

数字核酸扩增检测技术的研究与应用进展

丁雄^{1,2} 牟颖^{*1}

¹(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 310058)

²(浙江大学生命科学院, 杭州 310058)

摘 要 近年来,微纳尺度流体控制技术由于具备实现多相、多步和平行反应的优势,已成为传统分析手段的首选的补充和替代方法。其与核酸扩增方法的完美结合,有效推动了数字核酸扩增检测(Digital nucleic acid detection, dNAD)技术的建立与发展。作为可实现单分子水平检测的分析方法, dNAD 技术已成为分子诊断领域重要的组成部分。本文回顾了 dNAD 技术的发展历程,阐述了其检测原理,以及相比于传统方法的优势,对其最新研究与应用进展进行了综述,并对其未来的发展进行了展望。

关键词 微纳尺度; 微流控; 数字核酸扩增检测; 数字 PCR; 流体控制; 综述

1 引 言

现代生物医学研究结果表明,对核酸生物标记物进行分析,能有效监控与评估相关疾病的发生、发展与愈后^[1~3]。核酸分析包括定性与定量分析两种,尤其是定量分析,对揭示疾病发生发展的分子机制至关重要。作为核酸分析的未来发展方向,单分子水平的数字核酸扩增检测(Digital nucleic acid detection, dNAD)技术在现代生物、医学研究及诊断领域中的应用备受关注。

目前,常规或“金标准”的核酸分析技术是聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)。自 1983 年,PCR 诞生以来,PCR 及其衍生技术极大地推动了生命科学各个领域的发展。纵观整个发展历程,PCR 技术可分为 3 个时代^[4]。第一代 PCR,使用琼脂糖凝胶电泳等方式对核酸扩增产物进行分析,但操作繁琐、易交叉污染,且只能进行定性分析;第二代 PCR 则是由美国 ABI 公司推广的实时荧光定量 PCR(Real-time quantitative PCR, qPCR)。作为新一代的 PCR 技术, qPCR 不仅能进行定性分析,还能进行定量分析。根据定量策略的不同,又分为相对定量和绝对定量。相对定量是以管家基因的表达量为参照,对待测基因表达量进行定量分析的策略,常用于基因表达水平分析;绝对定量则是利用以已知核酸分子数的标准品与循环阈值(C_T)之间建立的标准曲线对未知样本中核酸分子进行定量测定的策略。然而,在 qPCR 扩增的过程中存在扩增偏好或易受抑制剂影响等因素,其扩增效率在不同样本间难以保持一致,因此使得 C_T 在核酸定量分析过程中有明显偏差,从而导致检测原始样本的核酸数量出现明显误差。采用 qPCR 对核酸定量,仍存在灵敏度、准确度和重现性欠佳的不足,难以满足对稀有突变基因的表达量、低拷贝核酸量的分析要求。鉴于此,第三代 PCR 即数字 PCR(Digital PCR, dPCR)技术应运而生。与前两代 PCR 技术相比, dPCR 的测量精确度和灵敏度明显提高^[5],是真正意义上的绝对核酸定量分析技术^[6]。本文对 dNAD 的研究与应用进展进行了综述,并对其发展历程、原理优势和未来发展前景进行了阐述和展望。

2 dNAD 的发展历程

作为一种开创性的定量分析技术, dPCR 推动 PCR 技术迈入了新的高度,使核酸定量分析进入到以“终点信号的有或无”来计算数量的新阶段^[7]。虽然其雏形早在 qPCR 成熟之前就被提及,但 dPCR 的概念却是由美国科学家 Vogelstein 和 Kinzler 在 1999 年明确提出^[8]。就本质而言, dPCR 就是通过大规模的平行荧光 PCR 扩增,将微弱的扩增信号从背景噪音中精准地提炼出来^[7]。因此,如何获得足够数

2016-02-23 收稿; 2016-03-18 接受

本文系国家自然科学基金提供资助(No. 31270907, 31070772)

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

量的平行荧光 PCR 成为实现 dPCR 的关键,而微纳流体控制技术及其芯片装置的开发应用,为解决这一问题提供了解决方案。到目前为止,已发展出了各式各样的 dPCR 装置,如集成流路式芯片^[9]、旋流片式^[10]、滑动芯片式^[11]、液滴式^[12]、自吸分液芯片式^[13]等。商业化的 dPCR 平台也不断面世,主要有 Fluidigm 公司的 Bio-Mark™ 高通量基因分析系统、Bio-rad 公司的 QX100 和 QX200 液滴式 dPCR 系统、ThermoFisher 公司的 QuantStudio™ 3D dPCR 系统、RainDance Technologies 公司的 RainDrop™ dPCR 系统和 Formulatrix 公司的 Constellation™ dPCR 系统等(图1)。



图1 常见的商品化数字核酸扩增检测检测平台

Fig. 1 Common commercial digital nucleic acid detection (dNAD) platforms

在 dPCR 技术问世后,很快又发展出了数字等温核酸扩增技术(Digital isothermal nucleic acid amplification, dINAA),并已成为 dNAD 重要的组成部分。与 dPCR 不同的是, dINAA 的实施不依赖热循环,只需一个恒定的温度即可完成数字化水平扩增。因此, dINAA 的诞生使 dNAD 具备向现场分析或即时诊断(Point-of-care testing, POCT)发展的可能。但是,从原理上而言, dINAA 与 dPCR 二者无差别,只是将 PCR 替换成等温扩增方法。现有 dINAA 中,最引人关注的是数字环介导等温扩增技术(Digital loop-mediated isothermal amplification, dLAMP),具备简单、快速、高特异性和高灵敏性的扩增特点^[14-17]。除 dLAMP 外,已报道的 dINAA 技术还包括数字多链置换扩增技术(Digital multiple strand displacement, dMDA)^[18]、数字等温超分支滚环扩增(Digital isothermal hyperbranched rolling circle amplification, dHRCA)^[19]、数字等温多自配引发扩增技术(Digital isothermal multiple-self-matching-initiated amplification, dIMSA)^[20]、数字重组酶扩增技术(Digital recombinant polymerase amplification, dRPA)^[21]、数字等温滚环扩增(Digital isothermal rolling circle amplification, dRCA)^[22]等。

