

文章编号: 1001-764X(2012)10-857-04

乳化液 PCR 的研究进展及应用*

马达¹, 王惠民², 邵可可¹ (1. 盐城市第一人民医院检验科, 江苏盐城 224001; 2. 南通大学附属医院检验医学中心, 江苏南通 226001)



作者简介: 马达, 1958 年生, 男, 大学本科, 主任技师, 硕士研究生导师, 现任盐城市第一人民医院检验科主任、盐城市临床检验中心主任, 江苏省有突出贡献的中青年专家, 盐城市医学领军人才, 江苏省医学会检验分会委员、江苏省医院协会临床检验管理专业委员会委员、盐城市医学会检验分会主任委员、《临床检验杂志》编委。获江苏省科技进步三等奖 2 项, 江苏省卫生厅新技术引进奖 2 项, 盐城市科技进步一等奖 2 项、二等奖 3 项。发表论文 20 余篇, 其中 SCI 收录 1 篇。

摘要: 乳化液 PCR 是单分子 PCR 技术, 非常适合于微拷贝量的 DNA 分析。乳化液 PCR 是把 PCR 反应液分隔在亿万个油包水的小室中, 每个小室一般只含一个模板, 可独立进行单分子 PCR 扩增。本文主要介绍乳化液 PCR 的建立、发展和应用进展。

关键词: 乳化液; 聚合酶链反应; 进展

中图分类号: Q503

文献标志码: A

PCR 技术自 1985 年问世以来, 已被广泛用于基础研究和临床诊断。但传统 PCR 需要对产物进行电泳分离和染色处理, 容易交叉污染和出现假阳性, 且不能准确定量。1996 年美国 Applied Biosystems 公司推出实时荧光定量 PCR 技术使上述问题得到较好解决, 实现了 PCR 从定性到定量的飞跃。其操作简单, 实时监测, 特异性强, 灵敏度高, 重复性好, 定量准确, 不需要对产物进行后期处理, 能有效防止污染, 而且荧光定量还可以通过熔解曲线、探针等方式防止非特异性扩增和假阳性, 极大地提高了检测效率。最近一种单分子 PCR 技术——乳化液 PCR (emulsion PCR) 成为研究的热点, 以乳化液 PCR 为基础的新一代 PCR 系统, 与传统 PCR、定量 PCR 相比, 其结果的精确度、准确性和灵敏度更佳, 且它的定量结果不再依赖于 Ct 值, 直接给出靶序列的起始浓度, 实现真正意义上的绝对定量, 非常适合于微拷贝数和基因突变率等检测, 在基础研究和临床诊断中将有广泛的应用前景。

1 乳化液 PCR 的建立与发展

目前把单个 DNA 分子转化成大量相同的 DNA 分子时常用的技术是克隆和 PCR。克隆的优势是可以把不同种类的单个 DNA 分子分别扩增并自然

分离成不同的群落, 每个群落中包含上百万个完全相同的拷贝。由于基因存在突变等因素, 传统 PCR 用相同的引物扩增的产物不一定相同, 因此要达到和克隆相同的目的就必须把每个 DNA 分子分在不同的 PCR 管中进行扩增, 这相当困难, 因为当模板量很小时, 传统 PCR 扩增已非常困难, 非特异产物往往占主导地位, 引物二聚体也常常出现, 特异性产物少, 扩增效率低下, 甚至扩增失败, 对单个 DNA 分子进行扩增就更加困难了。如果用传统 PCR 同时扩增多种 DNA 分子时, 则会出现优先扩增短片段, 而且会出现非特异性产物^[1-2]。这些非特异性产物来源于一个引物延伸不完全, 在下一个循环中结合到另一种 DNA 片段, 也有一些是不同种类的 DNA 片段杂交形成的^[3]。所以传统 PCR 的实际灵敏度和准确度受到了限制。因此非常有必要建立一种既能把每个 DNA 分子完全分隔, 又能高效扩增的, 简单易行的单分子 PCR 技术。

