

## 数字 PCR 技术研究进展

Backwoodsman

Email:backwoodsman@126.com

### 1.前言

#### 1.1. PCR 技术发展过程

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction),简称 PCR,是体外扩增 DNA(或 RNA)的技术。它与分子克隆和 DNA 序列分析方法几乎构成了整个现在分子生物学实验的工作基础。在这三种实验技术中,PCR 方法在理论上出现最早,也是目前在实践中应用得最广泛的。PCR 技术使微量的核酸(DNA 或 RNA)操作变得简单易行,同时还可使核酸研究脱离于活体生物。

核酸研究已有 100 多年的历史,20 世纪 60 年代末、70 年代初,人们致力于研究基因体外分离技术,但由于核酸的含量较少,在一定程度上是限制了 DNA 的体外操作。Khorana 于 1971 年最早提出核酸体外扩增的设想,但由于基因序列分析方法尚未成熟,热稳定性的 DNA 聚合酶尚未报道,以及寡核苷酸引物合成还处在手工及半自动合成阶段,这种想法似乎没有实际意义。

1985 年,美国科学家 Kary Mullis 申请了有关 PCR 的第一个专利(Mullis,1987),在“Science”杂志上发表了第一篇 PCR 的学术论文。从此 PCR 技术得到了生命科学界的普遍认同。Kary Mullis 也因此获得了 1993 年的诺贝尔化学奖。1988 年 Saiki 等从温泉中分离的一株水生嗜热杆菌(*Thermus aquaticus*)中提取得到一种耐热 DNA 聚合酶(Saiki 等,1988),从此不必在每次扩增反应后再加新酶,极大地提高了 PCR 扩增的效率,是 PCR 方法得到了广泛的应用。

自 PCR 方法被建立以来,在近 30 年的时间里,发展很快,已有一系列 PCR 方法被设计出来,并广泛应用于遗传性、微生物学乃至整个生命科学研究中,极大地推动了生命科学各个领域的发展。特别是 90 年代后期,美国 ABI 公司推出的实时荧光定量 PCR( real time PCR, qPCR) 技术及相关产品更是将 PCR 由体外合成及定性/半定量检测技术发展成为一种高灵敏、高特异性和精确定量的基因分析技术。经过十几年时间的迅速发展, qPCR 技术已经用于除外伤和营养缺乏症外所有疾病的诊断(金钦汉,2010)。

如果以采用普通 PCR 仪来对靶基因进行扩增,采用琼脂糖凝胶电泳来对产物进行分析常见的定性 PCR 技术为第一代 PCR;以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浓度的荧光定量 PCR 技术(Real-Time PCR, qPCR)为第二代 PCR;那么,第三代 PCR 技术--数字 PCR (Digital PCR, dPCR, Dig-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而不再依赖任何校准物或外标,即可确定低至单拷贝的待检靶分子的绝对数目。

#### 1.2. 数字 PCR 技术发展简述

传统的聚合酶链式反应(PCR)技术,是一种在体外呈指数倍扩增核苷酸的

技术。其基本原理是在模板、引物、4种 dNTP 和耐热 DNA 聚合酶存在的条件下，特异扩增位于两段已知序列之间的 DNA 区段的酶促合成反应。每一循环包括高温变性、低温退火、中温延伸三步反应。

数字 PCR(digital PCR, dPCR)是将传统 PCR 的指数倍信号转换成线性的数字信号，通过特定的仪器读值，并利用统计学方法来分析 PCR 产物。1997 年 Brown James F、Silver Jonathan E. 和 Kalinina Olga V.构建了数字 PCR 技术的雏形，并获得美国专利(Brown 等,2000)。1999 年 Vogelstein 和 Kinzler 进一步提出了数字 PCR 的概念(Vogelstein 等,1999)，并利用 96 孔板系统的数字 PCR 在大肠癌病人的粪便样本中检测出突变的致癌基因 ras。随之，Dressman 等发明了一种 BEAMing 方法(珠子、乳剂、扩增与磁力)(Dressman 等,2003)：将链霉亲和素与磁珠共价结合，磁珠外包裹一层生物素的 PCR 引物，进行扩增反应；反乳化作用后，使用流式细胞仪通过磁珠分析等位基因变异。尽管步骤较多，该技术仍不失为广泛应用于实验室定量 DNA 的理想方法，可以用来检测和定量单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)或突变等核酸序列变异(Diehl 等,2005)及含有变异等位基因的磁珠能够被流体分离排序，因而可应用于样品测序等序列分析(Diehl 等,2006)。与传统的 PCR 技术不同的是，数字 PCR 通过将一个样本分成上百或上千份，使每个反应槽中尽可能只包含一个拷贝的目标分子（即模板），然后在每个反应槽中都加入荧光标记过的探针和 DNA 聚合酶，批量扩增 DNA 样本，最后通过荧光信号的读值来反映目标分子的 PCR 扩增。数字 PCR 的出现，显著提高了生命科学研究的效率，使生物学家可以快速、高通量检测病人样本中致病基因的许多变化，包括基因突变、等位基因不平衡的识别等。

尽管 dPCR 技术具备广阔应用前景，但由于 96 孔或 384 孔平板加样的复杂操作为精确测量带来了困难，也难以解决高通量测量问题。微流体的出现和纳升(nl)反应仪器的开发克服了这些技术的瓶颈。在 2003 年，Liu 等(Liu 等,2003)使用微流体(microfluidic)的概念，在微流体芯片上进行了 400 个独立的 3nl PCR 反应。2008 年，嵌入式芯片的 PCR 反应次数达到了 9180 个 6nl 的 PCR 平行反应(Dube 等,2008)。微流体装置(microfluidic devices)使现在数字 PCR 技术能在一次 PCR 反应中执行高度平行的分析。美国 Fluidigm 公司开发出一种数字芯片和 BioMark 系统来操作微流体数字 PCR(microfluidic digital PCR)技术。这种数字芯片是利用多层软刻蚀(multi-layer soft lithography, MSL)专利技术，将成千上万的控制液体流动的阀和液流通道集成到一张很小的芯片上，实现对微小体积液体的精确控制，构建出大量的、独立的微小反应腔，从而可以在一张芯片上同时进行上千个 PCR 反应。数字芯片需要放在 Fluidigm 公司开发、生产、销售的集成流体通路(integrated fluidic circuit, IFC)系统上。该系统由仪器、软件和一次性使用的集成流体通路装置组成，能够对极微量的实验对象同时进行成千上万次复杂的测定。2011 年，Heyries 等(Heyries 等,2011)报道了一个百万级的微流体 dPCR 装置，成为了 dPCR 技术的又一重大突破，该装置通过表面张力以达到样品分布和疏水控制，提高了单分子 DNA 扩增的保真性，每皮升(pl)进行 100 万个反