3 dNAD 的原理与优势

从本质上说, dNAD 与传统核酸扩增方法的原理相同,都是对核酸分子进行扩增,达到可被检测的水平,即反应中荧光信号的产生机理是无差别的,但二者在原理上又存在明显的不同。首先, dNAD 通过将样本分散到成千上万个单元中进行大规模的平行核酸扩增反应,使其具备分析单个核酸分子的能力;其次, dNAD 主要在扩增结束后,采集每个反应单元的荧光信号,以“有”或“无”信号的单元个数来对样本核酸数进行定量分析;最后, dNAD 无需构建标准曲线,通过直接计数或泊松分布公式即可对原始样本的核酸数进行计算。

利用 dNAD 进行核酸定量分析,主要包括 3 个核心步骤(图2)^[5,9,23,24]:(1) 原始样本必须被随机分配到足够数量的反应微单元中,尽可能使得每个单元最多含一个分子;(2) 对每个反应微单元的扩增信号进行采集并合理划分信号阈值,以保证阳性信号与阴性信号单元被精准区分;(3) 检测荧光并计数,必要时利用统计学方法对数据进行适当的分析或修正。理论上讲,如果反应微单元的数量足够多(不考虑体积因素)或者被分散的核酸分子足够少,一个阳性信号的微反应就代表原始样本中的一个目标核酸分子。但是,在实际工作中,由于技术障碍,样本核酸分子很可能并没有很好地被离散化,使得一

个阳性微单元往往含有不止一个分子。因此, μ NAD 的测量结果需借助统计学方法修正, 如泊松分布统计分析。作为一种随机分布, 泊松分布在微单元未达到饱和核酸分子数前, 依然能被利用去逆推原始样本的核酸分子数。当然, 此时 μ NAD 的测试精度取决于泊松精度, 而泊松精度取决于微反应单元的数量。总之, 从原理上讲, μ NAD 可以被看成一种具备二进制结果输出的测量技术, 类似于计算机领域的“1”和“0”的区分。

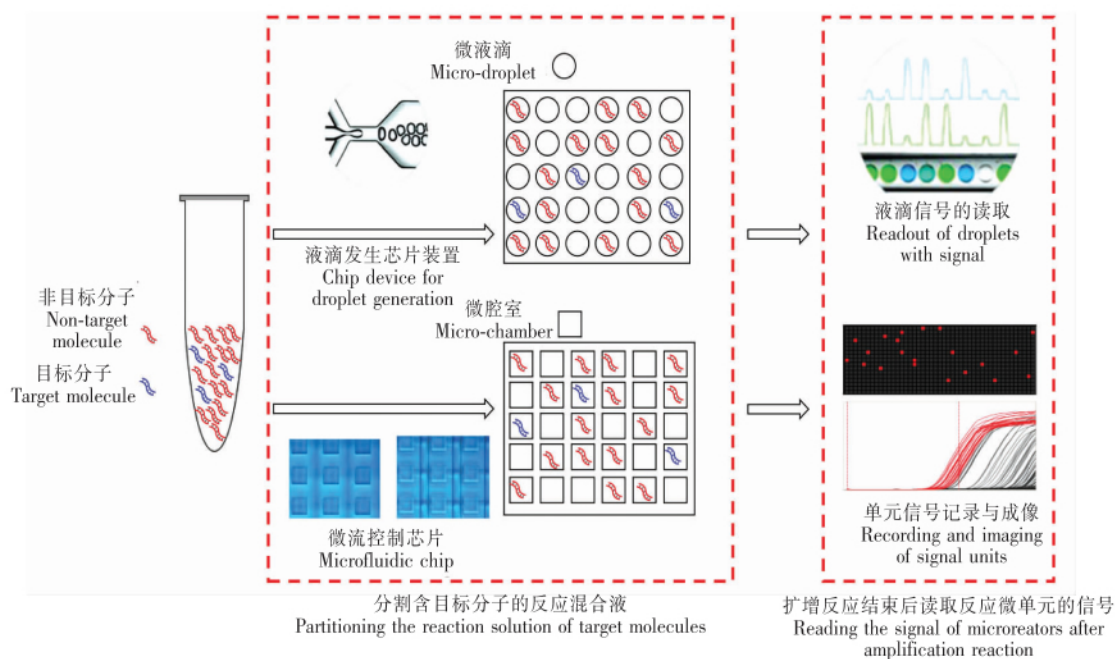


图2 μ NAD 技术的原理示意图^[27, 36, 55]

Fig. 2 Schematic diagram of principle of μ NAD^[27, 36, 55]