1998 年, Tawfik 等^[4]在模拟每个细胞独立完成生命活动所需的反应过程中, 提出了“油包水”乳化液 (water-in-oil emulsion) 颗粒的概念, 这些分布在油相中的液体颗粒可使生化反应在各自微小空间内独立完成。2001 年 Ghadessy 等^[5]用乳化液颗粒形成的小室高效筛选出高耐热的、对蛋白质抑制剂肝素

* 基金项目: 盐城市医学科技发展计划项目 (YK2011013)。

通信作者: 邵可可, E-mail: keke87890394@163.com。

高抵抗力的 DNA 聚合酶。2003 年, Nakano 等^[6]将 PCR 反应移植到这种“油包水”乳化液颗粒中进行, 使每个 DNA 分子在独立的液相颗粒中得到有效扩增, 乳化液 PCR 技术应运而生。乳化液 PCR 是在 PCR 反应前, 将包含 PCR 反应所有成分的水相与油相按一定比例混合, 在一定转速搅拌力的作用下形成无数个大小相对均匀稳定且在油乳化液中悬浮的小水滴, 由于乳化液的阻隔, 这些小水滴构成了独立的 PCR 反应空间, 使 PCR 反应能够独立进行而互不干扰。最大特点是可形成数目庞大的独立反应空间以进行 DNA 扩增。最理想的状态下每个小水滴中只含有一个 DNA 模板, 进行 PCR 时不受干扰而正常扩增。这样每个小水滴中就是单个 DNA 分子的 PCR 扩增, 相当于进行高效的克隆扩增, 从而使乳化液 PCR 变成真正的单分子 PCR 技术。

乳化液 PCR 的优势在于^[1-3,7-9]: (1) 可以把不同的 DNA 片段分在不同的乳化液颗粒中单独进行 PCR 扩增, 避免了引物间以及不同种类产物间相互杂交, 消除了非特异性产物; (2) 能消除不同产物间的竞争抑制, 解决了传统 PCR 优先扩增短链 DNA 片段问题。能对每个 DNA 片段进行准确定量; (3) 高通量, 能同时扩增多达 10^8 个不同的 DNA 模板, 且产物量多于传统 PCR; (4) 灵敏度高, 能把正常基因中的极微量变异基因扩增出来, 而不受与其同源的正常基因的干扰; (5) 结合流式细胞术还可对 DNA 片段的原始拷贝数进行绝对定量检测。

乳化液 PCR 的缺点是较常规 PCR 多一步制备乳化液颗粒的过程; 乳化液 PCR 的关键技术是如何制成相对均匀、稳定、大小合适的乳化液颗粒。搅拌法制备乳化液颗粒时, 搅拌子的大小、搅拌速度和时间, 可控制乳化液颗粒的大小, 但搅拌子接触乳化液颗粒易造成污染。应用漩涡振荡器代替磁力搅拌器制备乳化液, 可进一步简化乳化液 PCR^[10], 但其制出的乳化液均一度差。应用超声波制备乳化液, 超声波的参数(如时间和波长)对乳化液颗粒的大小有巨大影响, 但制备的乳化液颗粒比搅拌法更加均匀^[11]。2010 年 Leng 等^[8]用微流控芯片制备更加均匀的乳化液颗粒, 并在 PCR 反应液中加入琼脂糖, 建立高效、经济的乳化液 PCR 技术。该技术选用超低熔点琼脂糖, 在 PCR 扩增时琼脂糖呈液态, 反应结束时降低温度使 PCR 反应液凝结成琼脂糖小球, 这样每个琼脂糖小球保持了单克隆特性。该技术避免了使用磁珠所造成的立体阻碍和电荷排斥而引起的低效 PCR 扩增问题。并用该方法检测出混合在