应，达到每平方厘米( $\text{cm}^2$ ) 44 万个反应，这种装置可实现每 10 万个野生型序列中低于一个变异拷贝的检测。这种生物学集成通路是通过在单一的微型设备上对液体处理部件进行微型化和集成处理而实现的。与传统的实验室系统相比，该系统扩大了 PCR 反应通量，降低了成本，大大提高了灵敏度。

与 qPCR 不同的是，数字 PCR 不依赖于  $C_T$  值，因此不受扩增效率的影响，扩增结束后通过直接基数或泊松分布公式来计算每个反应单元的平均浓度（含量），能够将误差控制在 5% 以内(Warren 等,2006)，数字 PCR 可以不需要对照标准样本标准曲线来视线绝对定量分析。该技术提出至今虽然只有十几年时间，但是由于其独特的技术优势和应用前景，使得其产业化发展相当迅速。迄今为止，已有包括 Fluidigm 和 Bio-Rad 等几家公司相继推出了数字 PCR 产品，并已经应用于单细胞分析(Ottesen 等,2006;Warren 等,2006)、癌症早期诊断(Pohl 等,2004;Zhou 等,2002)和产前诊断(Lo 等,2007;Zimmermann 等,2008)等研究领域。

## 2.数字 PCR 技术的原理

### 2.1 扩增检测原理

数字 PCR 一般包括两部分内容，即 PCR 扩增和荧光信号分析。在 PCR 扩增阶段，与传统技术不同，数字 PCR 一般需要将样品稀释到单分子水平，并平均分配到几十至几万个单元中进行反应，如图 1、图 2 所示。不同于 qPCR 对每个循环进行实时荧光测定的方法，数字 PCR 技术是在扩增结束后对每个反应单元的荧光信号进行采集。最后通过直接计数或泊松分布公式计算得到样品的原始浓度或含量。

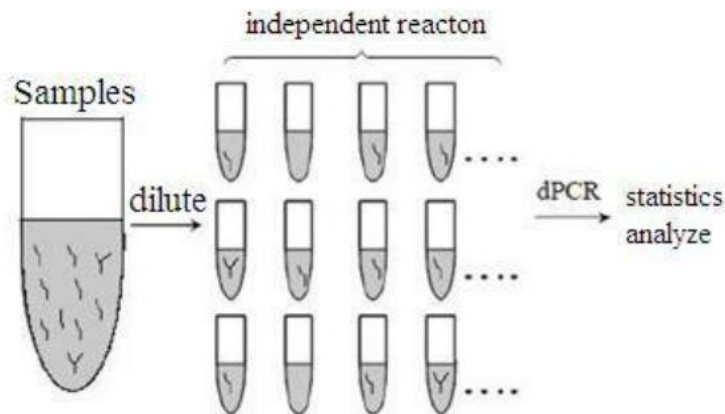


图 1. 数字 PCR 工作原理示意图：设原始样品管中含有 2 个变异分子，若干个未变异分子。通过大量稀释细分，将可使每个细分样品管中至多只含有 1 个变异分子或者未变异分子。将这些细分样品管同时在相同条件下进行 PCR 放大，含有变异分子的两个样品管内的荧光信号将被放大上百万倍，达到用肉眼都可以看到的程度，以致可通过数个数的办法“数出”变异分子个数，进而推断出起始样品中所含变异分子的绝对数量。

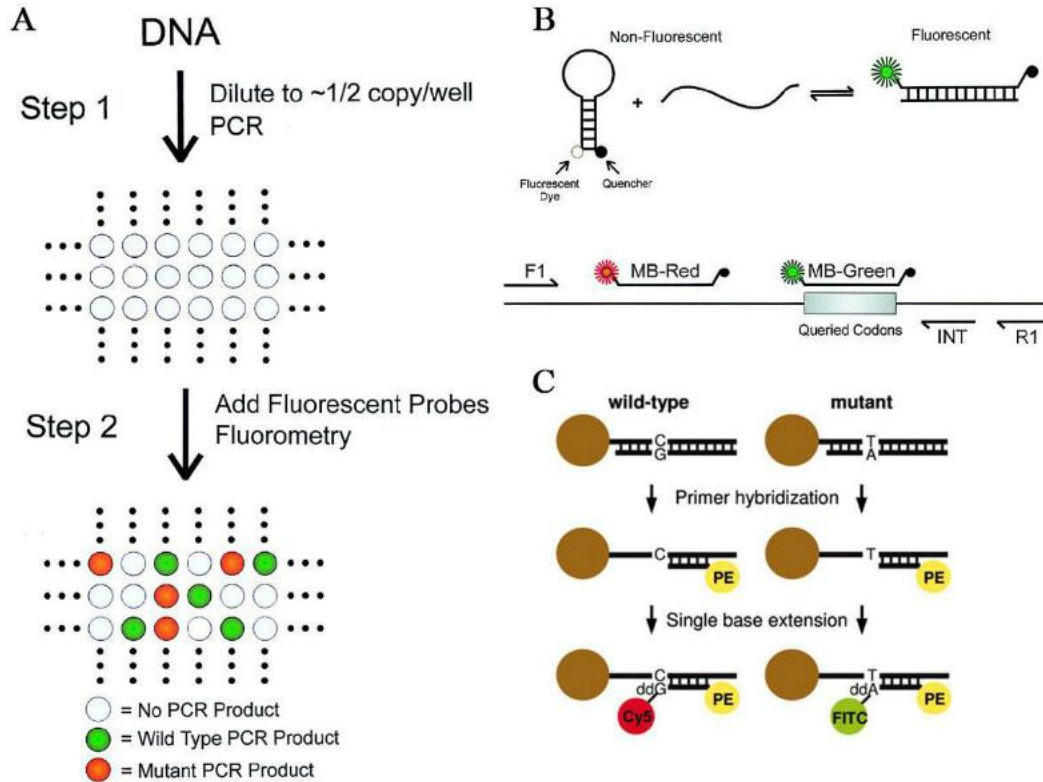


图 2. 数字 PCR 技术原理: A: 数字 PCR 过程, 第一步稀释样本分配至每个反应单元进行 PCR 反应, 第二步荧光检测; B: 分子信标基因突变分析原理; C: BEAMing 检测原理。

数字 PCR 直接计算两两相比样本中的每个样本等位基因的数量 (例如, 父系来源样本相对母系来源, 或者是野生型相对突变型)。同时, 可利用统计学分析方法来分析两个样本差异的可靠性, 例如贝叶斯似然方法 (Bayesian type likelihood methods)。