与实时定量 NAD(q NAD) 相比, μ NAD 技术具有明显的优势^[5]。(1) μ NAD 的准确度高 通过样本的离散化, 极微量的变异分子与正常分子被区分开来, 使得稀有突变基因被单独检测, 再通过阳性信号单元所占的数量和比例来精准地计算突变率或突变量。(2) μ NAD 的灵敏度高 尤其是对低拷贝核酸分子数的区分如几个拷贝, 这是 q PCR 难以达到的。(3) μ NAD 可实现真正意义上的绝对定量 以阳性信号和阴性信号微单元的数量及比例来确定原始样本中目标核酸分子数, 不依赖于 C_T , 也不需建立标准曲线即可进行精确定量。相比之下, q PCR 中最高只能分辨 1.5 倍的 C_T 值差异^[25], 且很难制作标准曲线对 mRNA 的表达量进行绝对定量的。(4) μ NAD 的扩增不易受抑制剂的影响, 即耐受性高 在分散目标分子的同时, 反应中的抑制剂也同样被分散。在较低目标分子情形下, 许多反应微单元中是不含目的序列的, 却包含了抑制剂, 使得目标分子相对被富集到含低浓度抑制剂的微单元中, 从而有效降低了抑制剂对扩增的影响。

4 μ NAD 的分类与特点

根据样本分散化策略的不同, μ NAD 可分为孔板式 μ NAD(Plate-based μ NAD, μ pdNAD)、液滴式 μ NAD(Droplet-based μ NAD, μ ddNAD) 和芯片式 μ NAD(Chip-based μ NAD, μ cdNAD) 三类。

4.1 孔板式 μ NAD

孔板式 μ NAD 就是足够数量的同尺寸的微孔阵列排布在平面板区域上以离散化样本核酸分子, 继而实现数字化扩增。平板材料包括玻璃、聚苯乙烯、金属等, 微孔的形成常采用刻蚀的方法。文献报道的孔板式 μ NAD 大多是孔板式 μ PCR, 而孔板式 μ INAA 平台也很容易被构建。

最早的孔板式 μ NAD 或 μ PCR 系统是采用商业化的、用于 q PCR 的 96 孔板和 384 孔板, 通过对每个反应孔所含的样品量进行极限稀释, 并增加反应孔数的方式构建的^[8]。这种形式的孔板式 μ NAD 最大

的优势在于无须开发新的装置,直接采用商业化的微孔板即可进行,但其分析的灵敏度由于微孔数有限,无法满足检测需求。而且其消耗的试剂量多,分析成本高。为解决这个问题,研究者开发了其它类型的微孔板。Morrison 等^[26]选用不锈钢来制备微孔板。如图3A所示,在25 mm × 75 mm × 0.3 mm的钢板上刻蚀了3072个直径约为320 μm的微孔,每个孔容积约为33 nL。与96孔或384孔板相比,所用试剂体积为原来的1/64,而样本通量增加了24倍。基于这一装置的OpenArray™ dPCR系统在2009年就被商业化。然而,随着微孔数量的提高、体积从微升向纳升转变,如何有效地导入试剂成为此类孔板式dNAD的难题。为解决这一问题,阵列点样仪、机械臂等附属设备的使用,大大增加了此类dNAD装置的成本。考虑到成本问题,ThermoFisher公司于2013年推出了新一代的QuantStudio™ 3D dPCR系统。该系统同样采用孔板式dPCR。在一块10 mm × 10 mm特殊材质的平板上刻蚀出高达20000个六角形微孔,每个微孔容积约0.8 nL,彼此可被充分隔离而不串联,且只需简单的涂刷操作即可完成进样。另外,采用传统的96或384孔(区域划分)设计对提高孔板式dNAD的检测通量仍有可取性。最近,Formulatrix公司推出的Constellation™ dPCR系统就采用了传统96孔区域划分,每个区域内含有一个可实现384个和496个微单元反应的微流控芯片,具备操作简单、通量高的特点。