100 000 个正常的 K12 细胞中单个大肠埃希菌 $O_{157}:H_7$, 表现出极高的灵敏度^[12]。

2 乳化液 PCR 的应用

2.1 DNA 测序 multiplex polony 测序技术是 2005 年 Shendure 等^[13]用乳化液 PCR 和自动显微镜等技术发展起来的高通量测序技术。其独到之处在于使用连接酶把四色荧光标记寡核苷酸探针连续与单链 DNA 模板配对, 通过多次配对后得到颜色编码, 再解码成碱基序列。该法可对单拷贝 DNA 片段进行大规模扩增和高通量并行测序。2007 年底美国 ABI 公司把相关技术整合进 SOLiD 测序技术平台, 推出新一代基于乳化液 PCR 原理的高通量并行基因测序平台。2005 年, 454 公司推出了革命性的基于焦磷酸测序法的超高通量基因组测序系统——Genome Sequencer 20 System, 开创了边合成、边测序 (sequencing-by-synthesis) 的先河。一年后, 又推出了性能更优的第二代基因组测序系统—Genome Sequencer FLX System (GS FLX)。该法也用乳化液 PCR 技术扩增 DNA, 使每一个水滴中开始时仅包含一个包被大量引物的磁珠和一个链接到微珠上的 DNA 模板分子, 这样每个独特的片段在自己的微反应器里进行独立的扩增, 而没有其他的竞争性或污染性序列的影响, 整个片段文库的扩增平行进行。对于每一个片段而言, 扩增后产生了数百万个相同的拷贝。随后, 乳化液混合物被打破, 扩增的片段仍然结合在磁珠上。接着将携带 DNA 的捕获磁珠放入 PTP 板中进行后继的测序。

乳化液 PCR 和 DNA 测序技术的结合, 利用前者的微量、并行的特点使大量的测序反应能同时进行, 实现了测序的高通量, 使 DNA 测序技术得到了质的发展。

2.2 定量检测 2003 年, Dressman 等^[14]用乳化液 PCR 技术建立 BEAMing 技术来定量检测基因突变。该技术主要包括六个步骤(图 1): (1) 将上游引物与磁珠连接; (2) 将配置好的 PCR 体系的水溶液与矿物油混合, 形成相互独立的乳化液微粒; (3) PCR 扩增; (4) 磁场吸附纯化磁珠, PCR 产物变性形成单链 DNA; (5) 与荧光标记的探针杂交(预先设计好针对突变或未突变位点的探针, 并分别用不同颜色的荧光标记); (6) 流式细胞仪对磁珠的荧光信号进行定量分析。因为每个乳化液颗粒中只包含一个磁珠, 每个磁珠就代表一个模板, 不同的荧光颜色代表不同的模板, 所以检测磁珠的数量就是原始模板的

量,是绝对定量。同时,该技术还能检测基因突变率,因为基因的突变程度与肿瘤的发展密切相关,使该技术对肿瘤的早期诊断有重要的临床应用价值。2005 年 Frank 等^[15]用 BEAMing 技术定量检测血浆中 APC 分子的突变。早期结直肠癌患者 1 mL 血浆中约有 47 800 个 APC 分子,其中 8% 发生突变,研究还发现当突变率在 0.01% ~ 1.7% 时,约有 60% 的患者是可治愈的。2006 年 Li 等^[16]用 BEAMing 技术检测到万分之一的罕见型基因序列突变,表现出极高的灵敏度。2009 年 Li 等^[9]用该技术检测血浆循环 DNA 波形蛋白基因甲基化,能准确地测出混

合在 1 000 个未甲基化的波形蛋白基因中的 1 个甲基化序列,即能测出 0.1% 的甲基化序列。以每 2 mL 的血浆中含一个甲基化波形蛋白片段为临界值来判断,该技术检出大肠癌总的敏感性为 59%,特异性为 93%。对仅限于结肠壁的早期肠癌的敏感性为 52%,而血清 CEA 仅为 14%,该法为 CEA 测定的 4 倍。而传统的甲基化特异性 PCR 检测时,当甲基化程度少于 6.2% 不能检出。BEAMing 技术把肿瘤基因突变的检测敏感性和特异性提高到一个新的高度,能有效应用于突变率较低的早期肿瘤。