目前的数字 PCR 技术主要采用分子信标和 TaqMan 探针两种方式对 PCR 产物进行荧光标记。其中分子信标法 (如图 2b 所示) 通过一对通用引物得到包括野生型和突变型在内的 PCR 产物, 再经过不对称 PCR (asymmetric PCR) 得到单链 DNA 分子与两种荧光分子信标分别杂交, 利用荧光颜色区别野生型和突变型, 通过具有不同荧光反应单元数量的多少和比率进行分析, 这种方法也被称为数字 SNP (digital singlenucleotide polymorphism, digital SNP)。TaqMan 探针法则可用于基因表达分析和单细胞多重 PCR 等。BEAMing (beads, emulsion, amplification, magnetics), 原理如图 2c 所示。BEAMing 技术通过将引物化学键合在磁珠表面, 再将单个磁珠与目标分子包裹在微乳液滴中进行 PCR 扩增, 将野生型和突变型目标分子在磁珠表面进行复制。扩增结束后进行破乳, 再利用流式细胞技术进行荧光计数。该技术还通过预扩增反应, 提高了系统的灵敏度, 适用于低概率的等位基因突变分析。BEAMing 技术可通过固液分离除去多余荧光探针, 降低背景干扰, 可采用普通荧光探针代替高成本分子信标和 TaqMan 探针, 降低成本。但是该方法需要将单个目标分子与单个磁珠包裹在同一液滴中,

增加了操作的复杂性和难度，需要进行大量条件优化实验。

## 2.2 定量分析方法

传统的 qPCR 通常以循环阈值 (cycle threshold, CT) 为定量分析的基础，认为在指数扩增的开始阶段样品间的细小误差尚未放大且扩增效率恒定。对于一个 PCR 反应，到达循环阈值时

$$N_t = N_0(1 + E)^{C_T} \quad (1)$$

其中， $N_0$  为初始模板的拷贝数， $N_t$  为第  $C_T$  个循环时产物的拷贝数， $E$  为扩增效率。将上式两边取对数，得到

$$\begin{aligned} \log N_t &= \log N_0(1 + E)^{C_T} \quad (2) \\ C_T &= -\frac{1}{\log(1 + E)} \log N_0 + \frac{\log N_t}{\log(1 + E)} \end{aligned}$$

对于一个特定的 PCR 反应，扩增效率  $E$  和  $C_T$  个循环时的拷贝数  $N_t$  均为定值，因此， $C_T$  值与初始模板拷贝数  $N_0$  的对数成反比关系。然而，在 PCR 扩增过程当中影响其扩增效率的因素有很多，比如酶和引物浓度等，因此很难保证扩增效率不变，导致定量 PCR 结果的准确度和精密度难以保证。与传统 qPCR 方法不同的是数字 PCR 采用直接计数的方法进行定量分析，也就是在 PCR 扩增结束后有荧光信号(产物) 记为 1，无荧光信号(产物)记为 0，有荧光信号的反应单元中至少包含一个拷贝的目标分子。理论上，在样品中的目标 DNA 浓度极低的情况下，有荧光信号的反应单元数目等于目标 DNA 分子的拷贝数。但是，在通常情况下，数字 PCR 的反应单元中可能包含两个或两个以上的目标分子，这时可以采用泊松概率分布公式 (Poisson distribution) 进行计算。

$$P = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda} \quad (3)$$

上式中  $\lambda$  为每个反应单元中包含目标 DNA 分子的平均拷贝数(浓度)， $p$  为在一定的  $\lambda$  条件下，每个反应单元中包含  $k$  拷贝目标 DNA 分子的概率。 $\lambda$  由样品溶液的稀释系数  $m$  决定，有  $\lambda = cm$ ，其中  $c$  为样品的原始拷贝数(浓度)。当  $k=0$  (不含目标 DNA 分子) 时，上式可简化为  $p = e^{-\lambda} = e^{-cm}$ ， $p$  可以看作是无荧光信号的反应单元数与反应单元总数的比值，即

$$\frac{n - f}{n} = e^{-cm} \quad (4)$$

其中， $n$  为反应单元总数， $f$  为有荧光信号的反应单元数。上式两边取对数 (ln) 得到

$$cm = \ln\left(1 - \frac{f}{n}\right) \quad (5)$$

从数字 PCR 反应单元总数和有荧光信号的单元数以及样品的稀释系数，就可以得到样本的最初拷贝数(浓度)。数字 PCR 的定量方法不依赖于扩增曲线的

循环阈值, 因此不受扩增效率的影响, 也不必采用看家基因( house-keeping gene) 和标准曲线, 具有很好的准确度和重现性(Zimmermann 等,2008), 可以实现绝对定量分析(Bhat 等,2009;Dube 等,2008;Sanders 等,2013)。数字 PCR 的灵敏度也可以称之为分辨率, 指的是对目标基因或突变的识别能力。它除了与检测器的灵敏度和 PCR 扩增效率等因素有关外, 很大程度上取决于反应单元的数目  $n$ 。理论上每个反应单元至多有一个拷贝的 DNA 分子, 相同体积的情况下,  $n = 102$  时, 该方法的最高分辨率为  $1/100$ , 也就是说样品浓度最低为  $1\%$  可以被检出。如果  $n = 104$  时, 就可以从  $104$  个分子中检测到  $1$  个靶标, 即样品浓度最低为  $0.01\%$  可以被检出。因此, 反应单元的数目越多, 数字 PCR 的灵敏度越高, 准确度也越高。

## 2.3 基本操作方法

### 2.3.1 材料

注意避免减少外源 DNA 污染模板 DNA 样本的潜在可能性极为重要, 因此准备专供数字 PCR 用的成套试剂和溶液。用于 PCR 专用的所有玻璃器皿在  $150^{\circ}\text{C}$  烘箱内烘干  $6\text{h}$ ; 所有的塑料器皿用高压灭菌。

(1) 缓冲液和溶液  $67\text{mmol/L}$  Tris (pH 8.8),  $16.6\text{mmol/L}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $6.7\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $10\text{mmol/L}$   $\beta$ -巯基乙醇,  $20\text{mmol/L}$  dATP,  $20\text{mmol/L}$  dCTP,  $20\text{mmol/L}$  dGTP,  $20\text{mmol/L}$  dTTP,  $6\%$ (体积分数) DMSO。

(2) 酶 Taq 聚合酶

(3) 核酸和寡核苷酸

① 外源或目的 DNA。

② 引物和探针:  $1\mu\text{mol/L}$  引物 F1、R1,  $5\mu\text{mol/L}$  引物 INT,  $1\mu\text{mol/L}$  绿色荧光分子信标 (MB-green),  $1\mu\text{mol/L}$  红色荧光分子信标 (MB-red), 引物均溶于  $50\mu\text{mol/L}$  TE 缓冲液中。使用前冷冻保存于暗处。

(4) 特殊设备 96 孔或 384 孔 PCR 板, 自动微量移液器的屏蔽型枪头, 正向排液式移液器, PCR 仪, 离心机, 荧光分光光度计或双通道荧光定量 PCR 仪, 紫外分光光度计。

