [62] MONIRI A, MIGLIETTA L, MALPARTIDA-CARDENAS K, PENNISI I, CACHO-SOBLECHERO M, MOSER N, HOLMES A, GEORGIU P, RODRIGUEZ-MANZANO J. *Anal. Chem.*, 2020, 92(19): 13134-13143.
- [63] MONIRI A, MIGLIETTA L, HOLMES A, GEORGIU P, RODRIGUEZ-MANZANO J. *Am. Chem.*, 2020, 92(20): 14181-14188.
- [64] TANAKA J, NAKAGAWA T, SHIRATORI A, SHIMAZAKI Y, UEMATSU C, KAMAHORI M, YOKOI T, HARADA K, KOHARA Y. *Sci. Rep.*, 2019, 9: 2626.
- [65] NAKAGAWA T, TANAKA J, HARADA K, SHIRATORI A, SHIMAZAKI Y, YOKOI T, UEMATSU C, KOHARA Y. *Anal. Chem.*, 2020, 92(17): 11705-11713.
- [66] SHEN F, SUN B, KREUTZ J E, DAVYDOVA E K, DU W B, REDDY P L, JOSEPH L J, ISMAGILOV R F. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133(44): 17705-17712.
- [67] YIN J, ZOU Z, YIN F, LIANG H, HU Z, FANG W, LV S, ZHANG T, WANG B, MU Y. *ACS Nano*, 2020, 14(8): 10385-10393.
- [68] LASHAM A, TSAI P, FITZGERALD S J, MEHTA S Y, KNOWLTON N S, BRAITHWAITE A W, PRINT C G. *Cancers*, 2020, 12(3): 769.
- [69] PROFAIZER T, SLEV P. *Clin. Chem.*, 2020, 66(1): 229-238.
- [70] CHEN W, ZHENG J, WU C, LIU S, CHEN Y, LIU X, DU J, WANG J. *Clin. Chem.*, 2019, 65(8): 1051-1059.
- [71] TSAO S C, WEISS J, HUDSON C, CHRISTOPHI C, CEBON J, BEHREN A, DOBROVIC A. *Sci. Rep.*, 2015, 5: 11198.
- [72] POSTEL M, ROOSEN A, LAURENT-PUIG P, TALY V, WANG-RENAULT S F. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2018, 18(1): 7-17.
- [73] CABEL L, DECRAENE C, BIECHE I, PIERGA J Y, BENNAMOUN M, FUKS D, FERRAZ J M, LEFEVRE M, BAULANDE S, BERNARD V, VACHER S, MARIANI P, PROUDHON C, BIDARD F C, LOUVET C. *Cancers*, 2019, 11(3): 396.
- [74] YU Q, HUANG F, ZHANG M L, JI H Y, WU S C, ZHAO Y, ZHANG C Y, WU J, WANG B L, PAN B S, ZHANG X, GUO W. *Mol. Med. Rep.*, 2017, 16(2): 1157-1166.
- [75] HREBIEN S, O'LEARY B, BEANEY M, SCHIAVON G, FRIBBENS C, BHAMBRA A, JOHNSON R, GARCIA-MURILLAS I, TURNER N. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0165023.
- [76] ANDERSEN R F, JAKOBSEN A. *Clin. Chim. Acta*, 2016, 458: 138-143.
- [77] ALCAIDE M, CHEUNG M, HILLMAN J, RASSEKH S R, DEYELL R J, BATIST G, KARSAN A, WYATT A W, JOHNSON N, SCOTT D W, MORIN R D. *Sci. Rep.*, 2020, 10: 12564.
- [78] TAN C, CHEN X, WANG F, WANG D, CAO Z, ZHU X, LU C, YANG W, GAO N, GAO H, GUO Y, ZHU L. *Analyst*, 2019, 144(7): 2239-2247.
- [79] MARDIS E R. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2013, 6: 287-303.
- [80] SCHUSTER S C. *Nat. Methods*, 2008, 5(1): 16-18.
- [81] PATEL R K, JAIN M. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30619.
- [82] MCDONOUGH S J, BHAGWATE A, SUN Z, WANG C, ZSCHUNKE M, GORMAN J A, KOPP K J, CUNNINGHAM J M. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0211400.
- [83] DIDELOT A, KOTSOPOULOS S K, LUPO A, PEKIN D, LI X Y, ATOCHIN I, SRINIVASAN P, ZHONG Q, OLSON J, LINK D R, LAURENT-PUIG P, BLONS H, HUTCHISON J B, TALY V. *Clin. Chem.*, 2013, 59(5): 815-823.
- [84] EIBLWIESER J, KRUMBHOLZ M, SEMPER S, ZIERK J, METZLER M. *Klin. Paediatr.*, 2019, 231(3): 10.
- [85] QIAN C, WANG R, WU H, PING J, WU J. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 2018, 109: 19-31.