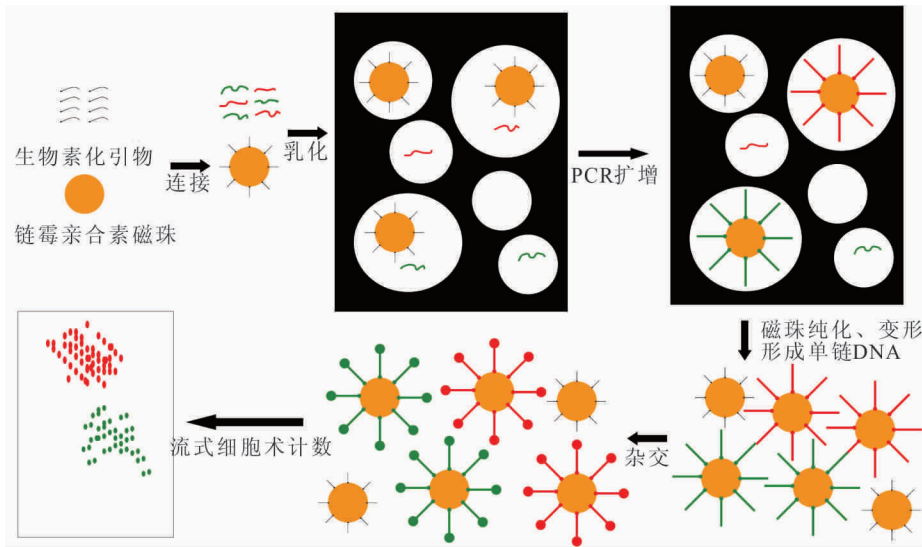


图 1 BEAMing 技术定量检测基因突变

2011 年 Bio Rad 公司推出以乳化液为基础的“第三代 PCR”——QX100 微滴式数字 PCR 系统。微滴式数字 PCR 是一种全新的核酸定量方法,与传统定量 PCR 相比,其结果更准确,灵敏度更高。定量的结果不再依赖于 Ct 值,直接给出靶序列的起始浓度,实现真正意义上的绝对定量。QX100 微滴发生器将含有核酸分子的反应体系制成成千上万个纳升(nL)级的乳化液颗粒,经 PCR 扩增后,采用微滴分析仪逐个对每个微滴进行检测,有荧光信号的微滴判读为 1,没有荧光信号的微滴判读为 0(因此该技术被称为“数字 PCR”),最终根据泊松分布原理以及阳性微滴的比例,分析软件可计算给出待检靶分子的浓度或拷贝数。由于能够确定待检靶分子的绝对数目,因此 QX100 微滴式数字 PCR 特别适合应用于拷贝数变异、突变检测和基因相对表达研究等,并对遗传病、癌症、传染病的研究提供了一种全新的技术思路与手段。

2.3 其他应用 2005 年 Wetmur 等^[17]把乳化液

PCR 和 Linking PCR 结合起来建立了 Linking emulsion PCR (LE-PCR) 技术,能同时分析一条基因上多个突变位点,从而使人群的单体型分析变得简单、方便。同年 Nakano 等^[18]建立 RT-乳化液 PCR 检测单分子 RNA。Kojima 等^[19]用乳化液 PCR 建立高通量筛选转录因子 DNA 结合位点的方法,2012 年又用乳化液 PCR 建立了高通量检测和筛选启动子活性的方法^[20]。2006 年 Williams 等^[1]发现用乳化液 PCR 能高效扩增复合基因文库,同时能解决普通 PCR 的偏移扩增和非特异性产物问题。Ge 等^[2,21]建立乳化液多重 PCR 结合微孔板法高效检测孕妇血浆中胎儿 DNA,并用此法检测不育男子和孕妇胎儿中 Y 染色体的部分缺失。2011 年 Shao 等^[3]把乳化液 PCR 用于 SELEX 筛选,使随机文库的扩增变得简单高效。2012 年 Deng 等^[22]结合乳化液 PCR 技术建立凝胶微球阵列法定量检测结直肠癌患者粪便中 APC、TP53 和 KRAS 的突变,结果 50% 的患者阳性,提示该法有可能作为结直肠癌的无创诊断。