### 2.3.2 方法

(1) 引物设计 引物 F1 和引物 R1 是用于扩增目的片段的两段特异引物; 引物 INT 是用于在 PCR 扩增中产生单链目的片段; MB-red 是一段 MB 探针, 用于检测目的片段之外的基因组上的任一片段的 PCR 产物, 包括野生型和突变型; MB-green 是一段 MB 探针, 用于检测野生型目的片段的 PCR 产物 (见图 3)。扩增目的片段内的突变能显著阻止 PCR 产物与 MB-green 探针的杂交, 通过比较 MB-green/MB-red 的荧光信号强度可以知道野生型 DNA 占总样本的比例, 从而指导突变型 DNA 占总样本的比例。

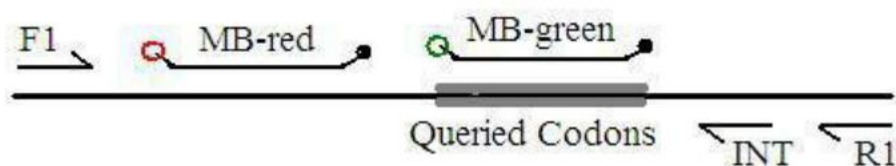


图 3. 数字 PCR 引物设计示意图

## (2) PCR 扩增反应

① 将从组织或者体液中提取的基因组 DNA 样本梯度稀释，然后加入到 96 孔 PCR 板中，大约每个孔中含有 0.5 个基因组 DNA。

注意：稀释后的 DNA 样本需要使用常规的 PCR 反应进行检测，以确定每孔中加入约 0.5 个基因组 DNA。每个孔模板量约为 1.5pg，即定义为每个孔中含有 0.5 个模板分子。

② 按以下各成分配成工作液 700 $\mu$ l，然后在 96 孔 PCR 板的每孔中加入 7 $\mu$ l 工作液，混匀后进行 PCR 反应。

PCR 工作液配比：

10 $\times$ 扩增缓冲液	70 $\mu$ l	1-5U/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶	35U
20 mmol/L 4 种 dNTP 混合液(pH 8.0)	35 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	490-518 $\mu$ l
1 $\mu$ mol/L 引物正向 F1	35 $\mu$ l		
1 $\mu$ mol/L 引物反向 R1	35 $\mu$ l	总体积	700 $\mu$ l

标准 PCR 反应条件：

MgCl <sub>2</sub>	6.7 mmol/L	DMSO	6% (体积分数)
Tris (pH 8.8)	67 mmol/L	引物	1 $\mu$ mol/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16.6mmol/L	Taq DNA 聚合酶	0.05U/ $\mu$ l
$\beta$ -巯基乙醇	10 mmol/L	模板 DNA	0.5 个分子
dNTPs	1 mmol/L		

③ 在反应混合液的上层加一滴透亮的轻矿物油（约 50 $\mu$ l），防止样本在 PCR 反应多个循环过程中蒸发。

④ 放置 96 孔 PCR 板在 PCR 仪器上。按一下方法进行 PCR 扩增。相应的循环条件与温度如下：

94 $^{\circ}$ C	1min	} 进行 60 次循环
94 $^{\circ}$ C	15s	
55 $^{\circ}$ C	15s	
70 $^{\circ}$ C	15s	
70 $^{\circ}$ C	1min	

反应体系马上进行荧光分析或在室温下保存最多 36h，然后进行荧光分析。

## (3) 荧光分析

① 按以下各成分配制工作液 400 $\mu$ l，在 96 孔板的每个孔中加入 3.5 $\mu$ l 工作

液:

10×扩增缓冲液	40μl	20μmol/L MB-red	20μl
20 mmol/L 4 种 dNTP 混合液(pH 8.0)	20μl	1-5U/μl Taq DNA 聚合酶	40U
20μmol/L 引物 INF	100μl	H2O	160-192μl
20μmol/L MB-green	20μl	总体积	400μl

标准数字 PCR 反应条件:

MgCl <sub>2</sub>	6.7 mmol/L	DMSO	6% (体积分数)
Tris (pH 8.8)	67 mmol/L	引物 INT	5μmol/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16.6mmol/L	Taq DNA 聚合酶	0.1U/μl
β-巯基乙醇	10 mmol/L	MB-red	1μmol/L
dNTPs	1 mmol/L	MB-green	1μmol/L

② 以 6000g 离心 96 孔 PCR 板 20s。

③ 将 96 孔 PCR 板放入 PCR 仪中, 按以下方法进行 PCR 扩增。相应的循环条件与温度如下:

94℃	1min	} 进行 10-15 次循环
94℃	15s	
55℃	15s	
70℃	15s	
94℃	1min	
60℃	5min	

④ 将 PCR 板在室温下孵育 10-60min, 然后放入荧光分光光度计中, 用 485nm/530nm 波长激发 MB-green 荧光, 530nm/590nm 波长激发 MB-red 荧光。计算 red/green 比=MB-red 荧光强度/MB-green 荧光强度, 并使用阳性对照来校正 red/green 比。

### 2.3.3 注意事项

数字 PCR 扩增过程中不能使用巢式 PCR, 因为如果在进行数字 PCR 时使用巢式 PCR 不仅适用不方面, 而且会导致污染问题。

数字 PCR 需选择加热后才会有活性的 DNA 聚合酶。

数字 PCR 反应不需要很长时间 (约 150min), 但比普通 PCR 需要更多的循环次数, 远高于通常所使用的循环次数。因为在某些孔中的模板可能经过几次循环之后才开始扩增反应。高次数循环反应能保证孔中有模板, 每个 PCR 孔中都能产生几乎相等的 PCR 产物。

用激发/发射波长 485nm/530nm 检测 MB-green 荧光, 激发/发射波长 530nm/590nm 检测 MB-red 荧光。在没加入 DNA 模板分子时, 每孔的荧光通常在 10000-20000 特定荧光单位 (specific fluorescence, SFU)。

## 3. 数字 PCR 技术分类

数字 PCR 技术提出至今, 相关技术和产业化发展都非常迅速。迄今为止,



数字 PCR 技术主要有三类：微反应室/孔板(Lo 等,2007;Morrison 等,2006)、微流体(大规模集成微流控芯片)(Fan 等,2007;Ottesen 等,2006;Qin 等,2008)和液滴(Diehl 等,2006;Hindson 等,2011)数字 PCR 系统。

### 3.1 微反应室/孔板数字 PCR

传统 PCR 或定量 PCR 反应都是在 96 /384 孔板中进行的,因此早期的数字 PCR 技术也采用 96 /384 孔板作为反应单元(Lo 等,2007;Vogelstein 等,1999)。但是数字 PCR 技术的灵敏度取决于反应单元的总数  $n$ , 因此,理论上反应单元数越多越有利于提高灵敏度和准确度,普通的 96 /384 孔板无法满足检测的需要。而且,在 96 /384 孔板中进行的 PCR 反应体系通常大于  $5\mu\text{l}$ , 由试剂消耗引起的高成本问题令人望而却步。针对上述问题, Morrison 等(Morrison 等,2006)在  $25\text{mm}\times 75\text{mm}$  不锈钢芯片上刻蚀了 3072 个直径为  $300\mu\text{m}$  的微反应室(如图 4a 所示), 每个反应单元的体积降低至  $33\text{nl}$ 。该芯片可在商品化 PCR 仪上使用,与 384 孔板的检测灵敏度相当,但反应体积降低为原来的  $1/64$ , 样品通量提高了 24 倍。随着反应单元数目的成倍增加,反应体积从微升级降至纳升级,传统的操作人员采用移液器加试样的方式已经无法满足快速精准取样的要求,因此需要借助高通量自动点样仪或机械手等设备,这无疑大幅提高了系统的成本和操作的复杂性。