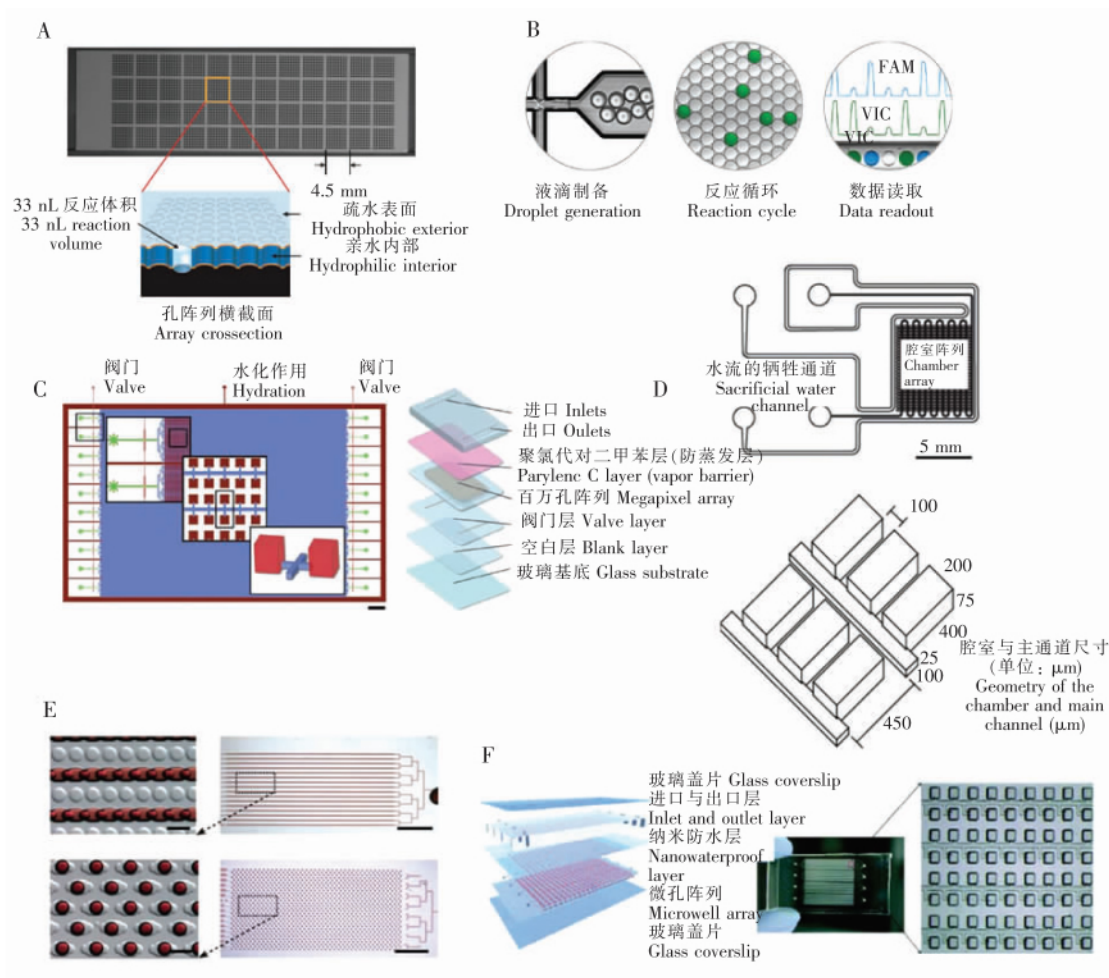


图3 6种用于dNAD的典型芯片结构

Fig.3 Typical examples of chips for dNAD

A: Open Array 系统所用孔板芯片^[26]; B: QX100 液滴式 dPCR 分析系统^[27]; C: 百万像素级别数字 PCR 芯片^[28]; D: 自我数字化芯片^[15]; E: 滑动芯片^[11]; F: 自吸分液式芯片^[13]。

A: Plate chip for OpenArray^[26]; B: QX100 droplet-based dPCR system^[27]; C: Megapixel digital PCR chip^[28]; D: Self-digitization (SD) chip^[15]; E: SlipChip^[11]; F: Selfpriming compartmentalization (SPC) chip^[13].

4.2 液滴式 dNAD

液滴式 dNAD 是通过产生数以万计的单分散性微小液滴来分割样本,即所谓的“液滴化”。目前,微流控领域产生液滴的途径主要是水动力法,包括 T 型通道法(T-junctions)、流动聚焦法(Flow focusing)和共流聚焦法(Co-flowing)三类^[29]。最常用的材料是聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)。通过对 PDMS 基底材料的微尺度通道进行等离子体处理来改变通道的亲疏水性,再引入互不溶的分散相和连续相来获得油包水或水包油液滴。Tanaka 等^[30]利用 PDMS 的透气性和溶气性的特点成功构建了一种自动产生单分散液滴的新型液滴发生装置。为了使液滴更加稳定且易收集, Leng 等^[31]引入了琼脂,利用其熔点温度来固化液滴。Schuler 等^[21]则采用离心力阶梯乳化方式来产生单分散液滴,这种方法更为简单、快速。

目前,对液滴式 dPCR 和 dNAA 平台均有文献报道。早在 2008 年, Beer 等^[32]就利用 T 型通道法生成皮升级别的油包水液滴,每个液滴中包含了单分子目标核酸、PCR 引物、聚合酶和反应缓冲液,实现了单分子水平的数字扩增。之后, Zhong 等^[33]采用皮升级液滴和单一荧光建立了多重 dPCR 平台,打破了 qPCR 中一个靶位一种荧光的壁垒。Mazutis 等^[19]则在可产生约 2 pL 液滴的微流控装置上成功构建了液滴式 dHRCA。Schuler 等^[21]开发了液滴式 dRPA 平台,可在 30 min 内对食源性细菌李斯特菌的 DNA 进行绝对定量分析。

液滴式 dNAD 最大的优势在于反应微单元数量的增加相对简单,在数据评估时,泊松精度相对较高。因此,液滴式 dNAD 是比较理想的数字检测平台,其商品化程度和市场占有率比其它形式的平台高,包括 QX100、QX200 微滴式 dPCR 系统(Bio-Rad 公司)(图 3B)和 RainDrop™ dPCR 系统(RainDance Technologies 公司)。

4.3 芯片式 dNAD

芯片式 dNAD 的建立与发展很大程度上得益于近年来微流控芯片技术的迅猛发展。微流控芯片成本低、试剂耗量少、分析通量高且具备可实现大规模平行扩增的能力,利用其来实现数字化检测已有十多年的研究历史。尤其是 Unger 等^[34]在 2000 年提出的针对 PDMS 芯片的多层软蚀刻技术(Multilayer soft lithography, MSL),使高密度的微孔、微泵和微阀结构更容易被构筑,大大加速了芯片式 dNAD 的研发。与以上两类 dNAD 不同,芯片式 dNAD 是利用微纳尺度的空间结构形成一个个微小反应单元的,其主要装置材料是 PDMS。常见的芯片式 dNAD 类型主要有集成流路(Integrated fluidic circuit, IFC)芯片型^[28, 35]、滑动芯片(SlipChip)型^[11]、自吸分液(Selfpriming compartmentalization, SPC)芯片型^[13]、自我数字化(Self-digitization, SD)芯片型^[15]等。

