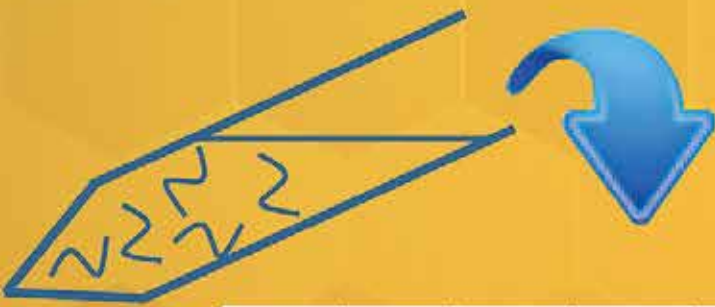


生命奥秘

总 118 期 2019/9
LIFEOMICS

数字PCR



	~			
			~	
		~		
~			~	



无奇不有
生命世界
解读生命
走进科学

目录 CONTENTS

专题：数字PCR

前言	01
数字PCR：简介，应用与MIQE指南	02
一、数字PCR简介	02
二、dPCR的应用	06
三、dPCR的特征	07
四、dPCR的组成部分	09
五、dPCR的MIQE指南	11
数字PCR的时代正在来临	19
一、成本更高，精度也更高	20
二、芯片上的dPCR	21
三、液滴中的dPCR	23
四、dPCR的思考	24

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

专题

数字PCR

梁晨，男，研究生，研究方向：生物物理学

前言

数字PCR（dPCR）技术越来越受到人们的关注。dPCR可以精确定量核酸、测量拷贝数差异和检测稀有变异。随着科技的进步，dPCR逐渐成为一种实用的低成本技术。

数字PCR： 简介、应用与MIQE指南

与实时定量PCR（qPCR）相比，dPCR的重复性更高、受抑制剂的影响更小，这在研究和诊断领域产生重大影响。然而，与qPCR一样，完成准确可靠的dPCR实验需要周详的实验设计和充分的过程控制。为有助于独立评估实验数据，全面披露所有相关的实验信息是必须的。为了推动这一过程，业界出版了dPCR实验的最少信息指南（Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiment Guidelines, dMIQE）。本文阐述了dPCR在技术开发和商业化的早期阶段已经确定的技术要求。科学界采用dPCR的MIQE指南将有助于标准化实验方案、最大限度地有效利用资源，并增强这一颇有前景的新技术的影响力。

一、数字PCR简介

数字PCR（digital PCR, dPCR）已经发展成为具有独特应用优势的主流技术。它对分子分析的重大影响方面不但包括临床应用，如生物标志物分析、病毒检测、预后监测和胎儿筛查，还包括研究应用，如噬菌体-宿主相互作用和细胞内分析。此外，dPCR也可用于协助大规模平行（或NGS）测序方法所需的文库制备。

dPCR是在大量独立的分区（也称为反应室）中运用实时法或终点法进行数据搜集的PCR。数百至数百万个这样的分区中存在稀释后的模板，由于模板量少于分区数，使得至少一部分分区不包含靶序列的拷贝。我们可以计算检测到靶序列扩增的分区数（被认为是阳性）和没有检测到扩增的分区数（被认为是阴

性）来获得定量结果。对阳性分区的占比应用泊松校正（Poisson correction）来实现每个分区靶序列平均数的量化。这指明了一些分区中可能存在多个模板的事实。

对单个样品使用96孔或384孔板既不实用，也不经济，结果还不是非常准确，dPCR的更广泛实施需要应用纳米流体技术和乳液化学。以下三项与仪器相关的功能改进有助于扩大dPCR的使用：

- 分区容量降至5 pL；
- 分区过程自动化；
- 在某些情况下，单个实验的分区数量增至10万个以上。

这三种技术的进步简化了dPCR并提高了其精确度，同时使得一个dPCR反应的总体积类似于传统的qPCR。

目前，dPCR仪器可在芯片上通过油包水乳液或液滴来实现分区：

A. 基于芯片的方法：dPCR在小体积的固体分区中进行，对各个反应进行实时分析或终点分析。代表性的扩增曲线和阴性结果可通过图谱显示（图1）。虽然各个分区的实时扩增图对于dPCR不是必需的，但在分析开发阶段是有用的，它们可以使用户理解技术上的细微差别。dPCR芯片可用于平行分析多个样品，与定量实时PCR（qPCR）一样，这些实验可实现自动化。然而，目前芯片平台可用的分区数量通常在几千的量级上，小于液滴方法dPCR提供的分区数量。鉴于此，芯片的动态范围相对较窄，我们需要在实验前通过dPCR滴定实验或qPCR分析来明确适合芯片法dPCR上机时需要的样品稀释倍数，以保证结果的准确性。

B. 基于乳液（或液滴）的方法：dPCR在油包水乳液液滴中进行。与大多数基于芯片的仪器相比，液滴法dPCR提供了实现更多分区和更低运行成本的解决方案。分区的数目决定了理论动态范围，并且影响指定浓度下的定量精确度。增加液滴法dPCR的动态范围，可以分析任何给定精度的、更大范围的样品浓度。尽管目前的液滴法商业仪器暂时还不能收集实时数据或在PCR后进行熔解曲线分析，但是人们已经开发出可采集实时信号的实验室原型机。商业化仪器数据通常表示为1D 或2D维度的散点图，根据单通道或双通道dPCR的荧光强度，在不同的簇中显示液滴群（图2）。虽然这种数据格式与更熟悉的实时扩增图不同，但在实验方法优化和验证过程方面提供了有价值的信息。

选择哪种dPCR仪器取决于实际的应用需求，需要仔细评估通量、预算、动态范围和精度。对于dPCR用户来说，这是一个激动人心的时刻，因为仪器提供商正在提供越来越多的dPCR形式，每种形式都有各自的优缺点。