3 展望

随着乳化液 PCR 技术发展,尤其是以乳化液 PCR 技术为基础的新一代的 PCR 系统的出现,使乳化液 PCR 广泛渗透到分子生物学的各个领域,尤其是对肿瘤的早期诊断可能会有很高的应用价值。

4 参考文献

- [1] Williams R, Peisajovich SG, Miller OJ, *et al.* Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR [J]. *Nat Methods*, 2006, 3 (7):545-550.
- [2] Ge Q, Liu Z, Bai Y, *et al.* Emulsion PCR-based method to detect Y chromosome microdeletions [J]. *Anal Biochem*, 2007, 367(2):173-178.
- [3] Shao K, Ding W, Wang F, *et al.* Emulsion PCR: a high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24910.
- [4] Tawfik DS, Griffiths AD. Man-made cell-like compartments for molecular evolution [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(7):652-656.
- [5] Ghadessy FJ, Ong JL, Holliger P. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8):4552-4557.
- [6] Nakano M, Komatsu J, Matsuura S, *et al.* Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion [J]. *J Biotechnol*, 2003, 102(2):117-124.
- [7] Shi X, Tang C, Wang W, *et al.* Digital quantification of gene expression using emulsion PCR [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(3):528-534.
- [8] Leng X, Zhang W, Wang C, *et al.* Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR [J]. *Lab Chip*, 2010, 10(21):2841-2843.
- [9] Li M, Chen WD, Papadopoulos N, *et al.* Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(9):858-863.
- [10] Schütze T, Rubelt F, Repkow J, *et al.* A streamlined protocol for emulsion polymerase chain reaction and subsequent purification [J]. *Anal Biochem*, 2011, 410(1):155-157.
- [11] Musyanovych A, Mailänder V, Landfester K. Miniemulsion droplets as single molecule nanoreactors for polymerase chain reaction [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(4):1824-1828.
- [12] Zhu Z, Zhang W, Leng X, *et al.* Highly sensitive and quantitative detection of rare pathogens through agarose droplet microfluidic emulsion PCR at the single-cell level [J]. *Lab Chip*, 2012. [Epub ahead of print]
- [13] Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, *et al.* Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome [J]. *Science*, 2005, 309(5741):1728-1732.
- [14] Dressman D, Yan H, Traverso G, *et al.* Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(15):8817-8822.
- [15] Diehl F, Li M, Dressman D, *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(45):16368-16373.
- [16] Li M, Diehl F, Dressman D, *et al.* BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(2):95-97.
- [17] Wetmur JG, Kumar M, Zhang L, *et al.* Molecular haplotyping by linking emulsion PCR: analysis of paraoxonase 1 haplotypes and phenotypes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(8):2615-2619.
- [18] Nakano M, Nakai N, Kurita H, *et al.* Single-molecule reverse transcription polymerase chain reaction using water-in-oil emulsion [J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99(3):293-295.
- [19] Kojima T, Takei Y, Ohtsuka M, *et al.* PCR amplification from single DNA molecules on magnetic beads in emulsion: application for high-throughput screening of transcription factor targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(17):e150.
- [20] Kojima T, Ohuchi S, Ito Y, *et al.* High-throughput screening method for promoter activity using bead display and a ligase ribozyme [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012. [Epub ahead of print]
- [21] Ge Q, Bai Y, Liu Z, *et al.* Detection of fetal DNA in maternal plasma by microarray coupled with emulsions PCR [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 369(1):82-88.
- [22] Deng L, Qi Z, Zou B, *et al.* Digital detection of multiple minority mutants in stool DNA for noninvasive colorectal cancer diagnosis [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(13):5645-5652.

(收稿日期:2012-08-31)

(本文编辑:许晓蒙,陈维忠)