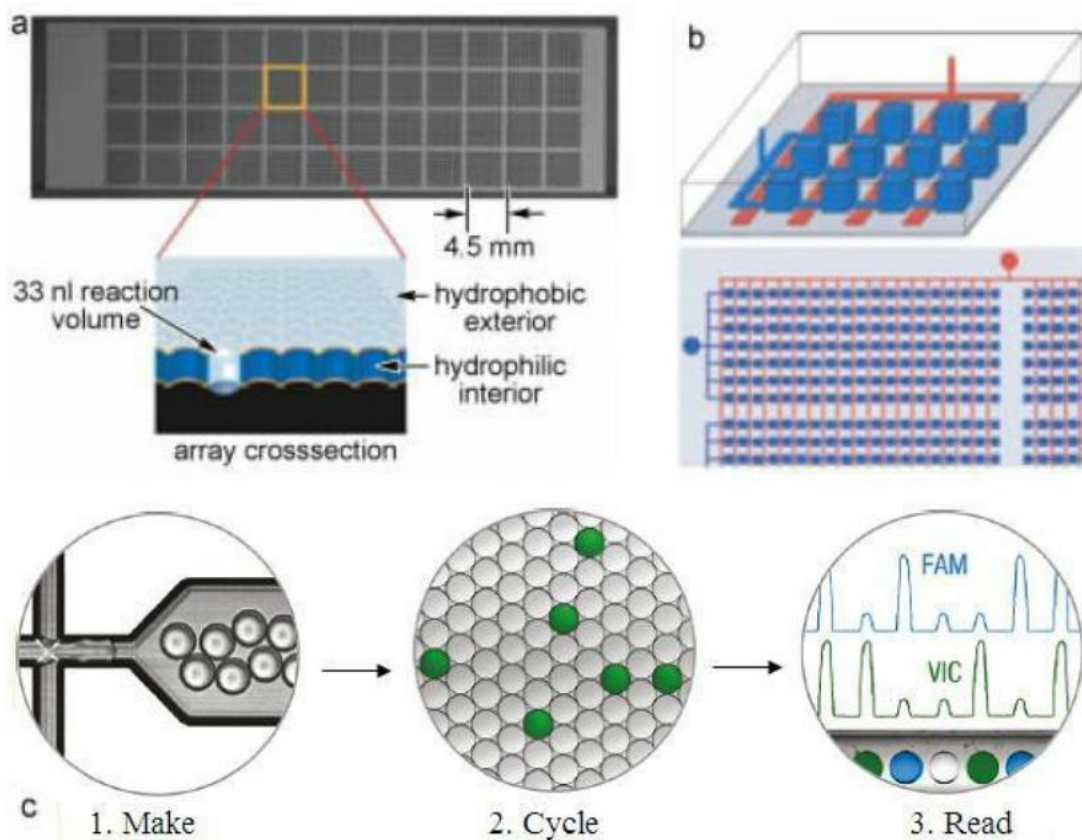


图 4. 几种典型数字 PCR 芯片： a) 微反应室/孔板数字 PCR( OpenArray™ )(Morrison 等,2006); b) 大规模集成微流体数字 PCR 芯片( BioMark™ )(Ottesen 等,2006); c) 微液滴数字 PCR( QX100™ )(Hindson 等,2011)

### 3.2 微流体数字 PCR

微流体装置使现代数字 PCR 技术能在一次 PCR 反应中执行高度平行分析。多层软刻蚀(multilayer soft lithography, MSL)技术赋予了设计集成微流体电路和控制生产微流体芯片的成本效益的能力, MSL 芯片在生物化学和分子生物学中被广泛运用, 如 DNA 的分类和综合、单细胞的分离和分析、细胞培养或全基因组扩增。原则上, 任何在反应管中能够进行的分子反应, 都能够在微流体芯片中实现。在一个 MSL 芯片上能够执行成千上万个独立的 PCR 反应, 减少了试剂消耗和移液器的必要步骤, 利用微流体控制阀可轻松地将单个样本分解成大量单独的反应, 并以自动化的方式来执行数字 PCR。

在微流体芯片中, 一个阳性的反应至少包含一个目标分子, 非常稀的样本中阳性数与目标数非常相似, 在不止一个目标分子的情况下, 即使很大比例的反应是阳性, 也可以通过基于泊松分布(poisson distribution)的算法计算样本的丰值(95%置信区间), 并控制平均值。为了实现对样本靶序列的绝对定量, 微流体数字 PCR 并不依赖在 PCR 指数期收集数据, 并不需要一个对照, 也不需要标准来实现绝对定量, 因此, 微流体数字 PCR 具有精确的数据和良好的准确度。尽管在市场上有很多其它平台也出现了可以启用数字 PCR 的其它便捷方式, 但目前在绝大多数微流体数字 PCR 研究中使用的依然是 MSL 芯片。

微流体数字 PCR 用途广泛, 可以应用在单细胞基因表达的定量、点突变的绝对定量和各种相对定量中。2000 年, Unger 等(Unger 等,2000)采用多层软刻蚀技术在聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)微流体芯片上设计并加工高密度微泵微阀结构(如图 4b 所示), 他们将这种芯片称为 IFC (integrated fluidic circuit)。IFC 利用 PDMS 材料具有高弹性的特点, 通过多层软刻蚀技术在芯片上加工交织的液体和气体通道结构, 可以快速并准确地将流体分成若干个独立的单元, 进行多步平行反应。2006 年 Ottesen 等(Ottesen 等,2006)将 IFC 芯片用于数字 PCR 分析, 通过精准控制微泵微阀的开启和关闭, 一步操作即可将一个样本平均分配到 1176 个反应单元中, 每个反应单元的体积只有 6.25nl, 成功代替了传统点样仪和 384 孔板。他们同时进行了 6 个样本 7056 个单元的平行数字 PCR 分析。此外, Hansen 及其同事(Heyries 等,2011)采用 MSL 技术加工了具有 106 个结构单元的数字 PCR 芯片, 每个反应单元的体积降低至 10pl, 芯片密度达到 440000/cm<sup>2</sup>。