- [86] AGHILI Z, NASIRIZADEH N, DIVSALAR A, SHOEIBI S, YAGHMAEI P. *Biosens. Bioelectron.*, 2017, 95: 72-80.
- [87] KOSIR A B, DEMSAR T, STEBIH D, ZEL J, MILAVEC M. *Food Chem.*, 2019, 294: 73-78.
- [88] DOBNIK D, STEBIH D, BLEJEC A, MORISSET D, ZEL J. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 35451.
- [89] DOBNIK D, SPILSBERG B, BOGOZALEC KOSIR A, HOLST-JENSEN A, ZEL J. *Anal. Chem.*, 2015, 87(16): 8218-8226.
- [90] KOSIR A B, SPILSBERG B, HOLST-JENSEN A, ZEL J, DOBNIK D. *Sci. Rep.*, 2017, 7: 8601.
- [91] JANG M, JEONG S W, BAE N H, SONG Y, LEE T J, LEE M K, LEE S J, LEE K G. *BioChip J.*, 2017, 11(4): 329-337.
- [92] WU W, YU C, WANG Q, ZHAO F, HE H, LIU C, YANG Q. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2020, 60(14): 2353-2368.
- [93] WANG Y, KE Y, LIU W, SUN Y, DING X. *ACS Sens.*, 2020, 5(5): 1427-1435.
- [94] LI Z, PAN L, LYU L, LI J, JIA H, DU B, SUN Q, ZHANG Z. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2020, 26(2): 213-219.
- [95] MA H, LI J, XI X, XU H, WURI L, BIAN Y, YU Z, REN M, DUO L, SUN Y. *J. Food Prot.*, 2018, 81(11): 1791-1799.
- [96] BAYRAMOGLU G, OZALP V C, OZTEKIN M, ARICA M Y. *Talanta*, 2019, 200: 263-271.
- [97] WANG M, YANG J, GAI Z, HUO S, ZHU J, LI J, WANG R, XING S, SHI G, SHI F. *Int. J. Food Microbiol.*, 2018, 266: 251-256.
- [98] LEI S, GU X, ZHONG Q, DUAN L, ZHOU A. *Food Control*, 2020, 114: 107207.
- [99] SALIPANTE S J, JEROME K R. *Clin. Chem.*, 2020, 66(1): 117-123.
- [100] LEI S, GU X, XUE W, RONG Z, WANG Z, CHEN S, ZHONG Q. *Front. Microbiol.*, 2020, 11: 1727.
- [101] MAHESHWARI Y, SELVARAJ V, GODFREY K, HAJERI S, YOKOMI R. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0242392.
- [102] GROSS R, CONZELMANN C, MULLER J A, STENGER S, STEINHART K, KIRCHHOFF F, MUNCH J. *Lancet*, 2020, 395(10239): 1757-1758.
- [103] WANG W, XU Y, GAO R, LU R, HAN K, WU G, TAN W. *J. Am. Med. Assoc.*, 2020, 323(18): 1843-1844.
- [104] POGGIO P, SONGIA P, VAVASSORI C, RICCI V, BANFI C, BARBIERI S S, GAROFFOLO G, MYASOEDOVA V A, PIACENTINI L, RAUCCI A, SCOPECE A, SOMMARIVA E, VINCI M C, CARCIONE D, BIONDI M L, MANCINI M E, FORMENTI A, ANDREINI D, ASSANELLI E M, AGOSTONI P, CAMERA M, COLOMBO G I, PESCE M. *Sci. Rep.*, 2021, 11: 4310.
- [105] LIU X, FENG J, ZHANG Q, GUO D, ZHANG L, SUO T, HU W, GUO M, WANG X, HUANG Z, XIONG Y, CHEN G, CHEN Y, LAN K. *Emerging Microbes Infect.*, 2020, 9(1): 1175-1179.
- [106] GNIAZDOWSKI V, MORRIS C P, WOHL S, MEHOKE T, RAMAKRISHNAN S, THIELEN P, POWELL H, SMITH B, ARMSTRONG D T, HERRERA M, REIFSNYDER C, SEVDALI M, CARROLL K C, PEKOSZ A, MOSTAFA H H. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, 73(4): E860-E869.
- [107] DE KOCK R, BASELMANS M, SCHARNHORST V, DEIMAN B. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2021, 40(4): 807-813.
- [108] CASSINARI K, ALESSANDRI-GRADT E, CHAMBON P, CHARBONNIER F, GRACIAS S, BEAUSSIRE L, ALEXANDRE K, SARAFAN-VASSEUR N, HOUDAYER C, ETIENNE M, CARON F, PLANTIER J C, FREBOURG T. *Clin. Chem.*, 2021, 67(5): 736-741.
- [109] YIN H, WU Z, SHI N, QI Y, JIAN X, ZHOU L, TONG Y, CHENG Z, ZHAO J, MAO H. *Biosens. Bioelectron.*, 2021: 113282.
- [110] ZHOU H, LIU D, MA L, MA T, XU T, REN L, LI L, XU S. *Anal. Chem.*, 2021, 93(2): 715-721.
- [111] BUSTIN A, BENES V, GARSON J A, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL M W, SHIPLEY G L. *Clin. Chem.*, 2009, 55(4): 611-622.