资讯 · 频道

www.LifeOmics.com



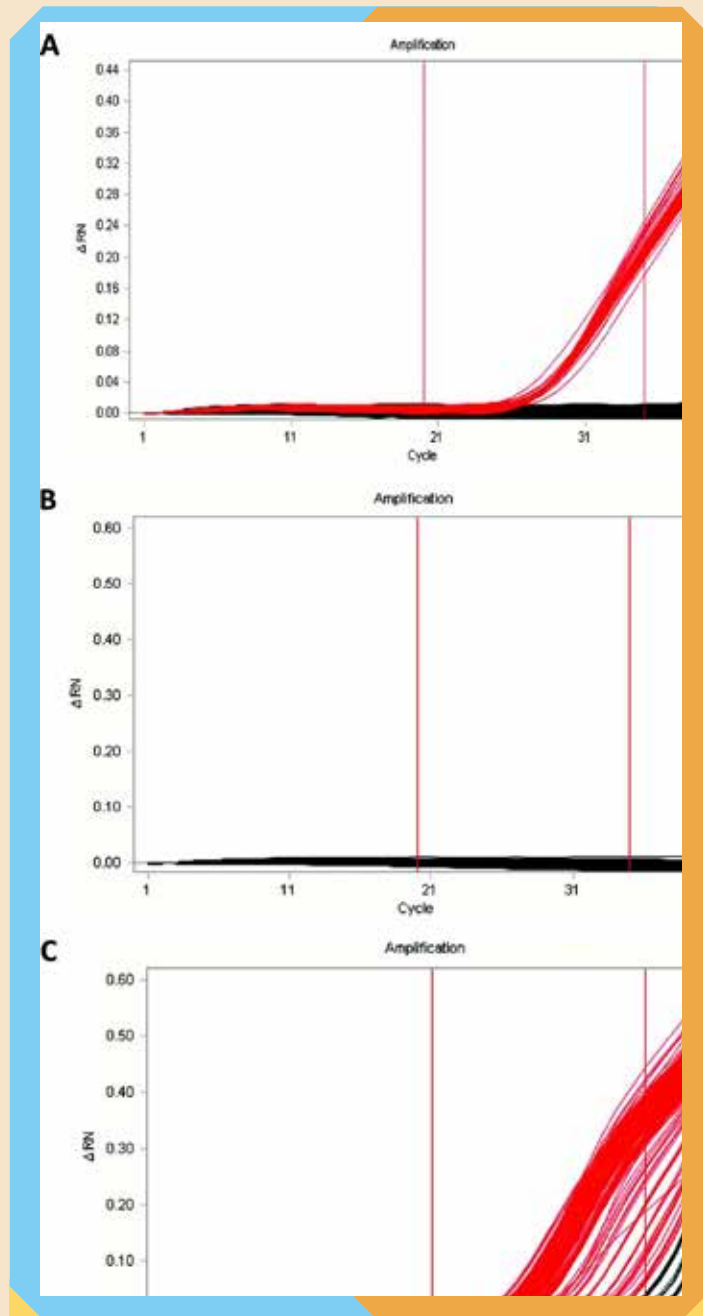


图1 芯片式dPCR的数据输出示例 (Fluidigm Biomark)。

实时PCR扩增图显示A. 优化好的实验结果中，阳性和阴性分区差别显著；B. 无模板对照 (NTC) 反应；C. 阳性和阴性分区差异不明显的实验结果。

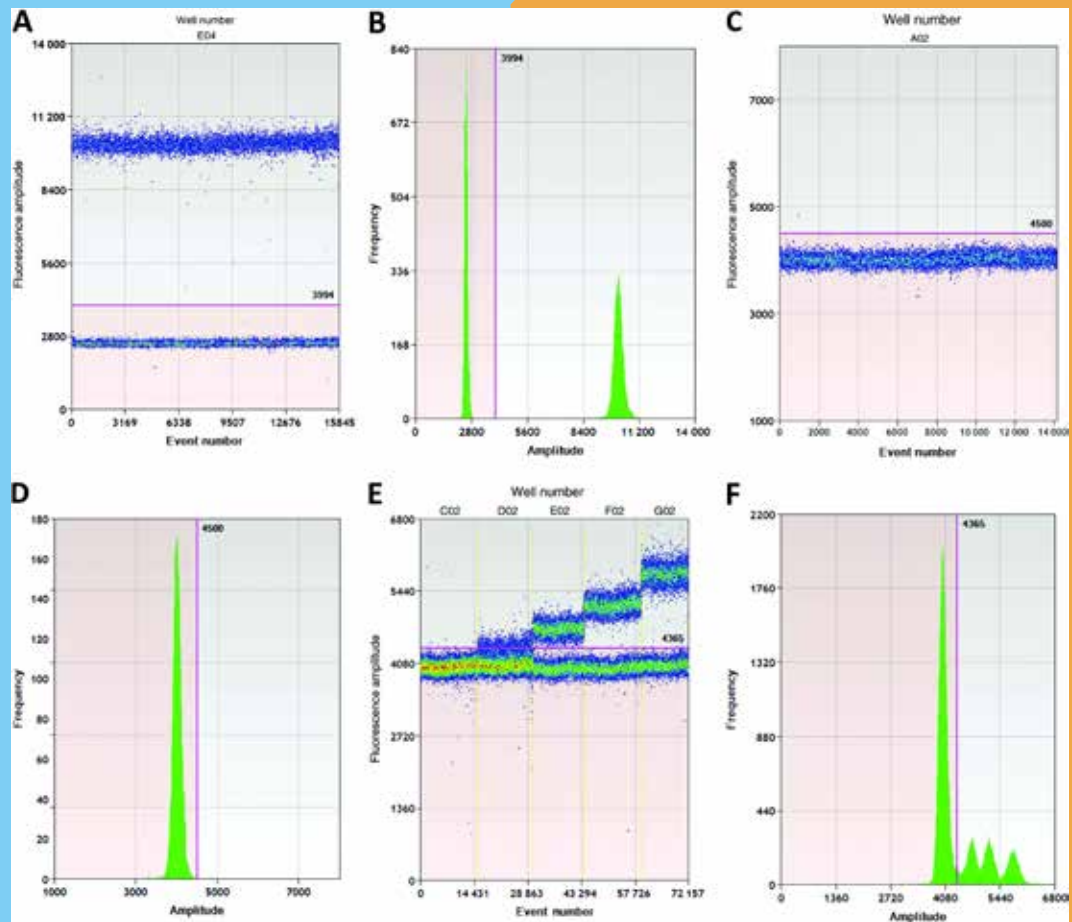


图2 液滴式dPCR的数据输出示例 (Bio-Rad QX100)。

1D散点图和直方图展示的是一个优化过的dPCR实验结果，阳性和阴性的液滴层分隔很明显（图A和图B）；无模板对照（NTC）的1D散点图和直方图（图C和图D）；退火温度的优化显示阴性液滴层和阳性液滴层逐渐分离（图E和图F）。

二、dPCR的应用

1. 稀有变异的检测

dPCR最初被开发用于检测低丰度靶标，即在大量野生型序列的背景下测量低拷贝数的突变序列。稀有突变的检测和定量在癌症的诊断和分期等应用上非常重要。通过对含有稀有突变的样品进行有限稀释，可使野生型基因序列的背景信号减少，从而增加在含有稀有变

异的分区中检测出阳性信号的可能性。使用dPCR方法可以检测低至1/100,000的突变频率。随着分区数量的增加，dPCR灵敏度也会增加，为稀有变异鉴定提供了一种经济有效的替代方案。

2. 分子计数

在qPCR方法中，定量循环数（quantification cycle, Cq）取决于仪器、荧光报告染料和扩增效率等变量，与之不同，dPCR方法取决于发生成功扩增反应的分区数量的简单计数。在理想的dPCR实验中，阳性分区的计数是确定的，并且不需要校准曲线

来将Cq转换为拷贝数，只需要知道分区数和分区体积就足够了。这使得dPCR在理论上比qPCR更可重复（在一定时间内，相同的操作者、仪器和条件），以及更可重现（通过不同的操作者、仪器和条件）。高重复性和高重现性是检测技术非常重要的指标。

3. 需要更高精度的应用

正确设计并正确执行的dPCR实验比qPCR实验更精确。当测量cDNA浓度或估计与染色体重排或基因/染色体剂量相关的遗传拷贝数变异时，经常需要这种精确的测量。虽然qPCR经常被用于量化小的差异，但是这通常并不合适，因为qPCR在最佳和理想条件下只能测量1.25-1.5倍的差异。而与qPCR相比，

dPCR则能够测量小于1.2倍的差异。

dPCR是常规需要精确定量分子数的有效工具。然而，为了使其成为一种更重要的常规技术，我们需要在早期的研究采用规范的dPCR实验设计，并在论文发表/出版物出版时提供足够的实验细节。目前已经有一些dPCR相关联的法则需要采用更多的实验结果来对其

进行检查、验证或者修改。鉴于此，我们有必要确定dPCR实验（dMIQE）指南的哪些参数

确实适用于dPCR，并核实应提供哪些额外的数字PCR特定要求和指标。

三、dPCR的特征

1. 绝对定量

在qPCR中，“绝对定量”（absolute quantification）这个术语是指通过测定已知浓度的标准品（如合成的寡核苷酸）得到的标准曲线来对待测的靶标浓度进行定量。相反，dPCR中使用的术语“绝对定量”是指通过对阳性分区相较于分区总数的比例及其分区体积进行计算得出的数值。当样品充分稀释时，大多数分区不含靶标分子，而阳性扩增的分区最可能含有单分子。随着样品浓度的增加，在阳性分区内存在多于1个分子的概率增大。然而这不会造成太大的问题，因为靶标分子在整个分区中的分布近似于泊松分布，可进行泊松校正。尽管dPCR测定的动态范围可以超出分析的分区数量，但测量的精确度在靶标分子浓度过高和过低时都会下降。相比之下，qPCR精

确度仅在拷贝数非常低时才会降低。

虽然dPCR的主要优势是不需要校准曲线的精确定量，但是其它因素会影响dPCR的准确性。鉴于dPCR仅测量被扩增片段的拷贝数，因此序列受损、抑制剂存在或灵敏度较低等情况可能会影响扩增的发生。已有靶标丢失实验证明使用双通道dPCR（duplex

dPCR）检测2个连锁靶标时，存在部分分区仅能扩增1个靶标的情况。当需要绝对计数时，大量的靶标丢失需要通过校准进行控制。影响模板扩增的其它因素还包括DNA完整性（例如片段长度）、化学修饰（例如甲醛交联）和变性状态（单链、双链）。在测量RNA时，还必须考虑逆转录的效率。

2. 高精确度

精确度是重复测量结果之间的接近度的度量，并且通常在指定的测量条件下以数值方式表示为标准差（Standard Deviation, SD）、方差（Variance）或变异系数（coefficient of variation, CV）。dPCR比qPCR更精确，适用于非常低的拷贝数测定。dPCR所特有的优

