

数字 PCR 在产前诊断中的应用研究

耿娟 综述 尹爱华* 审校

(广州医科大学附属广东省妇儿医院, 广东 广州 511442)

【摘要】 数字 PCR 是 20 世纪初发展起来的新型核酸定量技术, 可对微量模板进行绝对定量分析, 与传统定量 PCR 相比具有更高的准确性和敏感性。目前数字 PCR 已广泛应用于临床各个领域。而在产前诊断中, 因数字 PCR 可从高背景母体 DNA 中识别少量胎儿 DNA 分子, 故其在介入性产前诊断及无创产前基因诊断胎儿非整倍体疾病、单基因病等方面具有重要作用。本文就数字 PCR 发展、原理及其在产前诊断的应用进行综述。

【关键词】 数字 PCR; 产前诊断; 绝对定量

【中图分类号】 R394.3 **【文献标识码】** A

1 前言

数字 PCR(digital PCR, dPCR) 是 20 世纪初发展起来的新型核酸分子定量技术, 通过将微量 DNA 分子有限稀释并分液, 使每个反应室平均含有一个或零个目标分子, 所有反应室进行单分子扩增后通过分析荧光信号进行定量。由于其不依赖于扩增曲线的循环阈值(CT), 也不必采用内参基因和标准曲线, 与常规定量 PCR 技术相比, 具有更高的准确性、灵敏性及重复性^[1-3], 在肿瘤标记物早期检测^[4-6]、病毒载量检测^[7-9]等领域广泛应用。产前胎儿遗传学检测是预防出生缺陷的重要组成部分, 传统的介入性产前诊断如绒毛穿刺、羊膜腔穿刺及脐静脉穿刺存在 1%~3% 的流产风险^[10], 且产前胎儿组织取材时不可避免混入母体组织, 影响了胎儿遗传物质诊断的准确性; 无创产前诊断虽可避免流产风险, 但孕早期胎儿游离 DNA(cell free fetal DNA, cffDNA) 含量低, 大量母体 DNA 的存在对核酸提取技术及检验技术提出较高要求, 而数字 PCR 具有在大量背景分子中辨识少量目标分子的特点, 可望成为胎儿产前基因诊断的重要研究工具。本文将对数字 PCR 原理、发展及其在产前诊断的应用进行综述。

2 数字 PCR 概述

2.1 数字 PCR 发展 1992 年 Sykes 等^[11] 检测 IgH 重链突变基因时, 采用了有限稀释和以终点信号的有无进行定量的策略, 形成了数字 PCR 的雏形。1999 年 Kenneth Kinzler 和 Bert Vogelstein^[12] 在检测大肠癌患者 K-RAS 突变时, 对样品采用有限稀释并增加了反应室的数目, 这种方法有效排除了体细胞干扰, 成功检出微量 K-RAS 突变, 进一步提出了数字 PCR 的概念。但是该方法需要人工稀释 DNA 样本, 操作步骤繁杂且实验误差较大。2003 年 Liu 等^[13] 在此基础上提出微流体概念, 通过微泵微阀对 DNA 模板进行自动分液, 提高了样本稀释精确度, 降低了操作误差, 但由于芯片需要定制, 成本高昂。直到 2011 年, QuantaLife 公司基于油包水微滴生成技术研发出微滴式数字 PCR, 其具有高通量、自动化、低成本等优点, 促进了数字化 PCR 走向临床应用。

2.2 数字 PCR 原理 数字 PCR 由有限稀释、PCR 扩增和荧光信号分析 3 部分组成。有限稀释是通过人工稀释、微反应阀或微滴发生器等分液技术, 将 DNA 分子混合物分散到大量的反应室中, 每个反应室平均含有一个或零个目标分子, 随后每个反应室分别对目标分子进行 PCR 扩增, 在扩增完成

后对每个反应室的荧光信号进行分析,有荧光信号判读为1,没有荧光信号的则判读为0。由于数字PCR是一种终端分析法,若目标分子没有很好地离散化,如一些反应室包含多个目标核酸分子,那么理论上得到的结果将不准确,因此引入泊松概率分布函数(poisson distribution)用以分析数据,根据反应室总数、含有荧光信号的单元数及样本的稀释系数,可得到样本的初始浓度^[14]。

2.3 数字PCR的分类 数字PCR自20世纪提出后发展十分迅速,按照分液技术的不同,主要分为微孔板、微流体芯片、微滴式3类。

2.3.1 微孔板数字PCR 检测基因突变对疾病诊断具有重要意义,然而常规的方法只能检测高于20%的突变,为了提高检测的灵敏性,Vogelstein等发明了数字PCR方法。早期的数字PCR技术通过手工稀释将基因组DNA等分至96/384孔板中,其灵敏度取决于反应单元总数,反应单元越多灵敏度和准确度越高。随着检测要求不断提高,96/384孔板渐渐无法满足检测需要,必须提高反应单元总数,然而传统的人工加样步骤繁杂,耗时长,已无法满足快速精确取样及高通量的要求,只有高通量自动化加样设备才能解决问题。