- [112] HUGGETT J F, FOY C A, BENES V, EMSLIE K, GARSON J A, HAYNES R, HELLEMANS J, KUBISTA M, NOLAN R, PFAFFL M W, PFAFFL M W, SHIPLEY G L, VANDESOMPELE J, WITTEWER C T, BUSTIN S A. *Clin. Chem.*, 2013, 59(6) : 892-902
- [113] HUGGETT J F. *Clin. Chem.*, 2020, 66(8) : 1012-1029.

Multiplex Digital Polymerase Chain Reaction Technology and Its Application

YIN Ju-Xin^{1,2}, XIA Li-Ping², ZOU Zhe-Yu², MU Ying*²

¹(*School of Information and Electrical Engineering,
Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China*)

²(*Research Center for Analytical Instrumentation,
State Key Laboratory of Industrial Control Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*)

Abstract Digital polymerase chain reaction (PCR) , as a nucleic acid detection technology with wide application prospect, has become one of the most accurate nucleic acid detection technology at present. Multiplex detection is an important direction for the development of digital PCR technique. With the development of microfluidic technology, multiplex digital PCR technique has become more and more mature. This paper reviewed the research progresses of multiplex digital PCR in recent years, especially summarized the implementation of multiplex digital PCR technique in the past five years, and introduced the application of multiplex digital PCR technique in hot areas such as liquid biopsy, transgenic detection, and SARS-Cov-2 detection. Finally, the issues and challenges faced by multiplex digital PCR technique were discussed and the future direction of the technology was foreseen.

Keywords Digital polymerase chain reaction; Microfluidics; Multiplex detection; Review

(Received 2021-05-28; accepted 2021-07-29)

Supported by the National Program on Key Research Project of China(No.2019YFE0103900) and the National Natural Science Foundation of China (No.32071481) .