势是在复杂的背景下，能够以高精度测量极低浓度的特定DNA序列且无需标准曲线。然而，dPCR目前不如qPCR通用，而且qPCR允许在超过9个数量级的动态范围内进行相当精确的测量，这远远大于目前可用的dPCR仪器所提供的动态范围。此外，对于该动态范围的大部

分，qPCR的相对标准差是相近的（噪声在对数标度上是同方差的）。相反，尽管dPCR可以产生非常精确的测量结果，但绝对精度取决于每个分区的平均摩尔数（由原始样品浓度及其制备方式决定）和分区数量。当每个分区的平均分子数非常低，或者阳性分区的数量达到饱和时，精度则会变差。此外，dPCR最适合每个分区约1.59个分子的最佳浓度。因此，对于最精确的测量，需要在测量前对浓度进行估计。

dPCR的理论精确度似乎比qPCR更容易预测，因为以二项分布为基础模型具有已知的方差，可用于计算置信区间（CI）。早期证据表明，使用不同引物时，dPCR的精确度

也比qPCR更稳定，这使功效计算更容易。

值得注意的是，当测量给定的核酸分子时，尽管dPCR技术可以是精确的和可重现的，但是定量的准确度可能会受从复杂的生物材料中提取核酸这一方法的影响。因此，对待测样品选择合适的实验重复是很重要的，实验设计应包括足够的生物学重复，以允许整个实验过程可重复；如果整个流程均有核酸的提取，那么很可能导致dPCR测量的误差增加。复制整个实验程序是应该的，因为它包括生物样品使用的整个过程。样品提取导致误差的增加不仅包括核酸提取量的变化，还可能包括对下游PCR和/或逆转录反应产生不利影响的共抑制因子（如抑制剂）。

3. 对抑制剂的敏感性低

与qPCR相比，dPCR对抑制剂具有更高的耐受性，因为dPCR不依赖于扩增曲线，而扩增曲线在qPCR中特别容易受到微量抑制剂影响。尽管如此，dPCR仍然会受到完全抑制反应的严重抑制剂的影响，这些抑制剂可能

是引物和试剂特异的。因此dPCR应设计对照实验，以确保反应体系中的抑制剂不会导致dPCR出现未检测到阳性扩增的问题，特别是在报告阴性结果时。

4. 反应优化

在有关dPCR的论文和出版物中很少详述有关PCR分析优化的信息，目前尚不清楚这是一种疏忽还是反映了实验通常未得到优化这一事实。如果是后者，随着dPCR成本的降低这已经变得不太可接受。虽然dPCR产生的信号不太依赖于扩增，但还是需要保证必要的扩增效率，使其灵敏度达到必须能够检测单拷贝这一要求。由于dPCR依赖于大量分区中成功扩

增的反应，而每个反应都含有单个或少量的模板分子，因此dPCR尤其依赖于精心设计的优化分析。

设计dPCR所考虑的因素类似于qPCR，这些因素包括计算机引物特异性筛选，例如基本局部比对搜索工具（Basic Local Alignment Search Tool, BLAST）、避免引物二聚体和二级结构，以及假基因。尽管已经有许多很好的

优化过的商业化qPCR测试方法，但对于新设计的实验，进行适合本实验室的dPCR方法优化是必要的。虽然人们可能期望将一种适用于qPCR的方法应用于dPCR也能很好地发挥作用，但这种普遍的假设也应该通过实验确认。退火温度梯度可用于优化阳性分区与阴性分区之间的分层（图2）。当使用完整的质粒DNA等结构更复杂的模板时，可能需要增加循环数。对dPCR实验的拷贝数、扩增效率、线性范围和灵敏度进行初步评估可以增加dPCR方

法的稳健性。

评估dPCR实验的一种简单方法是设计针对同一模板的不同引物对（单通道或者多通道模式）进行测定并相互验证。对于基因组DNA（gDNA），可以将新的检测方法与已有的、针对相同靶标的充分验证过的检测方法进行比较。如果对比测定的结果非常一致，则可提供另一种可信度，证明测定方法可能是合理的。如果要进行多通道分析，则需要将每个通道与对应的单通道结果进行比较。

四、dPCR的组成部分

1. DNA靶标

对于较小的线性DNA分子，dPCR的表现是最佳的，而环状超螺旋DNA分子可导致灵敏度降低。此外，对较大的复杂gDNA进行片段化也可改进dPCR的效果。当进行dPCR时，定量串联序列（同一分子上存在的相同序列的重复）是一个独特的挑战：串联的序列不能在不同的分区中单独测量。通常在真核细胞、细菌和病毒基因组中发生的此类串联序列与某些癌症基因型相关。尽管dPCR的精确度可为基因组不稳定性的预后监测提供新的临床机会，

但当分析串联序列时，运用物理分离的方法对它们进行独立测量是必需的。预扩增、使用不切割靶区域限制酶消化和超声破碎等方法为该问题提供了潜在的解决方案。

另一个重要的考虑因素是进行分析时模板DNA是单链还是双链。双链DNA分子只能占据1个分区。如果该分子变性为2个单链，那么它们则可以占据2个分区。如果假设用户正在定量双链DNA，那么将会使其把定量结果高估2倍。

2. RNA靶标

逆转录dPCR（RT-dPCR）比直接dPCR检测DNA更复杂，因为前者需要额外

的逆转录步骤以将RNA转化为序列互补DNA（cDNA）。鉴于此，dPCR检测DNA的精确

性、可重复性和绝对定量这些性质不能简单地外推给RT-dPCR对RNA的检测。众所周知，通过逆转录qPCR（RT-qPCR）测定RNA的可变度是很大的，这取决于实验设计、逆转录的方法、RNA二级结构和试剂的选择，RT-qPCR的灵敏度取决于转化为cDNA的RNA分子数量。

同样地，对细胞RNA或RNA病毒的定量

仅反映从原始RNA转化成cDNA分子的数量，这或许不能准确估计待测RNA分子的原始浓度。当比较来自不同样品的相同RNA的相对量时，RT-dPCR可以表现良好。然而，靶向相同分子不同部分的测定可能产生不同的结果，因此不建议进行交叉测定比较，除非它们已经通过校准并控制了cDNA产生的差异。

3. 校准

dPCR被描述为一种无需校准即可提供精确测量的系统。虽然避免了使用qPCR必需的标准曲线，但不能假设dPCR分析或仪器完全不需要校准。在实验设置和表征期间，使用具有确定量（浓度或基因比例）的模板可以提供关于测量准确性的有价值信息。使用这些标准品模板是开发检测方法和分析误差中至关重要的第一步，同时也为实验室之间进行比较提供了有价值的工具。当使用dPCR测量RNA、串

联序列和已知对PCR有问题的序列（例如具有高GC含量的序列）时，仪器校准尤为重要。

用于校准的参照品不需要与qPCR那样用不同浓度的模板制作标准曲线。实际上，dPCR的一个优点就是参照品可以是具有精确定义量的模板，理想情况是DNA或RNA参照或含有靶序列的参考材料。参照品的种类可以从简单的实验模板到国际公认的参考物质，具体取决于所需的精度水平。

4. 参照

目前我们还无法对各个分区的扩增产物进行测序，以确认靶标序列是否被正确扩增。一些仪器允许PCR后进行熔解曲线分析以确认扩增产物是否正确。另一种方法是使用内部探针。当使用水解探针时，可以添加相容的染料，然后可以在不影响探针的光谱通道中进行额外的熔解曲线分析。

阴性对照对于所有PCR形式，包括dPCR都至关重要。我们必须使用阴性对照来监测假

阳性反应，这可能是由于先前反应产物的遗留、样品间交叉污染、非特异性结合或者引物二聚体形成而导致的。投稿人应详细说明阴性对照的信息。

除了简单的阴性对照之外，dPCR还需要设定一个阈值来分辨阳性分区和阴性分区（图1和图2）。该阈值可用于确定假阳性率和假阴性率，这直接影响测定的有效性和准确性。在仅能使用终点荧光检测的仪器中，以及在阴性

分区和阳性分区的荧光强度差异过小时，设置此阈值可能具有一定的难度，因此必须证明所设定的阈值是合理的。用基于探针或基于荧光强度多重反应的方法测量稀有突变时，或使用非特异性双链结合染料时，设定合理的阈值也特别关键。因此，论文稿件或补充数据中应包括扩增图、终点荧光值以及示意阈值如何设定的图例。