2.3.2 微流体芯片数字PCR 微流体技术、微电子技术及纳米制造技术的发展促进了微流体芯片的产生,微流体芯片进样和加样由计算机控制,流路和阀门系统自动操作,通过微流体装置快速准确地把流体分散成若干个独立反应室,一次PCR反应可进行多步平行反应,与微孔板相比大大减少了移液操作,有效地防止了污染发生,从根本上提高了检测的灵敏度和准确度,但微流体芯片价格昂贵限制了其大规模应用。

2.3.3 微滴式数字PCR 微滴式数字PCR来源于乳液PCR技术,微滴发生器可一次性生成数万至数百万个纳升甚至皮升级的油包水微滴作为PCR的样品分散载体,PCR反应结束后检测每个油包水微滴的荧光信号。2011年Bio-Rad公司基于此方法研发出的微滴式数字PCR,可将样品分成20000个纳升级微滴。2013年Rain Dance公司研发的

Rain Drop数字PCR系统可产生100~1000万个皮升级液滴,该系统除具有超高灵敏度外,还可进行多重PCR分析。以微滴为单位的PCR反应体系更容易实现小容积和高通量,其操作简单,成本低廉,是理想的数字PCR技术平台。

3 数字PCR的临床应用研究

数字PCR本质上是通过单分子扩增把低丰度的基因信号从复杂背景中分辨出来,因此可用于疾病或病毒的早期诊断或疗效监测^[15]。在肿瘤学方面^[16, 17],通过检测患者血浆中特异的肿瘤相关基因以便早期发现、早期治疗或用于肿瘤术后监测复发,使患者预后监测更为可靠,或者检测肿瘤特异性靶向治疗基因,寻求最佳治疗方案。Li等^[18]通过数字PCR检测到早期肺癌患者痰液中MicroRNA表达。在病原微生物的早期检测中,Ruth HS等^[19]通过研究发现数字PCR较定量PCR更早发现患者外周血中的巨细胞病毒RNA,为接受细胞移植或器官移植患者早期抗感染治疗提供依据,降低移植失败及死亡率。Deborah Persaud等^[20]利用微滴式数字PCR技术确认全球首例HIV感染患儿功能性治愈。而产前诊断中胎儿组织取材通过介入性产前诊断,或无创产前基因筛查中,母血浆DNA都有不同程度的母体污染,可在复杂背景中辨别微量DNA分子的数字化PCR也具有广泛的应用前景。

4 数字PCR在产前诊断的应用研究

4.1 数字PCR在有创性产前诊断的应用研究 研究发现,通过介入性操作获得的羊水样本,未培养时母系污染高达20%^[21],部分还存在胎儿嵌合体核型,如羊膜腔穿刺标本存在0.25%的嵌合^[22],绒毛约有1%的嵌合发生^[23],这些DNA污染和嵌合体会影响胎儿非整倍体诊断的准确性。数字PCR技术在单分子扩增后对样品DNA精确定量,具有比其他PCR更高的测量精度。2007年,Christina F等^[24]使用数字PCR对正常细胞DNA、21-三体胎儿细胞DNA以及二者混合的细胞DNA进行了研究,发现数字PCR不仅可准确区分正常细胞和异常细

胞,而且在存在母系污染、嵌合体的情况下数字 PCR 仍可保持较高的灵敏性。2009年,Christina F 等^[25]在绒毛取样和羊水取样后的6小时内准确检测出3例21-三体,3例18-三体和2例13-三体,但由于数字 PCR 对 X 染色体不敏感,漏诊1例 X 染色体嵌合体及1例 X-三体。