### 3.3 液滴数字 PCR

液滴数字 PCR 源于乳液 PCR(emulsion PCR)技术(Margulies 等,2005;Tawfik 等,1998), 即将 DNA 模板与连接引物的磁性微球以极低的浓度(比如单拷贝)包裹于油水两相形成的纳升至皮升级液滴中进行 PCR 扩增, 扩增后的产物富集在磁性微球上, 收集破乳后进行测序。通过油水两相间隔得到的以液滴为单位的 PCR 反应体系, 比微孔板和 IFC 系统更容易实现小体积和高通量, 而且系统简单, 成本低, 因此成为理想的数字 PCR 技术平台。Vogelstein 及其同事(Diehl

等,2005;Diehl 等,2006;Dressman 等,2003)提出的 BEAMing 技术就是一种基于乳液 PCR 的数字 PCR 系统。Lu 等(Shi 等,2010)也采用 BEAMing 和连接酶反应实现对 mRNA 的定量分析。Zhou 等(Zhou 等,2002)在 BEAMing PCR 扩增后破乳,将连接不同产物的磁珠包被在聚丙烯酰胺凝胶中制成磁珠阵列进行荧光检测。但是,上述技术需要将单拷贝 DNA 模板与磁珠同时包裹在一个液滴中,增加了系统的复杂性和定量分析的难度。液滴数字 PCR 经常与微流体数字 PCR 一起使用,Beer 等(Beer 等,2008;Kiss 等,2008)在微流控芯片通道中用油相包裹皮升级液滴,液滴中只包裹了单拷贝 DNA 模板、PCR 引物及试剂,实现了数字 PCR 定量分析。Hindson 等(Margulies 等,2005;Pinheiro 等,2011)在微流控芯片中生成了 20 000—2 000 000 个体积为 1nl 的液滴,然后将液滴转移到 96 孔板中进行 TaqMan PCR 扩增,至终点后将液滴从 96 孔板中取出,在微流控芯片中采用流式方法使液滴顺次经过双通道荧光检测器,以 1 000 个液滴/s 的速度进行计数。Pekin 等(Pekin 等,2011)设计了一种微流控芯片,可分别生成包含不同荧光探针和 DNA 模板的液滴,再进行液滴融合,他们将该系统用于 KRAS 基因突变分析。此外,Shen 等(Shen 等,2010)提出了一种通过滑动芯片(SlipChip)液滴数字 PCR 系统,设计了带有微流体通道和反应单元的玻璃芯片,上下两片之间用油相密封,通过滑动将样品溶液从流体通道中引入反应单元,同时生成 1280 个体积仅为 2.6nl 的液滴阵列,在芯片上进行 PCR 扩增和荧光成像分析。随后,他们还设计了具有不同体积反应单元的 SlipChip,从 1nl 变化到 125nl,仅用不到 200 个反应单元,理论上可以实现 12000 个等体积反应单元所能达到的检测浓度范围(Kreutz 等,2011)。Yang 等(Leng 等,2010)还合成了凝胶微球作为反应单元进行数字 PCR 扩增和定量分析,与前述液滴相比凝胶微球体系更加稳定和可控,易于收集和保存扩增产物。

## 4 数字 PCR 的应用

### 4.1 产前诊断 (prenatal diagnosis)

产前诊断又称宫内诊断,是指胎儿出生前采用遗传学和影像学等各种检测方法预测其是否有先天性疾病,是预防染色体病患儿出生的主要措施。传统的产前诊断采用侵入性诊断 (invasive prenatal diagnosis) 方法,主要包括孕中期的胎儿羊水的产前诊断、脐血的产前诊断,目前常用的取材手术主要有绒毛膜绒毛取样,羊膜腔穿刺,脐带血穿刺等,但这些方法对母体和胎儿均有一定的创伤并存在胎儿丢失风险。而非侵入性产前诊断(non-invasive prenatal diagnosis, NIPD)则采用了无创伤的技术方法避免了以上的安全威胁,成为当下引起广泛关注的诊断方法。1997 年,Lo 等采集孕妇血液进行研究,利用 PCR 的方法扩增 Y 染色体特异片段并出现阳性信号,证明母体血液中存在胎儿的 DNA(Lo 等,1997),自此拉开了 NIPD 研究的序幕。但是,从大量母体 DNA 中成功检测到胎儿游离 DNA 的过程中存在相当大的难度,需要提高检测方法的灵敏度和特异性。2007 年,Lo 等利用数字 PCR 技术发展了两种策略用于产前诊断胎儿 21 三体综合症,其一称之为

digital RNA-SNP, 检测胎盘细胞特异表达即完全来自胎儿的 21 号染色体上 PLAC4 mRNA 的 SNP 位点的比例; 其二为 digital RCD 法, 检测孕妇血液中 21 号染色体与 1 号染色体的相对含量, 可以检测到血液中 25% 的胎儿基因(Lo 等,2007)。Lun 等(2008)比较了数字 PCR 与实时定量 PCR、质谱检测三者的灵敏度, 发现数字 PCR 比其他两种方法更为精确, 因此, 数字 PCR 检测到胎儿基因浓度可能高于预期。随着研究的深入, 数字 PCR 被证明比传统技术方法具有更高的临床灵敏度和特异性, 未来该技术在产前诊断领域将越来越被广泛地应用。

#### 4.2 癌症诊断检测

研究表明, 肿瘤可能通过细胞坏死及凋亡从而释放大量的基因组 DNA 进入人体系统循环, 因此可以通过这些 DNA 分子的微卫星 DNA 变化、易位、突变和甲基化等对癌症进行检测。近年来, 数字 PCR 技术被广泛应用到血液、粪便等非侵入性样本分析中, 为癌症的检测提供新的途径。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)属于酪氨酸激酶受体, 它介导的信号转导途径调节细胞的生长、增殖和分化, 大量研究表明, EGFR 基因的突变或过表达会导致癌症的发生。Yung 等(2009)利用数字 PCR 技术研究非小细胞性肺癌病人血浆和肿瘤中第 19 外显子框内缺失和第 21 外显子 L858R 突变两种 ERFR 突变体, 通过微流体系统对 35 份血浆样本进行检测, 两种突变类型检出率分别为 17%和 26%, 该结果与对肿瘤样本的测序相比, 其灵敏度和特异性分别达到 92%与 100%。随后, Wang 等(2010)也将数字 PCR 检测应用到肺癌基因组中 EGFR 异常的检测中, 得出了相同的结论, 即数字 PCR 能够对 EGFR 突变具有灵敏的检测与精确的定量, 适用于肺癌的诊断, 对预测治疗反应、监测病情进程及早期抗药性诊断等提供了非常有利的分析手段。

在对结肠癌的研究中, (Taly 等,2013)采集 19 位病人的血液样本, 通过数字 PCR 分析结果显示其中 14 例样本检测到 *KRAS* 基因突变, 1 例检出与肿瘤样本不一致的突变, 另外 5 例则检测不到, 同时其中 5 例 *BRAF V600E* 突变型全部检测出来。(Qi 等,2011)则利用数字 PCR 对直肠癌病人的粪便样本进行 mRNA 定量分析, 在 8 例病人组织和 9 例粪便样本中的检出率分别达 100%和 77%。