在检测稀有变异的实验设计中，应该包括只有野生型序列的阴性对照。例如，检测以野生型序列为主的样品中的稀有突变时，还应包括已知不含有该突变的对照样品。通过对含有野生型和突变体序列的混合物进行对照检测，会使检测稀有突变的可靠度得到增强。如果进行的是多通道实验，则需要证明阳性和阴性的分区划分正确。

五、dPCR的MIQE指南

qPCR的MIQE指南发表于2009年，其具体目标是改进qPCR分析，并确保数据的可比性和可重现性。编写这些文件的目的是为了鼓励未来的技术更新并扩大应用的范围，对于dPCR，在这里也提出了一些特定的考虑因素，以便将其纳入使用dPCR的出版物中。

表1是一张面向dPCR的MIQE清单，即dPCR实验的最少信息指南（dMIQE）。以下将重点介绍与dPCR特别相关的考虑因素。所有项目分类为必须信息（E）或期望信息（D）。

表1 为作者、审稿人和编辑提供的dMIQE清单^a

检查项目	重要性
实验设计	
实验组和对照组的定义	E
每组的数量	E
实验地点是PI的实验室还是公共实验室	D
功效分析	D
样品	
样品的描述	E

样品的体积或质量	E
显微解剖或普通解剖	E
样品处理的程序	E
冷冻样品如何处理，是否及时	E
固定样品如何处理，是否及时	E
样品的储存条件和时长（特别对于FFPE样品）	E
核酸提取	
核酸定量——仪器/方法	E
储存条件：温度、浓度、时长、缓冲液	E
DNA或RNA定量	E
质量/完整度，仪器/方法（如RNA完整度/质量指标/3' :5' 比例）	E
模板的结构信息	E
模板的预处理（酶切、超声、预扩增等）	E
模板的处理（初始热变性或化学变性）	E
抑制剂的稀释、掺入	E
RNA样品中的DNA污染检测	E
DNase处理的细节	E
所用试剂的生产商与目录号	D
核酸储存条件：温度、浓度、时长、缓冲液	E
逆转录（如果有必要）	
cDNA引物结合方法，cDNA浓度	E
一步法或者两步法程序	E
每个反应中的RNA模板量	E
反应组份与条件的详细信息	E
逆转录效率。	D

有/无逆转录步骤两种方法测得的拷贝数估算 ^b	D
所用试剂的生产商与目录号	D
反应体积（两步法逆转录反应）	D
cDNA的储存条件：温度、浓度、时长、缓冲液	D
dPCR靶标相关信息	
序列检索号	E
扩增子定位	D
扩增子长度	E
特异性生物信息学验证（BLAST等）	E
假基因、逆转录假基因或其它同源序列	D
序列比对	D
扩增子二级结构分析与GC含量	D
引物结合位点在内含子还是外显子	E
靶标是哪种剪接变异体	E
dPCR寡核苷酸	
引物序列和/或扩增子序列 ^c	E
RTPimerDB（qPCR引物与探针数据库）标志号	D
探针序列 ^c	D
核苷酸修饰种类与位置	E
寡核苷酸的供应商	D
纯化方法	D
dPCR程序	
完整的反应条件	E
反应体积与RNA/cDNA/DNA模板量	E

引物、（探针）、 Mg^{2+} 和dNTP浓度	E
聚合酶种类与浓度	E
缓冲液/试剂盒目录号与生产商	E
缓冲液的精确化学成分	D
添加剂（SYBR Green I, DMSO等）	E
PCR板/管的生产商与目录号	D
完整的热循环程序参数	E
反应体系配制	D
根据重量或体积的稀释（手动/自动）	D
PCR反应的总体积	D
分区数	E
单个分区的体积	E
被测量分区的总体积（有效反应体积）	E
分区体积的方差/标准差	D
所用参照的合理性与系统信息	E
dPCR仪器的制造商	E
dPCR验证	
dPCR方法的优化数据	D
特异性（测量稀有突变、病原体序列等）	E
校准用参照的检测限	D
如果使用多通道，每个通道与单通道的对比	E
数据分析	
每分区的平均拷贝数（ λ 或相当单位）	E
dPCR分析软件（来源、版本）	E
离群值的鉴定与剔除	E

无模板参照（NTC）的测试结果	E
阳性/阴性参照的示例与测量结果（作为补充数据）	E
使用参照基因的数量、选择理由的合理性分析	E
生物学重复：数量与结果的一致性分析	D
技术重复：数量以及阶段（RT或dPCR）	E
重复性（批内偏差）	E
重现性（不同实验室/用户的批间偏差）	D
实验的方差或置信区间 ^d	E
用于分析的统计学方法	E
使用RDML（实时定量PCR数据标记语言）呈交数据	D

^a所有必需信息（E）必须在稿件中提交，期望信息（D）在可能的情况下应当提交；

^b在首次提取RNA时，必须使用无逆转录（或逆转录已经失活）体系评估，其中不含有DNA。一旦样品被证实不含有DNA，则建议纳入无逆转录的参照（非必须）；

^c提供引物和探针序列是非常需要并且强烈建议的。然而，并非所有预先设计商业化的检测试剂供应商都提供引物探针信息，因此若不能提供，则必须提交待测的背景序列；

^d当进行单独的dPCR实验时，需要通过二项式分布（或类似模型）计算由计数误差单独导致的结果偏差。

1. dPCR的基本信息

在描述使用dPCR生成的数据时，必须在出版物或其补充信息中包含以下材料。

1.1 每个分区的平均拷贝数

当前，用 λ （常规用于表示泊松分布均值的符号）来估计每个分区的平均拷贝数。由于阳性PCR分区所包含分子可能多于一个，因此使用泊松统计是必要的。目前使用 λ 来进行计算是基于所有分区都具有相等的体积这一假设。早期dPCR仪器系统的分区体积差异很小，使用 λ 是合适的。然而，随着更多新的仪器使用了不同的技术，准确定义分区体积和相关差异将是所需的重要信息，以便于选择更适当的方法来估计每个分区的平均拷贝数。如果 λ 的估计值没有被

作为仪器实验结果的一部分来提供，则可以使用以下等式进行计算，其中 n 为分区总数， m 是所有分区中总体积内的估算拷贝数， k 是阳性分区数。

使用估算的拷贝数： $\lambda = m/n$

使用阳性分区数的计算公式： $\lambda = -\ln(1 - k/n)$

在这里，我们提出了一组新的符号，使其可应用于所有平台（如液滴法或芯片法dPCR）。我们之所以使用 k 和 n ，是因为dPCR的数字式分布是二项式的，通常被认为是 n 次试验中的 k 次成功。在这种情况下，“试验”是单个分区的阴性或阳性结果。我们认为有必要报告 λ ，因为这与分区数（见下文）共同构成了决定估算精度的因素。

1.2 分区数

因为测量结果的精度取决于测量的分区数，所以分区数必须提供。这对于基于液滴的仪器尤为重要，因为每次实验的分区数量都是不一样的。

1.3 模板结构信息

越来越多的证据表明模板结构和复杂性会对dPCR准确性产生影响。因此，需要提供模板类型（gDNA /质粒/病毒/ cDNA）、来源（物种、组织和细胞）和处理方法（酶处理、超声和预扩增）等相关信息。此外，还应包括模板的预处理信息（加热和使用变性剂等）。当进行限制酶消化时，需要验证酶切位点不在靶标扩增子内。