4.2 数字 PCR 在无创产前诊断的应用研究

4.2.1 数字 PCR 在染色体非整倍体中的应用研究

无创产前基因诊断胎儿非整倍体疾病时,由于胎儿游离 DNA 含量低,检测结果准确性受到大量母体背景 DNA 影响,而数字 PCR 直接计数目标分子数,因此具有更佳的稳定性和定量准确性。Fan 等^[26]应用微流控芯片检测21-三体胎儿,通过对比21号染色体上淀粉样蛋白基因序列与12号染色体上磷酸甘油醛脱氢酶基因序列拷贝数的差异,准确辨别出21-三体胎儿,甚至在胎儿 DNA 仅占血浆游离 DNA 总浓度10%时也可检出,检测敏感性远远高于实时 PCR 和荧光定量 PCR。Tong 等^[27]利用母胎甲基化表达差异与数字 PCR 结合的方法,采用表观遗传物-染色体剂量法检测男性胎儿21-三体,以 Y 染色体上 ZFY 基因表达量为内参,准确检测了5例孕21-三体的孕妇血浆。Lo 等^[28]以稳定表达的1号染色体做参照,采用染色体相对定量方法检测非整倍体。但实验中要求胎儿 DNA 浓度占血浆游离 DNA 总浓度的25%以上,由于孕妇外周血中胎儿游离 DNA 浓度平均占6%~10%^[29],目前尚无有效富集胎儿 DNA 方法,不适用于临床推广。Tsui 等^[30]使用数字 PCR 对单核苷酸多态性等位基因及胎儿游离 DNA 中 PLAC4 表达水平定量检测,检出4例21-三体胎儿,灵敏度达到100%,特异性为89%,而该方法只能用于检测杂合子 SNP 位点。

4.2.2 数字 PCR 在单基因遗传病中的应用 胎儿游离 DNA 发现至今,利用胎儿游离 DNA 检测单基因遗传病已成为研究热点,然而大量的母体 DNA 背景以及微量的胎儿 DNA 浓度阻碍了研究进展,Chu^[31]提出使用数字 PCR 进行单分子等位基因检测,利用等位基因比值法推断胎儿是否含有致病基因,首次将数字化 PCR 应用于无创单基因病诊断。

4.2.2.1 常染色体隐性遗传病 2008年 Lo^[32]采用相对突变剂量法和数字化核酸片段分选法相结合的策略,首次应用数字 PCR 检测 β -地中海贫血,在双亲携带相同突变的情况下,通过定量母源性突变 DNA 和胎儿突变 DNA,对胎儿是否遗传致病基因型进行确诊。2012年 Lam 等^[33]对相对突变剂量法进行了改良,依据父源性的遗传单倍型,设计了针对珠蛋白及其外部 SNP 位点的探针来筛选可提供信息位点,又根据母源性单倍型将 SNP 分为 α 和 β 两组,借助数字 PCR 技术推断胎儿基因型,成功分析了2个 β 地中海贫血家系。同年,Barrett 等^[34]通过数字 PCR 检测胎儿 Y 染色体特异标志物 DYS14,检出82%男性胎儿及75%女性胎儿患有镰刀红细胞贫血,说明其精确的定量及高分辨率可解决母体外周血中孕妇外周血胎儿游离 DNA 含量较低以及高背景母体 DNA 的问题。

Pornprasert 等^[35]设计了两对引物分别扩增野生型 α 珠蛋白基因和 SEA 基因,通过微滴式数字 PCR 定量分析,检出了15例 SEA 型地贫携带者和8例重度 α 地贫胎儿,证明了微滴式数字 PCR 在地贫基因诊断中的有效性。Winston Koh 等^[36]在诊断甲基丙二酸血症时采用突变位点等位基因定量结合游离 DNA 中胎儿片段检测法,在阴性对照中识别出11个阳性标记,由此推断胎儿是否遗传有由父母携带的突变基因。该方法不受性别限制,无需大量样本分析,可用于分析已知突变。

4.2.2.2 X 连锁遗传病 Tsui 等^[37]通过使用数字 PCR 检测 X 染色体上的基因位点,经过相对诱变剂量法分析,在12个样本中准确地识别出7个含有血友病突变基因的男性胎儿。在此实验中,胎儿的基因型最早可在孕11周测定,充分展示了该方法在早期诊断中的潜力。

4.2.2.3 胎儿 Rh 血型鉴定 Tsui 等^[38]采用 SNP 结合数字 PCR 的策略,在两位孕妇都是 RhD 基因突变(IVS3+1 G>A)携带者的情况下检测胎儿 RhD 基因。尽管胎儿 DNA 浓度只有4.15%、8.2%,但数字 PCR 仍在高浓度母体 DNA 干扰下成功检测到胎儿 RhD 基因阳性。