IFC 芯片利用 PDMS 材料的高弹性特点,通过采用 MSL 技术加工形成的大规模交织的液体和气体通道,借助高密度微泵微阀来控制流路与气路,可以快速准确地将含有目标分子的反应混合液分割成数以千计的独立微单元^[24, 36]。这项技术由 Ottesen 等^[35]在 2006 年首次实施,无需借助阵列点样仪或者机械臂即可完成 1176 个微单元阵列的构建。基于 IFC 芯片的 dPCR 系统是最早被商业化的数字检测平台,如由 Fluidigm 公司推出的 Bio-Mark HD 和 EP1 检测系统。为了提高微单元的集成数量, Heyries 等^[28]开发了一种百万像素级别 IFC 型芯片(图 3C)。该芯片可一次性形成 10^6 个微小单元,使每个单元的体积降至 pL 级,且单元密度达到 44000 个/ mm^2 ,是真正具备高密度、高通量的 IFC 芯片。Men 等^[9]则基于 IFC 芯片原理于 2012 年利用 PDMS 材料构建了 fL 级别数字 PCR 检测芯片,微单元的密度超过 2000 个/ mm^2 ,只需不足 4 μL 的试剂即可填充整个芯片,大大降低了试剂的消耗。在以 IFC 芯片构建 dNAA 平台方面, Blainey 等^[18]建立了 IFC 芯片型 dMDA 平台。虽然 IFC 芯片型 dNAD 具备实现高通量检测的能力,但其对附属设备如微泵微阀的控制装置的依赖性强,使用不便。

Shen 等^[11]在 2010 年首次报道了 SlipChip 芯片式 dNAD(图 3D)。该芯片的基底材料是玻璃,上下两块玻璃均刻有反应微单元,在油相密封环境下紧密贴合。未滑动前,反应微单元彼此部分重叠,形成微通道,供液体进样。待进样完全,滑动玻璃片打破微通道而形成微单元阵列,继而实现数字化检测,整个过程简单、快速。而基于 SlipChip 的 dPCR、dLAMP 和 dRPA 装置平台也相继被开发出来^[11, 18, 37]。

SPC 芯片实现 dNAD 则是利用了 PDMS 材料的溶气性(Gas solubility)特点^[13, 16, 20],其结构如图 3E

所示。真空脱气时,SPC芯片中整个微型结构区域内由于PDMS的溶气性变成负压,其可充当引导液体进入微腔室的动力源。当依次导入水相(扩增液)和油相(密封液),并根据微腔室数量控制好水相体积时,无需任何附属设备或微泵微阀结构即可实现扩增液体的离散化。

Gansen等^[15]制备了SD芯片并应用于dLAMP(图3F)。该芯片利用了流体压力与表面张力之间的相互作用实现液体的自我分散。芯片在导入水相前预先充盈油相,当注入水相时,液体会在微腔室内继分散,形成个乳化液滴。由于整个过程是基于液体固有性质实现的,故进样无需任何外界控制装置。但是,随着水相液体不断分散,其液滴体积逐渐变小,以至于不能充盈整个微腔。当然,这种情况可以通过耗损部分试剂使每个微腔充盈来弥补。

5 dNAD的应用

相对于传统核酸检测技术而言,dNAD可实现对核酸分子的高灵敏度、高精度、高耐受性的绝对定量分析。目前,dNAD已被应用到生命科学及相关领域中,如病原微生物的检测、食品安全、临床诊断(癌症超早期诊断和产前诊断)和基因组学研究等。

5.1 病原微生物的检测

dNAD技术已成为目前病原微生物检测手段中最灵敏的技术之一,可提供准确的疫情和产品评估数据。董莲华等^[38]针对大肠杆菌O157:H7建立了液滴式dPCR检测方法。该方法的定量动态范围广(每20 μL 反应液中 $4 \sim 1.25 \times 10^5$ 拷贝),且精密度高、特异性强,对实际样本的检测方法与qPCR一致。Kelley等^[39]采用TaqMan探针建立了针对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的多重液滴式dPCR检测方法,对397份临床样本的检测结果表明,dPCR方法与传统qPCR测试结果一致。Strain等^[40]的研究结果表明,液滴式dPCR可以作为HIV病毒DNA的精确的检测方法,且灵敏度高、重复性好。由于dNAD利用的是样本离散化策略,因此建立无核酸提取的病原检测方法也是其应用方向之一。Pavšić等^[41]分别采用QX100液滴式dPCR系统和Bio-mark HD IFC芯片式dPCR系统建立针对人巨细胞病毒的无核酸提取检测方法,其检测结果与提取后的方法完全一致。此外,dNAD的高灵敏度同样也可被应用到与病原微生物相关的研究中,如抗HIV病毒治疗评估^[42]、HIV和HCV病毒耐药突变检测^[43]以及环境微生物基因水平的连锁分析^[44]等。

5.2 食品安全监测

食品安全检测主要涉及两方面:一是食源性微生物的检测;二是转基因成分的鉴定。现有的食品安全监测中,最常用的技术手段是qPCR,需构建标准曲线来定量。而dNAD方法无需标准物质以及标准曲线,大大降低了工作强度。Fu等^[45]采用Bio-Mark HD IFC芯片式dPCR系统成功建立了针对CaMV35s启动子和NOS终止子转基因成分的鉴定,结果表明,该dPCR能鉴别含量低至0.1%的转基因成分,低于欧盟的限定标准。Dalmira等^[46]则采用液滴式dPCR系统来鉴别玉米的转基因成分,检测限低至0.08%。Cao等^[47]和Coudray-Meunier等^[48]则分别采用液滴式dPCR和芯片式dPCR系统,对水源微生物肠球菌和诺如病毒(NoV)进行检测和监控,结果精准、可靠。Floren等^[49]和Tian等^[50]则针对食物掺假问题,采用dNAD平台进行食品检测。

5.3 临床诊断

临床诊断是dNAD技术的主要应用领域,它涉及范围广,如个体化医疗应用(无创或微创癌症超早期分子诊断)、产检诊断等。众所周知,临床样本如血液、尿液、粪便等包含着很多无关核酸序列和反应抑制剂。常规的qPCR在进行分子诊断时,很容易出现偏好扩增或扩增受抑制的现象,而dNAD技术具备强的耐受性,能有效降低无关核酸序列对扩增的干扰,实现对标记物的精确检测。