1.4 单个分区体积

分区体积的误差将导致估算每个单位体积的模板浓度时产生偏差。不同的仪器/芯片具有不同的分区体积，不熟悉dPCR的人可能不是很清楚。

1.5 分区总体积（有效反应空间）

分区数乘以单个分区体积即可计算反应的总体积。这对基于液滴的仪器尤其重要，因为每次运行生成的分区数量差异会导致分析的总体积不同。

1.6 参照品的全面信息及其正确使用

参照品在所有PCR分析中都很重要，在dPCR中更为重要，因为对dPCR扩增子种类的鉴定是不可能或者非常困难的。在进行稀有突变分析时，参照品尤为重要。

1.7 作为补充数据提供的阳性或阴性实验结果的例子

在多通道实验时，必须展示代表性的扩增曲线或终点荧光值，以清楚地划分阳性和阴性分区。

1.8 实验方差或置信区间

鼓励使用多个生物学重复来评估总的实验偏差。当进行单个dPCR实验时，由于计数误差而导致的最小方差估计必须根据二项式（或合适的等效）分布来计算。

2. 期望提供的实验信息

理想的信息是帮助同行科学家理解其研究，并在使用时可加入的信息。

2.1 分区体积的方差/标准差

这在执行绝对定量时尤为重要。如果没有实验室实测的数据，仪器制造商应提供这些基本信息。随着更多仪器的推出，该指标将变得越来越重要。

2.2 检测方法的优化数据

当运行成本不足以使用dPCR进行优化时，应使用qPCR方法并提供qPCR效率和检测限。

2.3 制备总PCR反应体积

提供该信息能反映这一事实，即许多仪器需要准备比实际分析更大的初始样品体积。

2.4 校准控制的检测限

校准器对RNA测量尤为重要。

制定dPCR质量保证措施的必要性与qPCR和RT-qPCR一样迫切。如qPCR一样，dPCR对常规分子定量方法的更大贡献是可以更精准地量化目标核酸。为了最大化这种优势，我们必须仔细进行实验设计与结果汇报。与dPCR相关的大多数考虑因素与qPCR大同小异。表1提供了供研究人员准备dPCR研究结果报告的清单。其中被认为必须提供的信息（E）非常重要，以允许审阅者评估工作并使其他研究人员能够重复实验结果。被认为期望的信息（D）也很重要，应尽可能包括在内。

与qPCR MIQE指南一样，dPCR MIQE指南的目的有以下三点：

- A. 使作者能够设计、执行和报告具有更高科学完整性的dPCR实验。
- B. 使得遵循这些指南的已发表研究中描述的实验能够被更好地重现。
- C. 为审稿人和编辑提供关键信息，使其能够根据既定标准评价待审稿件的技术质量。

dMIQE指南的快速普遍应用应该可以获得可重复的数据和更可靠的科学报道，从而有利于提升dPCR对相关研究的影响，并最大限度地发挥这一快速发展和充满前景的技术的作用。

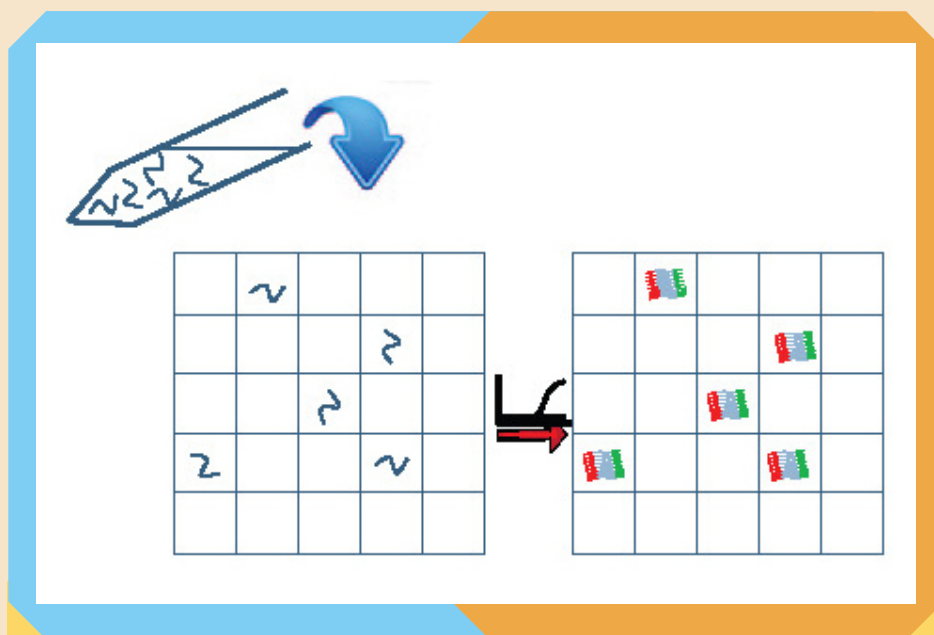
原文检索：

Huggett, JM et al. (2013) The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 59: 892-902.

数字PCR的时代正在来临

几年前，Fluidigm公司的研发总监Ramesh Ramakrishnan不得不花费大量时间在会议上讨论应用时解释数字PCR是什么。现在，他指出，大多数观众至少熟悉了这个术语，即使他们自己没有接触过这项技术，它不再是一种奇特的东西。

数字PCR（dPCR）策略已被概括为“分而治之”：一个样品被稀释并被放入数百甚至数百万个单独的分区，使得每个分区包含一个或不包含靶标序列的拷贝。通过计算“阳性”分区（有靶标序列）与“阴性”分区（无靶标序列）的数量，科学家便可确定原始样品中靶标DNA的分子拷贝数。在其它应用中，研究人员使用dPCR来区分等位基因的差异表达，追踪何种病毒感染单个细菌细胞，量化患者标本中的癌症基因，并检测循环血液中的胎儿DNA。



dPCR工作原理：一个样品被稀释并被放入多个单独的分区，通过计算“阳性”分区（有靶标序列）与“阴性”分区（无靶标序列）的数量，科学家便可确定原始样品中靶标DNA的分子拷贝数。

dPCR的概念最初于1992年被描述。几年后，约翰霍普金斯大学（Johns Hopkins University）的Bert Vogelstein和Ken Kinzler命名了该技术，并证明它可用于量化结直肠癌患者粪便中与疾病相关的突变。尽管理论很简单，但是实施起来并非如此。最初的示例是在商业化的384孔板中进行的，每个分区5 μ L。然而，这种方法对试剂的大量需求使大多数研究人员望而却步。

得益于纳米加工和微流体技术的进步，现在已经诞生了能生成数百至数百万纳升甚至皮升级分区的系统。尽管技术开发人员已经描述了dPCR的几种实现方式，但到目前为止，只有少数公司实现了产品的商品化或宣布了相关计划。Fluidigm和Life Technologies在专门设计的芯片或板内创建分区，而Bio-Rad和RainDance则将试剂隔离成单个液滴。

一、成本更高，精度也更高

用于检测靶标DNA序列存在与否及其浓度最流行的PCR技术不是dPCR，而是其更常见的表亲：实时定量PCR（qRT-PCR或qPCR）。在qPCR中，DNA被不断复制直到产生一定水平的荧光信号；然后，使用达到该点所需的扩增循环数来计算特定序列的DNA分子相对于样品中的其它DNA分子的最初量。

虽然dPCR使用与qPCR相同的引物和探针，但能够达到更高的灵敏度和精确度。在标准实施方案中，qPCR不能区分小于两倍的基因表达差异或拷贝数变异，让其鉴定频率小于1%的等位基因也绝非易事，因为具有相似序列并且高度丰富的常见等位基因更容易被检测到。相比之下，dPCR可以检测到30%及以下的基因表达差异、区分5个与6个拷贝变异、识别千分之一的等位基因频率，还可用于qPCR方法的标准化。

分区越多，分辨率越高。据TATAA Biocenter首席执行官，兼提供qPCR和dPCR服务和培训的Mikael Kubista解释，如果你想区分2个和3个拷贝数，那么你需要200个分区。如果你想区分10个和11个，那么你就需要8,000个分区。原则上，人们也可以通过进行

8,000次qPCR重复来获得相似的精确度，但这样的实验是不切实际的。

Jim Huggett是英国实验室服务和测量标准组织LGC的核酸计量科学带头人。他的团队直接用几种DNA模板和其它条件比较了qPCR和dPCR两种技术。他指出，尽管dPCR比qPCR具有更高的准确性和更少的不确定性，但qPCR仍具有诱人的优势：它比较便宜，并且相比dPCR可在更广泛的动态范围内工作。例如，它可以确定一个基因的转录产物比另一个基因的转录产物丰富多达十亿倍。

此外，qPCR实验每次常规运行可以分析数百个序列。最终，Kubista认为，能同时检测多达100个反应的多重dPCR是有可能的，但没有人会考虑使用dPCR测量大量数据。qPCR已经很好地被整合进许多研究人员的实验室。Kubista等人已经为qPCR进行了长达20年的工作流程开发。相比之下，第一次专门致力于讨论dPCR应用的会议却在2012年10月才举办。

Fred Hutchinson癌症研究中心（Fred Hutchinson Cancer Research Center）的microRNA研究员Muneesh Tewari在绝对定量