5 展 望

数字 PCR 技术是通过单分子扩增降低了背景 DNA 的影响,极大提高了阳性反应中的信噪比,具有超高灵敏度,可用于低浓度 DNA 的检测^[39]。但作为一项新兴技术,数字 PCR 仍存在一些问题,如基于精密仪器和复杂芯片的微流体数字 PCR 成本高昂,通量低;微滴式数字 PCR 检测极低拷贝数样本时其检测结果不稳定,需要多次平行实验,而且数字 PCR 检测胎儿染色体异常及单基因病尚未建立成熟方法学,需要更多的病例进行验证。我们期望未来几年该技术不断发展、完善,在产前诊断及医学领域发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids [J]. *Clinical Biochemistry*, 2015.
- [2] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 1003-1005.
- [3] Maja. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA [J]. *PLoS One*, 2014; 9(1): e85999.
- [4] Page K, Hava N, Ward B, et al. Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(8): 1342-1348.
- [5] Nadauld L. Quantitative and sensitive detection of cancer genome amplifications from formalin fixed paraffin embedded tumors with droplet digital PCR [J]. *Transl Med (Sunnyvale)*. 2012, 2(2): 1000107.
- [6] Garcia-Murillas I, Lambros M, Turner NC. Determination of HER2 amplification status on tumour DNA by digital PCR [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e83409.
- [7] Leibovitch EC, Brunetto GS, Caruso B, et al. Coinfection of human herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as demonstrated by novel digital droplet PCR assay [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e92328.
- [8] Sedlak RH, Jerome KR. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013, 75(1): 1-4.
- [9] Leibovitch EC, Brunetto GS, Caruso B, et al. Coinfection of human herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as demonstrated by novel digital droplet PCR assay [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e92328.
- [10] Evans MI, Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic procedures 2005 [J]. *Semin Perinatol*, 2005, 29(4): 215-218.
- [11] Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution [J]. *Biotechniques*, 1992, 13(3): 444-449.
- [12] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(16): 9236-9241.
- [13] Liu J, Hansen C, Quake SR. Solving the "world-to-chip" interface problem with a microfluidic matrix [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(18): 4718-4723.
- [14] Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(17): 6474-6484.
- [15] Castellanos-Rizaldos E, Paweletz C, Song C, et al. Enhanced ratio of signals enables digital mutation scanning for rare allele detection [J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3): 284-292.
- [16] Azuara D, Ginesta MM, Gausachs M, et al. Nanofluidic digital PCR for KRAS mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer [J]. *Clin Chem*. 2012, 58(9): 1332-1341.
- [17] Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer [J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 214-220.
- [18] Li N, Ma J, Guarnera MA, et al. Digital PCR quantification of miRNAs in sputum for diagnosis of lung cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(1): 145-150.
- [19] Sedlak RH, Cook L, Cheng A, et al. Clinical utility of droplet digital PCR for human cytomegalovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(8): 2844-2848.
- [20] Persaud D, Gay H, Ziemniak C, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(19): 1828-1835.
- [21] Teoh TG, Ryan G, Johnson J, et al. The role of fetal karyotyping from unconventional sources [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1996, 175(4 Pt 1): 873-877.
- [22] Hsu LY, Perlis TE. United States survey on chromosome mosaicism and pseudomosaicism in prenatal diagnosis [J]. *Prenat Diagn*, 1984, 4: 97-130.
- [23] Kalousek DK, Howard-Peebles PN, Olson SB, et al. Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism [J]. *Prenat Diagn*, 1991, 11(10): 743-750.
- [24] Fan HC, Quake SR. Detection of aneuploidy with digital pol-

- ymerase chain reaction[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(19):7576-7579.
- [25] Fan HC, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY, et al. Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2009, 200(5):541-543.
- [26] Fan HC, Quake SR. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(19):7576-7579.
- [27] Tong YK, Jin S, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach[J]. *Clin Chem*, 2009, 56(1):90-98.
- [28] Lo YM, Lun FM, Chan KC, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(32):13116-13121.
- [29] Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum implications for non-invasive prenatal diagnosis[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(4):768-775.
- [30] Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, et al. Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21[J]. *ClinChem*, 2009, 56(1):73-81.
- [31] Chu T, Bunce K, Hogge WA, et al. Statistical considerations for digital approaches to non-invasive fetal genotyping[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(22):2863-2866.
- [32] Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50):19920-19925.
- [33] Lam KW, Jiang P, Liao GJ, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to α -thalassemia[J]. *ClinChem*, 2012, 58(10):1467-1475.
- [34] Barrett AN, McDonnell TC, Chan KC, et al. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia[J]. *Clin Chem*, 2012, 58(6):1026-1032.
- [35] Pornprasert S, Prasing W. Detection of alpha(0)-thalassemia South-East Asian-type deletion by droplet digital PCR[J]. *Eur J Haematol*, 2014, 92(3):244-248.
- [36] Gu W, Koh W, Blumenfeld YJ, et al. Noninvasive prenatal diagnosis in a fetus at risk for methylmalonic acidemia[J]. *GenetMed*, 2014, 16(7):564-567.
- [37] Tsui NB, Kadir RA, Chan KC. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA[J]. *Blood*, 2011, 117(13):3684-3691.
- [38] Tsui NB, Hyland CA, Gardener GJ, et al. Noninvasive fetal RHD genotyping by microfluidics digital PCR using maternal plasma from two alloimmunized women with the variant RHD (IVS3 + 1G > A) allele[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(12):1214-1216.
- [39] Lun FM, Chiu RW, Chan KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma[J]. *ClinChem*, 2008, 54(10):1664-1672.

(收稿日期:2015-09-02)

编辑:宋文颖