开展无创或微创癌症超早期分子诊断是人性化医疗未来发展的趋势,也使得基于dNAD平台的第三方医学诊断技术日趋成熟。目前的研究热点包括针对肺癌相关的EGFR、BRAF和KARS基因的单核苷酸多态性(SNP)突变检测^[51~54]、慢性骨髓白血病ABL酪氨酸激酶结构域位点突变检测^[55]、乳腺癌的HER2基因表达水平检测^[56~57]以及原癌基因调控区甲基化水平的检测等^[58~60]。Zhu等^[13]采用SPC芯片式dPCR对3种与肺癌相关基因(PLAU, ENO2和PLAT)的mRNA表达水平进行检测,其结果与

qPCR 检测结果相当。Weisenberger 等^[58] 基于 IFC 芯片式 dPCR 系统对乳腺癌相关的 CpG 基因岛甲基化水平进行了系统的研究,其结果表明 dNAD 平台可实现单分子水平的甲基化诊断。

与传统的产前诊断方法相比,dNAD 无需活检穿刺,只需对游离胎儿 DNA (Cell-free fetal DNA, cfDNA) 进行相关分子检测即可预知孕情或胎儿状况。Gu 等^[61] 采用 QX100 液滴式 dPCR 系统对 cfDNA 进行分析,以评估遗传性甲基丙二酸血症的风险。Barrett 等^[62] 则采用 Bio-mark HD IFC 芯片式 dPCR 装置来评估胎儿镰状细胞性贫血症分型。

5.4 基因组学研究

在基因组学研究中,dNAD 技术的作用就是对通过 NGS、微阵列杂交或全基因组关联分析研究等手段获取的海量基因组信息的“情报”确认,充当着“放大镜”的角色。此外,dNAD 技术还可用于 NGS 的文库构建和结果校正^[63,64]。

拷贝数变异(CNV)是基因组学研究的主要内容,而 dNAD 技术在 CNV 检测上有着独特的优势。dNAD 可直接获取目标基因的绝对拷贝数,提供准确的数据,这是其它技术(如 NGS)所难达到的,且成本低、通量高。对于低丰度的 CNV,dNAD 的检测限(低至 0.001%)大大低于 qPCR(一般为 10%)和 NGS(一般为 1%)。Boettger 等^[65] 应用液滴式 dPCR 系统来分析和评估人类基因组 1 区 17q21.31 基因座内的复杂 CNV 和 SNP 现象,以研究父母系与后代之间基因组的关联性。Fu 等^[66] 构建了液滴式数字全基因组扩增技术(dWGA),实现单细胞水平的基因组测序,该方法在分析 CNV 和 SNP 时扩增均一性和结果精准度明显提高。

6 总结与展望

dNAD 技术是一种高灵敏度、高准确度、高辨识度、高耐受性、可实现绝对定量分析的核酸分子诊断技术,是现有核酸诊断技术的补充与飞跃,其所具备的应用优势必将大大推动生物学研究、临床诊断、食品安全和环境监测等领域的发展。同时,它也预示着一个拥有巨大潜能的新兴产业和技术。然而,目前的 dNAD 技术仍处于待完善阶段,还存在许多不足之处。首先,现有 dNAD 装置的集成度不高,如 Bio-rad 的 QX100 液滴式 dPCR 系统由液滴发生器、PCR 扩增仪和液滴信号读取器 3 种设备配套组成,仪器成本高,一般的实验室难以承受。已有研究团队^[50,67] 尝试将细胞核酸提取、纯化功能与 dNAD 结合集成到微流控芯片上,构建多功能数字化检测平台,但是目前尚无成型商品。其次,当 dNAD 的通量增高或者微单元体积缩小时,现有信号采集的方法难以做到简便、快捷、准确,常需要后期繁琐的信号处理与分析过程。此外,dNAD 仍受到常规核酸扩增法所面临的扩增效率问题的影响,即表现为如何保证微单元的反应效率或优化微反应体系。最后,现有 dNAD 技术难以真正实现现场检测或 POCT。随着 dNAD 的不断发展,这些问题必定会得到有效解决。总之,基于微纳尺度流体控制的 dNAD 技术为实现高灵敏、高精度的核酸单分子水平分析提供了全新的思路 and 手段,未来有望成为新的“金标准”技术。

References

- 1 Chen Y, Perkins M, Teixeira L, Cave M, Eisenach K. *J. Clin. Microbiol.*, **1998**, 36(7): 1964–1968
- 2 Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans P, Morgan G, Lucas G S, Yin J L. *Blood*, **2000**, 95(3): 815–819
- 3 Gack M U, Kirchhofer A, Shin Y C, Inn K S, Liang C, Cui S, Myong S, Ha T, Hopfner K P, Jung J U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2008**, 105(43): 16743–16748
- 4 JIN Yu-Liang. *Mod. Agric. Sci. Technol.*, **2012**, 10: 47–48
金宇良. 现代农业科技, **2012**, 10: 47–48
- 5 ZHAN Cheng, YAN Li, WANG Lin, JIN Yu-Lin, CHEN Li, SHI Yu, WANG Qun. *Fudan. Univ. J. Med. Sci.*, **2015**, 42(6): 786–789
詹成, 燕丽, 王琳, 金玉麟, 陈力, 时雨, 王群. 复旦学报: 医学版, **2015**, 42(6): 786–789