#### 4.3 基于数字 PCR 的单分子测序技术

下一代测序(next generation sequencing, NGS)的诸多商业化平台需要通过测序校准分子数量, 因此存在着两个弊端: 其一, 大量微克级的样品需要制备为文库, 对于如考古、法医和临床等 NDA 量比较少的样本的测序工作来说面临困难, 限制了可测序样品的范围; 其二, 每个文库都需进行滴定法测序, 测序通量降低的同时大大增加了测序成本。近年来, 对于高通量 DNA 测序的需求促使更快捷经济的代替方法的出现。Margulies 等(2005)将微滴数字 PCR 技术应用于高通量测序的样本前期制备中, 通过该方法将单拷贝 DNA 包裹于皮升级液滴中进行

PCR 扩增,从而可以获得数百万计单一序列克隆分子,消除了样本单位的限制。此外,较之传统测序技术,测序通量提升了 100 倍,成本降低了 10 倍,且一次基因组测序可以在数小时之内便完成。White 等(2009)采用数字 PCR 技术结合 454 和 Solexa 测序平台,跳过滴定校正步骤,成功的对低于纳克级的细菌和哺乳动物 DNA 样本进行测序,并首次成功进行了基于 454 平台皮克级的 DNA 测序,将可测序 DNA 样本量要求降低了 1000 倍。

#### 4.4 转基因作物检测

转基因作物自诞生开始便得到快速的发展,当今社会,随着转基因作物种植面积越来越广泛,转基因作物的食用与环境安全问题也越来越引起人们的重视,因而对转基因检测技术的提升显得十分重要。目前,在转基因的检测中多使用 qPCR 方法,但该方法往往在检测目标片段的量较少或者存在复杂基质的情况下受到很大的局限。Corbisier 等(2010)在研究转基因玉米 MON810 时,从玉米种子中提取 DNA,利用数字 PCR 对外源基因与内标准基因 *hmg* 进行绝对定量,发现与用 real-time qPCR 对参照质粒的定量值是一致的,证明了数字 PCR 应用到转基因植物检测之中的可行性与可靠性。Burns 等(2010)等利用已经 real-time PCR 确认的转基因作物来评估数字 PCR 绝对定量的检测限 (limits of detection, LOD) 与定量限 (limits of quantitation, LOQ),同时也分析了当采用梯度预实验的方法时,数字 PCR 可以更精确地测量拷贝数。最近的研究表明,液滴数字 PCR 不仅较之 qPCR 在低浓度靶标时有更好的重复性,且受抑制剂的影响更小,此外,其灵敏度要高出微反应室数字 PCR 四个数量级(Morisset 等,2013),因此,液滴数字 PCR 在未来转基因作物及相关食品检测中可以发挥更好的作用。

#### 4.5 微生物检测

病毒或许为环境中最为丰富存在的种群,但目前仍缺乏宏基因组学和经典的噬菌体分离技术来研究宿主和大多病毒之间的关系。Tadmor 等(2011)通过一个病毒标记基因将单个细菌和自然环境关联起来,利用微流体数字 PCR 技术研究白蚁后肠中的微生物群落,发现在属的范围侵染模式呈现非常明显的属间选择。病毒标志物表现出宿主间严格的等位基因混合,阐明了除邻近宿主外的等位基因横向基因转移的限制程度。该研究方法不需要对病毒或宿主进行培养,为分析多种环境下病毒-细菌相互作用提供了一种新的便捷方法。

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的分子诊断一般使用 qPCR 技术,然而当病人采用联合抗病毒治疗法(combination antiretroviral therapy, cART) 进行有效的治疗后, HIV 载量降低,此时 qPCR 因其灵敏度不能达到检测要求而面临困难。Strain 等(2013)利用数字 PCR 检测 HIV DNA,对 300 例临床样本进行分析,其中超过 150 例样本分别用两种方法检测,通过对比,发现液滴数字 PCR 与 qRNA 相比精确度有非常显著的提高,同时液滴数字 PCR 检测总拷贝数的变异系数平均要比 qPCR 低 5 倍,而 2-LTR 检测精确度较 qPCR 提

升超过 20 倍。此外，数字 PCR 检测技术进行绝对定量而不依赖内参照标准。鉴于以上的诸多优势，未来数字 PCR 在 HIV 临床检测上具有非常大的潜力，以促进隐藏 HIV 病人的治疗并达到最终清除体内 HIV 的可能。

## 5 总结与展望

生物学的基础研究和分子技术的前进伴随着更精确和更灵敏的测量技术发展。传统的 qPCR 主要依赖于校准物制备的标准曲线，进而确定未知样品的浓度，因此是一种相对定量的方法。该技术存在以下问题：a. 校准品和样品间背景的不同将引入偏差，并且影响 PCR 的效率和测量响应；b. 低拷贝数的目标 DNA 分子不能通过扩增检测到；c. 样品的 PCR 扩增效率可能与校准物的扩增效率不同；d. 核酸提取时引入核酸溶液的杂质或者核酸降解影响了 PCR 动态扩增过程。而 dPCR 是一项检测和定量核酸的新技术。它不同于传统的 qPCR，因为采用直接计数目标分子数而不依靠任何校准物或外标，dPCR 通过计数单个分子从而实现绝对定量。dPCR 将传统 PCR 的指数数据转换成数字信号，仅仅通过显示程序设定的循环数后扩增是否发生，即可克服上述困难，达到核酸的绝对定量。

虽然 dPCR 目前还处于初期发展阶段，但全球各大公司对有前景的 dPCR 技术竞争激烈，新技术新方法不断出现，极大地推动了该领域的产业化进程。2010 年，QuantaLife 公司开发出微滴数字 PCR(ddPCR)；2011 年 10 月，Bio-Rad 公司收购了 QuantaLife 和 ddPCR 技术，推出了 QX100<sup>TM</sup>，在拷贝数变异(CNV)、稀有等位基因检测和血浆 DNA 定量等方面的研究表现得十分优异；2012 年 4 月份，Rain Dance Technologies 公司推出了一种新型液滴平台，这一平台能进行多重 dPCR 反应，将每天的反应通量提高到了上亿个反应；另外 Life Technologies 公司也推出了 QuantStudio<sup>TM</sup> 3D 数字 PCR 系统，这是一款基于芯片的可扩展仪器，有望加速 dPCR 这一技术的普及。

但是，目前的 dPCR 技术仍然存在一些不足，制约了该技术广泛应用。例如，dPCR 自身特点决定了其分析的样品通量很低，基本每块芯片上万个反应单元都是针对单一样本的分析。而荧光检测技术的局限性限制了多个芯片的同时检测，因此该技术目前在常规基因表达分析中不具备优势。基于精密仪器和复杂芯片的 dPCR 技术成本高昂，也是制约其广泛应用的一个原因。相信在未来的几年里将会不断有新的技术和产品出现，使 dPCR 技术更加优化完善，不断扩展其应用范围，使之成为新一代分子诊断工具。