很关键的情况下使用数字PCR，例如检测低丰度RNA。他指出，dPCR的一个优点是，通过更多的分区，可以分析更大量的稀释RNA样本。

此外，dPCR不需要qPCR所必需的校准和内参。相反，重复孔的计数可以简单地加在一起。Tewari表示，根据绝对定量的拷贝数进行思考是如此直观。尽管如此，与dPCR实验相比，他的实验室目前使用更多的还是qPCR

实验。Tewari认为，qPCR具有更低的成本和更高的通量，而且他的员工也更熟悉。

Life Technologies数字PCR业务部门负责人Paul Pickering指出，这是典型的情况。大多数客户都在寻求进行RT-PCR，然后，在某种特殊情况下，他们将使用dPCR。客户重视四个属性：灵敏度、特异性、结果的精确性，以及你无需参考任何其它材料即可获得绝对定量的事实。

二、芯片上的dPCR

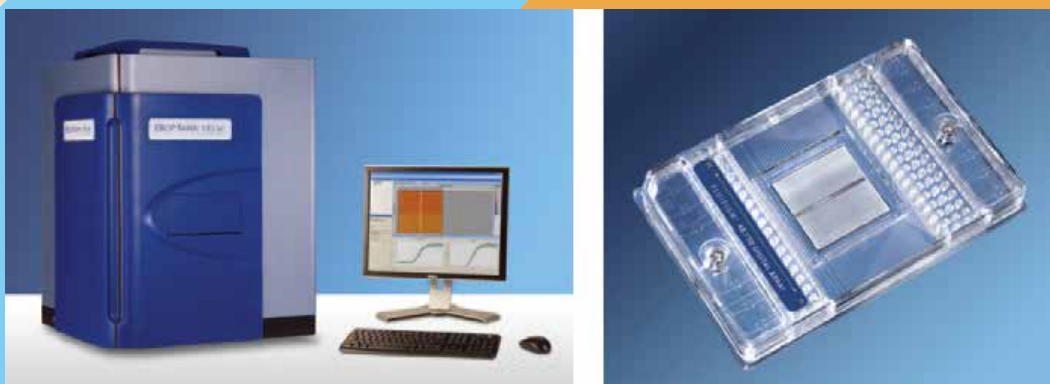
2006年，Fluidigm成为第一家将dPCR商业化的公司。该公司所提供的两种系统均可将样品与试剂混合、分配反应混合物、进行热循环并读取每个分区内的结果。更简单、更便宜的EPI机器仅检测PCR终点，即是否发生了反应。而同样进行qPCR的BioMark HD系统可以设置为监测反应过程，并具备可删除假阳性数据的功能。两个系统都使用含有复杂微流体和微小阀门的芯片来将样品分成大约800个反应，每个芯片有12或48个样品。Ramakrishnan指出，研究人员希望每个样品都能够运行更多反应，他们可以使芯片内的阵列翻倍，甚至可以使芯片数量翻倍。

该公司开发了另一款名为200K的芯片，该芯片拥有数十万个分区，并授权了单独的技术用于开发多达一百万个分区的芯片。然而，将这些技术商业化的计划已被暂时搁置，以等待更大的需求。Ramakrishnan表示，尽管他们可以在分区方面获得技术上的提升，但他们

还没有从市场上获得更高的密度。

在收购长期合作伙伴BioTrove后，Life Technologies于2009年开始销售dPCR。他们现在提供两种可用于dPCR和qPCR的机器：OpenArray和QuantStudio 12K Flex。样品与试剂混合后，被加载到反应室中，进行扩增循环并监测反应。机器使用与显微镜载玻片尺寸相当的平板其实是高度工程化的带有纳米尺寸孔的钉板。通过毛细作用以及亲水和疏水表面的小心放置可将样品固定到位。

OpenArray机器最多可容纳三个板，每个板包含48个阵列、64个分区。QuantStudio最多可容纳四个板，也可采用高通量qPCR实验中使用的方​​式：TaqMan阵列卡以及96和384孔板。Pickering指出，他们发现很多客户虽然都想要dPCR，但还没准备好“上车”，还说这是他们唯一需要做的事情。购买可以兼顾两者的机器类似于购买混合动力（汽油和电动）汽车的决定，而不是购买纯电动汽车。



Fludigm公司的BioMark HD系统，可用于dPCR和qPCR。



Life Technologies公司的QuantStudio系统，
可用于dPCR和qPCR。

三、液滴中的dPCR

像Bio-Rad和RainDance这样的公司生产的机器虽然不能进行qPCR，但可提供更多的dPCR分区。在液滴数字PCR（droplet digital PCR, ddPCR）中，分区不是通过孔壁进行分离的，而是通过精心滴定的油、水和稳定剂的乳液进行分离的。首先，将样品放入机器，在机器中将样品与所有必需的试剂混合并分散成微小的液滴。然后，将每个样品的液滴转移到PCR管中并放置在热循环仪中进行扩增。最后，将PCR管转移到液滴读取机，其功能类似于流式细胞仪，以分析每个液滴内是否已发生PCR反应。

QuantaLife 2011年推出了第一个商用ddPCR系统。2011年12月，Bio-Rad Laboratories以1.62亿美元收购了QuantaLife，如果产品达到某些成果里程碑，承诺给QuantaLife提供更多现金。Bio-Rad营销经理，也是QuantaLife早期员工的Mike Lucero表示，一直以来，他们的目标是开发一款价格低廉且易于使用的仪器。他们在公司有两条规则：既没有芯片，也没有激光。Lucero认为耗材的低成本将使公司与众不同。Mike Lucero拿着一个透明、轻巧的条带，上面镶嵌着各种杯子，可用于收集微滴，每个都比牙膏帽窄。据他介绍，这个耗材还不到10美元，这是他们花时间和精力用塑料做成的。

QuantaLife的创建者之一，现在是Bio-Rad高级首席科学家的Ben Hindson指出，获得液滴的化学反应至关重要。即使温度在反应中稍微波动，产生的液滴也必须保持均匀的尺寸。更重要的是，在处理热循环和读取过程中，液滴不会破裂或聚集，并且它们还必须

保持支持PCR的生物相容性条件。Hindson表示，生成96个样本的液滴需要25 min，一个运行该系统的研究人员每天可以分析3组96个样本。目前该技术已开始出现在独立研究中，在一篇结合基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学数据的高分论文中，QuantaLife开发的ddPCR可用于检测各种等位基因的差异表达。

另一种dPCR系统由RainDance开发，并于2012年推出。该系统中的机器可以生成并读取数百万皮升（pL）的液滴，这一特性不仅可以让科学家识别出罕见的等位基因，还可以减少一些稀释样品细致性方面的需求。据公司联合创始人Darren Link解释，通过所有这些液滴，他们可以处理各种不同的浓度。他驳斥了竞争对手认为数百万个分区比大多数科学家所需要的更多这一观点。Link表示，分区数太多不是问题，特别是当你谈论表达分析时。你不会想采用滴定法来找到动态范围的最佳浓度。Link还强调该系统不需要任何手动移液，因为液滴可以在制造液滴、进行热循环和分析液滴的机器之间自动转移。

据RainDance公司、Strasbourg大学和Paris-Descartes大学的研究人员报道，他们可以在200,000个被稀释成gDNA的野生型KRAS基因中检测到一个突变型KRAS基因。最常见的七种KRAS突变可以通过两个多重实验筛选出来：一个检测野生型等位基因和四个突变，一个检测野生型和三个突变。在美国癌症研究协会（AACR），RainDance展示了检测患者血清中癌症突变的结果。

四、dPCR的思考

Huggett认为，尽管dPCR可能不需要与qPCR类似的校准和参照，但仍存在大量人为现象。以小体积和单分子浓度工作是一项复杂的工程壮举。他提醒，dPCR仍处于早期阶段，他的建议是小心处理，谨慎行事。例如，一些研究人员认为，dPCR不像qPCR那样对某些样品中的酶抑制物质敏感。qPCR的问题在于抑制剂增加了达到给定信号所需的扩增循环数。然而，即使dPCR不计算循环数，如果抑制剂通过防止反应发生而导致假阴性，还是会出现问题的。

Kubista表示，有些因素对dPCR尤为重要。例如，高质量完成的测试结果非常重要，如果有一个目标分子存在，你确信会看到它。然而并非所有的检测结果都会那么优秀。此外，研究人员还需要确保多个目标序列不会出现在同一条DNA上；否则，它们不能进入不同的分区。另外，如果阳性分区产生了聚集而不是均匀地随机分散，则可能存在样本加载或分析的问题。