- 6 ZHU Qiang-Wen, YANG Wen-Xiu, GAO Yi-Bo, YU Bing-Wen, QIU Lin, ZHOU Chao, JIN Wei, JIN Qin-Han, MU Ying. *Chem. J. Chinese Universities*, **2013**, 34(3): 538–544
朱强远, 杨文秀, 高一博, 于丙文, 邱琳, 周超, 金伟, 金钦汉, 牟颖. 高等学校化学学报, **2013**, 34(3): 538–544
- 7 Perkel J M. *Science*, **2014**, 344(6180): 212–214
- 8 Vogelstein B, Kinzler K W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1999**, 96(16): 9236–9241
- 9 Men Y, Fu Y, Chen Z, Sims P A, Greenleaf W J, Huang Y. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(10): 4262–4266
- 10 Sundberg S O, Wittwer C T, Gao C, Gale B K. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(4): 1546–1550
- 11 Shen F, Du W, Kreutz J E, Fok A, Ismagilov R F. *Lab Chip*, **2010**, 10(20): 2666–2672
- 12 Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, Herrmann J, Hindson B J, Bhat S, Emslie K R. *Anal. Chem.*, **2011**, 84(2): 1003–1011
- 13 Zhu Q, Qiu L, Yu B, Xu Y, Gao Y, Pan T, Tian Q, Song Q, Jin W, Jin Q, Mu Y. *Lab Chip*, **2014**, 14(6): 1176–1185
- 14 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28(12): e63
- 15 Gansen A, Herrick A M, Dimov I K, Lee L P, Chiu D T. *Lab Chip*, **2012**, 12(12): 2247–2254
- 16 Zhu Q, Gao Y, Yu B, Ren H, Qiu L, Han S, Jin W, Jin Q, Mu Y. *Lab Chip*, **2012**, 12(22): 4755–4763
- 17 Rane T D, Chen L, Zec H C, Wang T H. *Lab Chip*, **2015**, 15(3): 776–782
- 18 Blainey P C, Quake S R. *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39(4): e19
- 19 Mazutis L, Araghi A F, Miller O J, Baret J C, Frenz L, Janoshazi A, Taly V, Miller B J, Hutchison J B, Link D, Griffiths A D, Ryckelynck M. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(12): 4813–4821
- 20 Ding X, Wu W, Zhu Q, Zhang T, Jin W, Mu Y. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(20): 10306–10314
- 21 Schuler F, Schwemmer F, Trotter M, Wadle S, Zengerle R, von Stetten F, Paust N. *Lab Chip*, **2015**, 15(3): 2759–2766
- 22 Konry T, Smolina I, Yarmush J M, Irimia D, Yarmush M L. *Small*, **2011**, 7(3): 395–400
- 23 Pohl G, Shih I M. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **2004**, 4(1): 41–47
- 24 LIN Cai-Qin, YAO Bo. *Prog. Chem.*, **2012**, 24(12): 2415–2423
林彩琴, 姚波. 化学进展, **2012**, 24(12): 2415–2423
- 25 Devonshire A S, Elasarapu R, Foy C A. *BMC Genomics*, **2011**, 12(1): 118
- 26 Morrison T, Hurley J, Garcia J, Yoder K, Katz A, Roberts D, Cho J, Kanigan T, Ilyin S E, Horowitz D, Dixon J M, Brenan C J. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34(18): e123
- 27 Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, Belgrader P, Heredia N J, Makarewicz A J, Bright I J, Lucero M Y, Hiddessen A L, Legler T C, Kitano T K, Hodel M R, Petersen J F, Wyatt P W, Steenblock E R, Shah P H, Bousse L J, Troup C B, Mellen J C, Wittmann D K, Erndt N G, Cauley T H, Koehler R T, So A P, Dube S, Rose K A, Montesclaros L, Wang S L, Stumbo D P, Hodges S P, Romine S, Milanovich F P, White H E, Regan J F, Karlin-Neumann G A, Hindson C M, Saxonov S, Colston B W. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(22): 8604–8610
- 28 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
- 29 CHEN Jiu-Sheng, JIANG Jia-Huan. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(8): 1293–1300
陈九生, 蒋稼欢. 分析化学, **2012**, 40(8): 1293–1300
- 30 Tanaka H, Yamamoto S, Nakamura A, Nakashoji Y, Okura N, Nakamoto N, Tsukagoshi K, Hashimoto M. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(8): 4134–4143
- 31 Leng X, Zhang W, Wang C, Cui L, Yang C J. *Lab Chip*, **2010**, 10(21): 2841–2843
- 32 Beer N R, Wheeler E K, Lee-Houghton L, Watkins N, Nasarabadi S, Hebert N, Leung P, Arnold D W, Bailey C G, Colston B W. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(6): 1854–1858
- 33 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
- 34 Unger M A, Chou H P, Thorsen T, Scherer A, Quake S R. *Science*, **2000**, 288(5463): 113–116