## 6. 参考文献

1. Beer NR, Wheeler EK, Lee-Houghton L, Watkins N, Nasarabadi S, Hebert N, Leung P, Arnold DW, Bailey CG, Colston BW. (2008). On-chip single-copy real-time reverse-transcription PCR in isolated picoliter droplets. *Analytical chemistry*, 80(6): 1854-1858.
2. Bhat S, Herrmann J, Armishaw P, Corbisier P, Emslie KR. (2009). Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Analytical and*

- bioanalytical chemistry, 394(2): 457-467.
3. Brown JF, Kalinina OV, Silver JE. Method of sampling, amplifying and quantifying segment of nucleic acid, polymerase chain reaction assembly having nanoliter-sized sample chambers, and method of filling assembly [M]. Google Patents. 2000.
  4. Burns M, Burrell A, Foy C. (2010).The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis. *European Food Research and Technology*, 231(3): 353-362.
  5. Corbisier P, Bhat S, Partis L, Rui Dan Xie V, Emslie K. (2010).Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6): 2143-2150.
  6. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Goodman SN, David KA, Juhl H. (2005).Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45): 16368-16373.
  7. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. (2006).BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nature methods*, 3(7): 551-559.
  8. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. (2003).Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15): 8817-8822.
  9. Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. (2008).Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One*, 3(8): e2876.
  10. Fan HC, Quake SR. (2007).Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Analytical chemistry*, 79(19): 7576-7579.
  11. Heyries KA, Tropini C, VanInsberghe M, Doolin C, Petriv I, Singhal A, Leung K, Hughesman CB, Hansen CL. (2011).Megapixel digital PCR. *Nature methods*, 8(8): 649-651.
  12. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC. (2011).High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*, 83(22): 8604-8610.
  13. Kiss MM, Ortoleva-Donnelly L, Beer NR, Warner J, Bailey CG, Colston BW, Rothberg JM, Link DR, Leamon JH. (2008).High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets. *Analytical chemistry*, 80(23): 8975-8981.
  14. Kreutz JE, Munson T, Huynh T, Shen F, Du W, Ismagilov RF. (2011).Theoretical design and analysis of multivolume digital assays with wide dynamic range validated experimentally with microfluidic digital PCR. *Analytical chemistry*, 83(21): 8158-8168.
  15. Leng X, Zhang W, Wang C, Cui L, Yang CJ. (2010).Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR. *Lab on a Chip*, 10(21): 2841-2843.
  16. Liu J, Hansen C, Quake SR. (2003).Solving the "world-to-chip" interface problem with a microfluidic matrix. *Analytical chemistry*, 75(18): 4718-4723.
  17. Lo Y, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. (1997).Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*, 350(9076): 485-487.
  18. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW. (2007).Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(32): 13116-13121.
  19. Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, Yeung Leung T, Kin Lau T, Dennis Lo YM. (2008).Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal

- plasma. *Clin Chem*, 54(10): 1664-1672.
20. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen Y-J, Chen Z. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057): 376-380.
  21. Morisset D, Štebih D, Milavec M, Gruden K, Žel J. (2013). Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PloS one*, 8(5): e62583.
  22. Morrison T, Hurley J, Garcia J, Yoder K, Katz A, Roberts D, Cho J, Kanigan T, Ilyin SE, Horowitz D. (2006). Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 34(18): e123-e123.
  23. Mullis KB. Process for amplifying nucleic acid sequences [M]. US Patent 4,683,202. 1987.
  24. Ottesen EA, Hong JW, Quake SR, Leadbetter JR. (2006). Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria. *science*, 314(5804): 1464-1467.
  25. Pekin D, Skhiri Y, Baret J-C, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, Millot F, El Harrak A, Hutchison JB, Larson JW. (2011). Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*, 11(13): 2156-2166.
  26. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR. (2011). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical chemistry*, 84(2): 1003-1011.
  27. Pohl G, Shih I. (2004). Principle and applications of digital PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 4(1): 41-47.
  28. Qi Z, Ma Y, Deng L, Wu H, Zhou G, Kajiyama T, Kambara H. (2011). Digital analysis of the expression levels of multiple colorectal cancer-related genes by multiplexed digital-PCR coupled with hydrogel bead-array. *Analyst*, 136(11): 2252-2259.
  29. Qin J, Jones RC, Ramakrishnan R. (2008). Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucleic acids research*, 36(18): e116-e116.
  30. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487-491.
  31. Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. (2013). Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *PloS one*, 8(9): e75296.
  32. Shen F, Du W, Kreutz JE, Fok A, Ismagilov RF. (2010). Digital PCR on a SlipChip. *Lab on a Chip*, 10(20): 2666-2672.
  33. Shi X, Tang C, Wang W, Zhou D, Lu Z. (2010). Digital quantification of gene expression using emulsion PCR. *Electrophoresis*, 31(3): 528-534.
  34. Strain MC, Lada SM, Luong T, Rought SE, Gianella S, Terry VH, Spina CA, Woelk CH, Richman DD. (2013). Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PloS one*, 8(4): e55943.
  35. Tadmor AD, Ottesen EA, Leadbetter JR, Phillips R. (2011). Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR. *Science*, 333(6038): 58-62.
  36. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, Atochin I, Link DR, Griffiths AD, Pallier K. (2013). Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clinical chemistry*, 59(12): 1722-1731.
  37. Tawfik DS, Griffiths AD. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature biotechnology*, 16(7): 652-656.
  38. Unger MA, Chou H-P, Thorsen T, Scherer A, Quake SR. (2000). Monolithic microfabricated valves



- and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288(5463): 113-116.
39. Vogelstein B, Kinzler KW. (1999). Digital Pcr. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16): 9236-9241.
40. Wang J, Ramakrishnan R, Tang Z, Fan W, Kluge A, Dowlati A, Jones RC, Ma PC. (2010). Quantifying EGFR alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital PCR arrays. *Clinical chemistry*, 56(4): 623-632.
41. Warren L, Bryder D, Weissman IL, Quake SR. (2006). Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47): 17807-17812.
42. White R, Blainey P, Fan HC, Quake S. (2009). Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 10(1): 116.
43. Yung TK, Chan KA, Mok TS, Tong J, To K-F, Lo YD. (2009). Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 15(6): 2076-2084.
44. Zhou W, Goodman SN, Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Pignatelli C, Purdie CA, Piris J, Morris R, Harrison DJ. (2002). Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers. *The Lancet*, 359(9302): 219-225.
45. Zimmermann BG, Grill S, Holzgreve W, Zhong XY, Jackson LG, Hahn S. (2008). Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat Diagn*, 28(12): 1087-1093.
46. 金钦汉. (2010). 一种将改变人类 “命” 运的新技术——集成流路芯片-数字 PCR (IFC 芯片-dPCR). *科学中国人*, 7): 32-33.