特异性也是一个问题。许多测定可能会错误扩增除目标序列以外的产物，特别是存在假基因时。在寻找稀有等位基因时，了解假阳性率至关重要。在这些情况下，大多数分区将不包含感兴趣的分子，并且假阳性的数量可能使真阳性的数量相形见绌。出于对这些原因的考虑，Kubista建议进行各种对照实验。他的中心提供了一个名为ValidPrime的试剂盒，每个单倍体基因组仅需扩增一个基因拷贝，便可用于评估特异性。

最稀有的等位基因需要特别考虑。Pickering表示，如果一个序列仅在50 μ L中出现一次，则分析超过50 μ L的样品至关重要。

他认为，无论采用何种技术，如果你没有采样到足够的容量来获得你正在寻找的东西，你就不会发现它。

在定量丰度更高的分子，例如检测拷贝数变异或基因表达时，研究人员通常需要粗略估计其目标浓度，以便进行适当的稀释，否则太多分区将包含多个拷贝。（统计数据可以弥补这一点，但仅限于此。）据Kubista解释，如果每个分区都是阳性的，研究人员就无法计算原始分子的浓度。只需通过80%的阳性分区，您便可以充分利用芯片。值得注意的是，如果阳性分区占比超过90%，那么准确度就会下降。

监测“响应曲线”（response curve）或DNA在扩增过程中的变化水平有助于消除由DNA序列的非特异性标记引起的错误读数——提供此类数据的Fluidigm和Life Technologies等公司热忱地指出。

然而，ddPCR的倡导者认为，仅仅使用终点数据就可以进行准确的测量，并且汇集了更多分区的优点。Hindson指出，对于等位基因特异性实验，你可能会得到假阳性，但你可以定量假阳性率，而不是通过曲线来推断它。

Kubista认为，研究人员还应该考虑在dPCR开始之前进行的所有步骤。处理样品时，材料会丢失。在处理之前加入一个掺有特定序列的参照可以帮助确定需要多少样品。

虽然专家在设计dPCR实验时非常谨慎，但他们对其潜力仍然非常乐观。Kubista指出，随着技术的成熟和成本的降低，更多的研究人员将学会提出只有dPCR可以回答的问题。今天已有一些dpCR应用，明天将会有更多。



Bio-Rad公司的QX100 dddPCR系统。



RainDance公司的RainDrop Source和RainDrop Sence液滴式dPCR系统。

原文检索：

Monya Baker. (2012) Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 9: 541–544.

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com



细胞鉴定质控服务指南

Cell Authentication and Quality Control Service

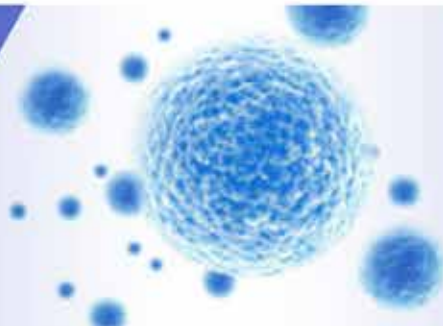
● 严把细胞质控，提高科研质量 ●



Step 1

STR鉴定

- 确定细胞来源的可追溯性
- 制定新构建细胞株的鉴定标准



Step 2

FISH检测

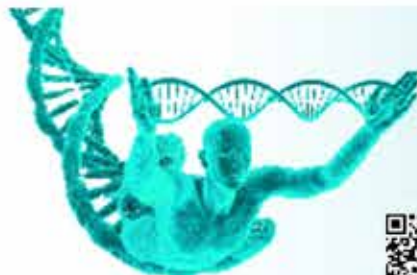
- 确定目的基因所在的染色体数目



Step 3

ddPCR检测

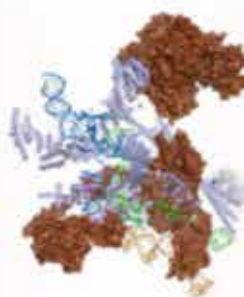
- 确定目的基因拷贝数目



Step 4

RT-PCR检测

- 确定研究基因的剪接体 (splice form)