- 35 Ottesen E A , Hong J W , Quake S R , Leadbetter J R. *Science* , **2006** , 314(5804) : 1464 – 1467
- 36 Bhat S , Herrmann J , Armishaw P , Corbisier P , Emslie K R. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2009** , 394(2) : 457 – 467
- 37 Sun B , Shen F , McCalla S E , Kreutz J E , Karymov M A , Ismagilov R F. *Anal. Chem.* , **2013** , 85(3) : 1540 – 1546
- 38 DONG Lian-Hua , ZHANG Ling , JING Jun , WANG Jiang-Nan , WANG Jing , CHEN Wei-Jun. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2015** , 43(3) : 319 – 324
董莲华 , 张玲 , 姜君 , 王江南 , 王晶 , 陈唯军. *分析化学* , **2015** , 43(3) : 319 – 324
- 39 Kelley K , Cosman A , Belgrader P , Chapman B , Sullivan D C. *J. Clin. Microbiol.* , **2013** , 51(7) : 2033 – 2039
- 40 Strain M C , Lada S M , Luong T , Rought S E , Gianella S , Terry V H , Spina C A , Woelk C H , Richman D D. *PLoS one* , **2013** , 8(4) : e55943
- 41 Pavšič J , Žel J , Milavec M. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2016** , 408(1) : 107 – 121
- 42 Kiselina M , Pasternak A O , De Spiegelaere W , Vogelaers D , Berkhout B , Vandekerckhove L. *PLoS One* , **2014** , 9(1) : e85999
- 43 Shen F , Sun B , Kreutz J E , Davydova E K , Du W , Reddy P L , Joseph L J , Ismagilov R F. *J. Am. Chem. Soc.* , **2011** , 133(44) : 17705 – 17712
- 44 Tadmor A D , Ottesen E A , Leadbetter J R , Phillips R. *Science* , **2011** , 333(6038) : 58 – 62
- 45 Fu W , Zhu P , Wang C , Huang K , Du Z , Tian W , Wang Q , Wang H , Xu W , Zhu S. *Sci. Rep.* , **2015** , 5: 12715
- 46 Dalmira F U , Melina PU , José-Benigno V T , Josefina L F , Raymundo G E , Abraham A S. *Anal. Chem.* , **2016** , 88(1) : 812 – 819
- 47 Cao Y , Raith M R , Griffith J F. *Water Res.* , **2015** , 70: 337 – 349
- 48 Coudray-Meunier C , Fraisse A , Martin-Latil S , Guillier L , Delannoy S , Fach P , Perelle S. *Int. J. Food Microbiol.* , **2015** , 201: 17 – 26
- 49 Floren C , Wiedemann I , Brenig B , Schütz E , Beck J. *Food Chem.* , **2015** , 173: 1054 – 1058
- 50 Tian Q , Mu Y , Xu Y , Song Q , Yu B , Ma C , Jin W , Jin Q. *Anal. Biochem.* , **2015** , 491: 55 – 57
- 51 Malapelle U , de Luca C , Vigliar E , Ambrosio F , Rocco D , Pisapia P , Bellevicine C , Troncone G. *J. Clin. Pathol.* , **2016** , pii: jclinpath-2015-203429
- 52 Singer G , Oldt R , Cohen Y , Wang B G , Sidransky D , Kurman R J , Shih I M. *J. Natl. Cancer Inst.* , **2003** , 95(6) : 484 – 486
- 53 Sanmamed M F , Fernández-Landázuri S , Rodríguez C , Zúrate R , Lozano M D , Zubiri L , Perez-Gracia J L , Martín-Algarra S , González A. *Clin. Chem.* , **2015** , 61(1) : 297 – 304
- 54 Taly V , Pekin D , Benhaim L , Kotsopoulos S K , Le Corre D , Li X , Atochin I , Link D R , Griffiths A D , Pallier K , Blons H , Bouché O , Landi B , Hutchison J B , Laurent-Puig P. *Clin. Chem.* , **2013** , 59(12) : 1722 – 1731
- 55 Oehler V G , Qin J , Ramakrishnan R , Facer G , Ananthnarayan S , Cummings C , Deininger M , Shah N , McCormick F , Willis S , Daridon A , Unger M , Radich J P. *Leukemia* , **2009** , 23(2) : 396 – 399
- 56 Gevensleben H , Garcia-Murillas I , Graeser M K , Schiavon G , Osin P , Parton M , Smith I E , Ashworth A , Turner N C. *Clin. Cancer Res.* , **2013** , 19(12) : 3276 – 3284
- 57 Belgrader P , Tanner S C , Regan J F , Koehler R , Hindson B J , Brown A S. *Clin. Chem.* , **2013** , 59(6) : 991 – 994
- 58 Weisenberger D J , Liang G. *Transl. Cancer Res.* , **2015** , 4(3) : 219 – 234
- 59 Weisenberger D J , Trinh B N , Campan M , Sharma S , Long T I , Ananthnarayan S , Liang G , Esteva FJ , Hortobagyi G N , McCormick F , Jones P A , Laird P W. *Nucleic Acids Res.* , **2008** , 36(14) : 4689 – 4698
- 60 Li M , Chen W D , Papadopoulos N , Goodman S N , Bjerregaard N C , Laurberg S , Levin B , Juhl H , Arber N , Moinova H , Durkee K , Schmidt K , He Y P , Diehl F , Velculescu V E , Zhou S , Diaz L A , Kinzler K W , Markowitz S D , Vogelstein B. *Nat. Biotechnol.* , **2009** , 27(9) : 858 – 863
- 61 Gu W , Koh W , Blumenfeld Y J , El-Sayed Y Y , Hudgins L , Hintz S R , Quake S R. *Genet. Med.* , **2014** , 16(7) : 564 – 567
- 62 Barrett A N , McDonnell T C , Chan K C , Chitty L S. *Clin. Chem.* , **2012** , 58(6) : 1026 – 1032
- 63 White R A 3rd , Blainey P C , Fan H C , Quake S R. *BMC Genomics* , **2009** , 10: 116
- 64 Shiroguchi K , Jia T Z , Sims P A , Xie X S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , **2012** , 109(4) : 1347 – 1352
- 65 Boettger L M , Handsaker R E , Zody M C , McCarroll S A. *Nat. Genet.* , **2012** , 44(8) : 881 – 885

会务联系人: 徐静娟教授, 南京大学生命分析化学国家重点实验室, xujj@nju.edu.cn。