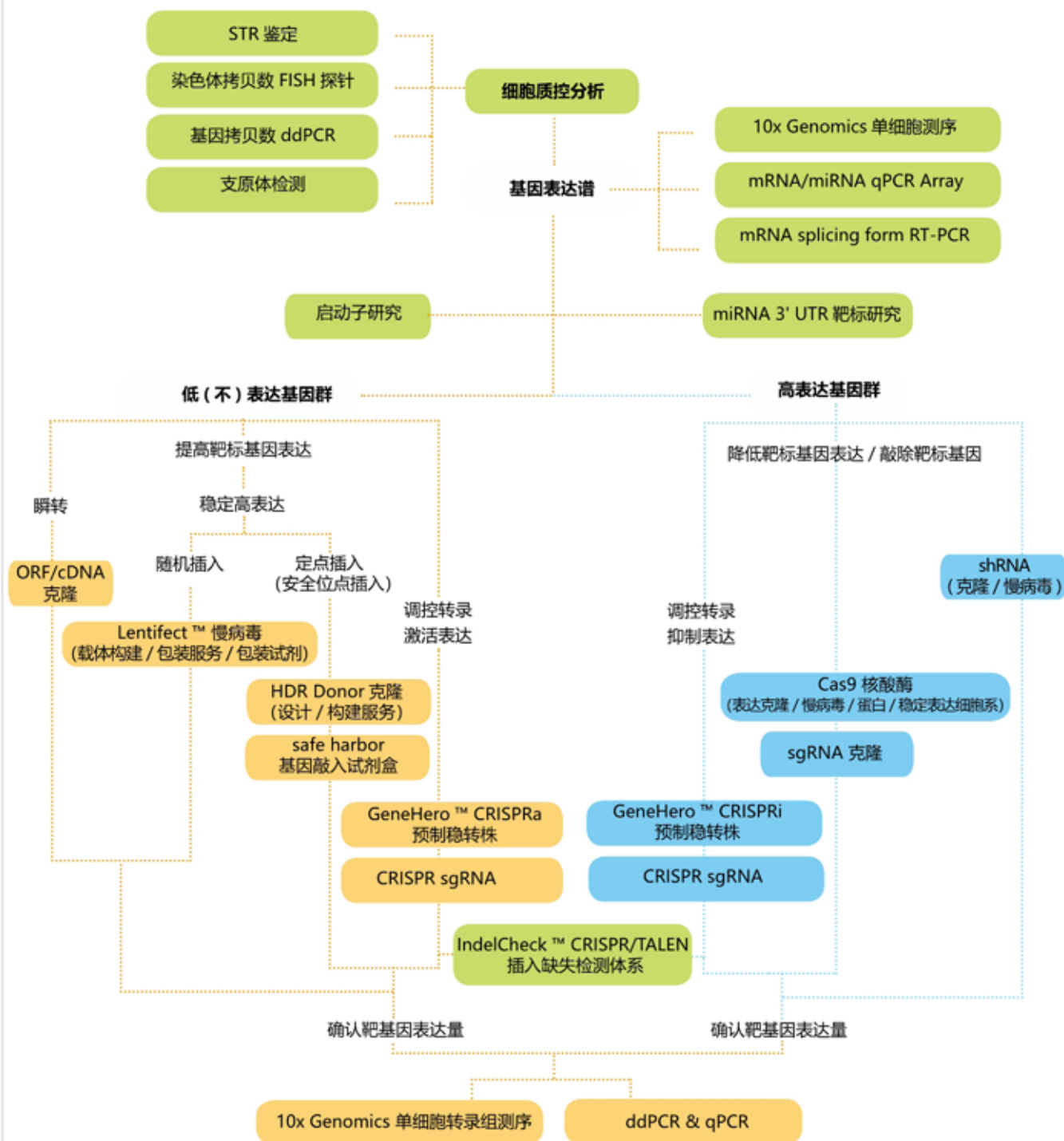
● 建议支原体检测贯穿整个实验过程



扫一扫，关注官方微信



基因功能研究产品和服务指南



● 相关产品及服务: 【转染试剂】 【AAV 包装服务】 【荧光素酶检测试剂盒】 【细胞系构建服务】

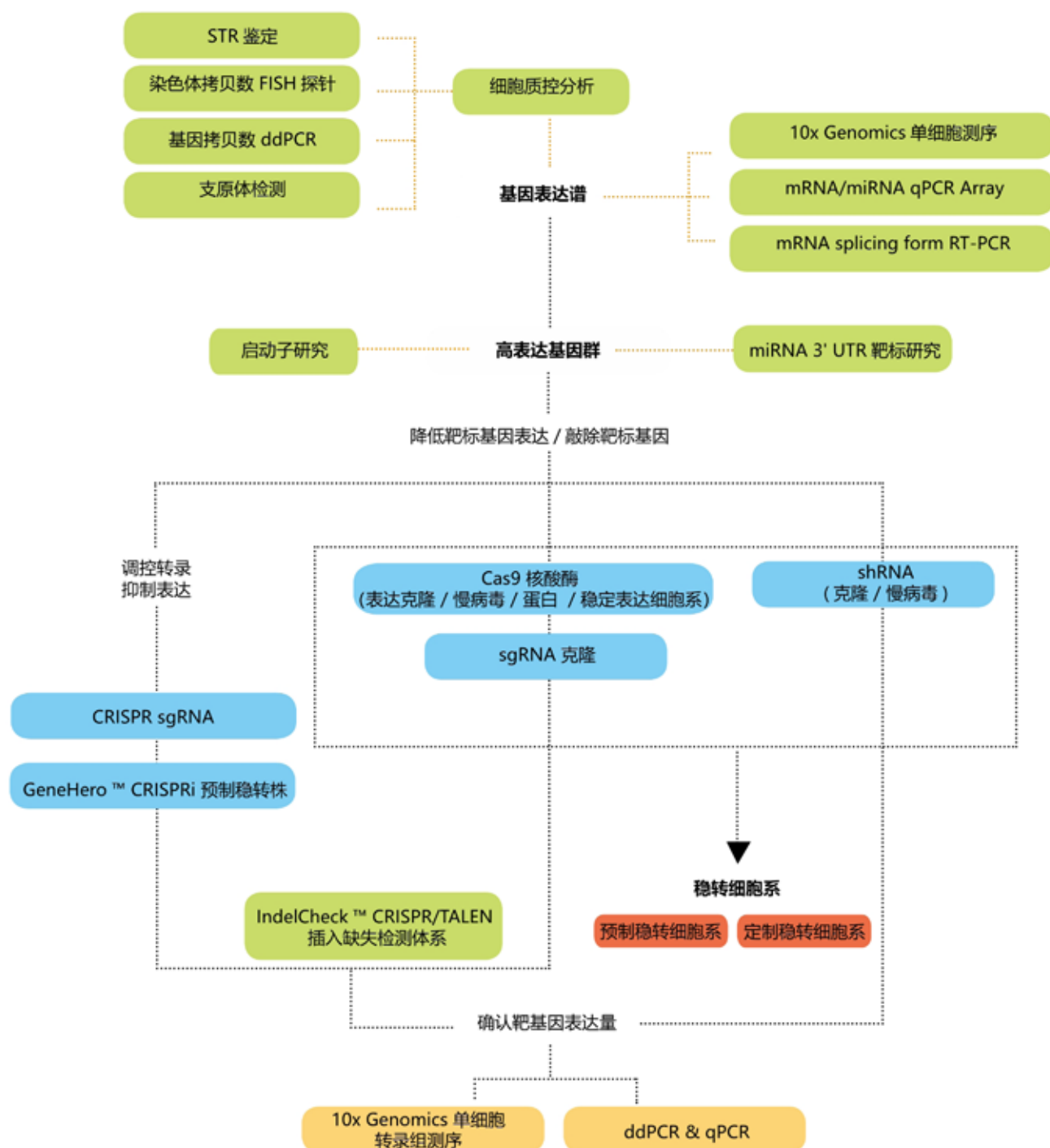
● 客户发表文章超过 100,000 篇



扫码进入网页版



高表达基因功能研究产品和服务指南



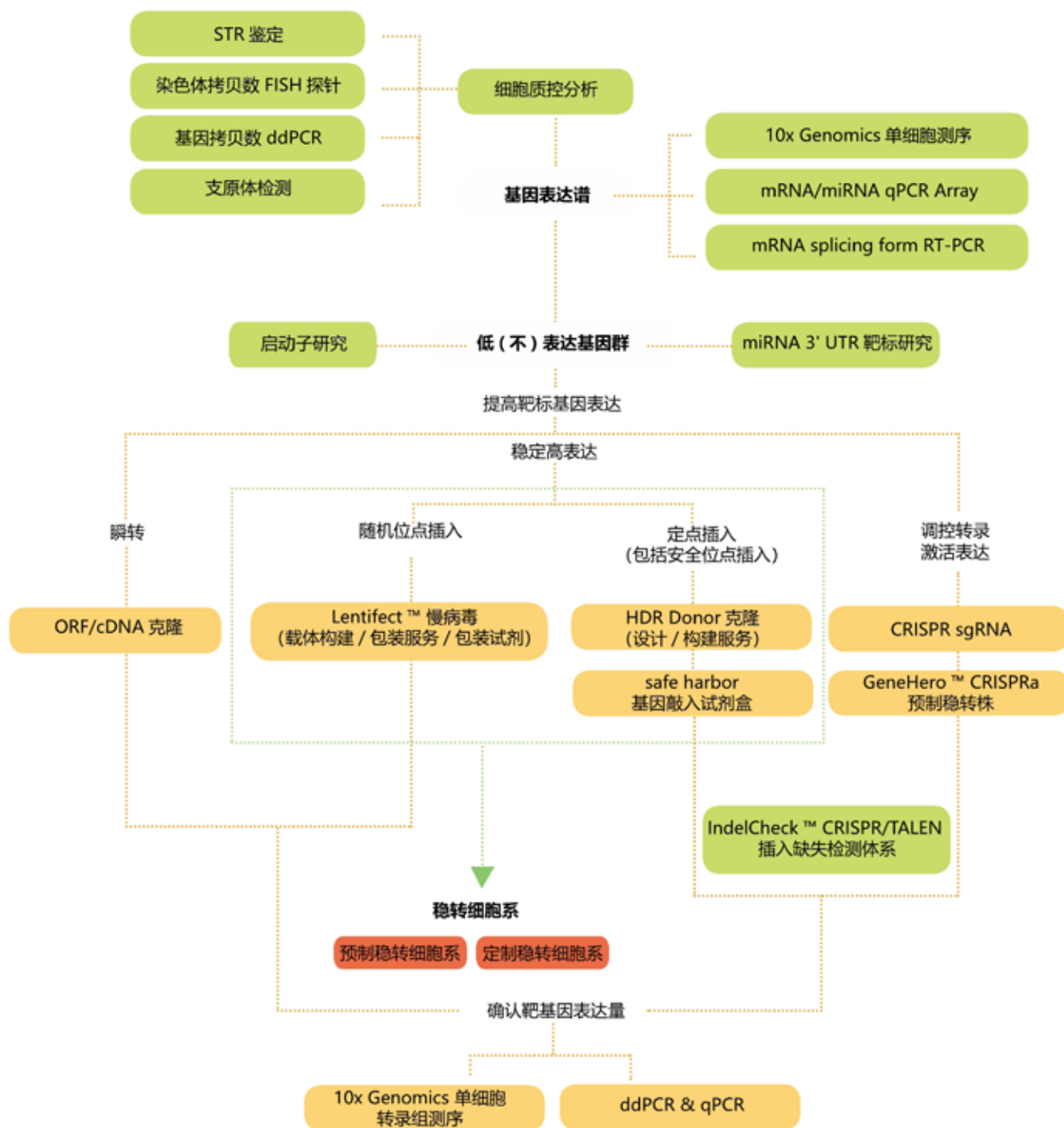
- 相关产品及服务：【转染试剂】【AAV 包装服务】【荧光素酶检测试剂盒】【细胞系构建服务】
- 客户发表文章超过 100,000 篇



扫码进入网页版



低（不）表达基因功能研究产品和服务指南



- ◆ 相关产品及服务：【转染试剂】【AAV 包装服务】【荧光素酶检测试剂盒】【细胞系构建服务】
- ◆ 客户发表文章超过 100,000 篇



扫码进入网页版

A group of people are forming a human pyramid against a cloudy sky. The pyramid is composed of several layers of people, with the top layer having one person, the middle layer having two, and the base having three. The people are wearing dark clothing. The sky is filled with soft, white clouds. The overall image has a purple tint.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255



www.LifeOmics.com