

# 基于微滴式数字 PCR 技术的甲型流感病毒绝对定量方法的建立及应用

冯兆民, 赵翔, 邹晓辉, 朱闻斐, 陈永坤, 王大燕, 舒跃龙\*

(中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 世界卫生组织全球流感参比和研究合作中心, 感染性疾病诊治协同创新中心, 卫生和计划生育委员会医学病毒和病毒病重点实验室 北京 102206)

**摘要:**数字 PCR(Digital PCR, dPCR)是核酸绝对定量的新方法,然而,基于 dPCR 的甲型流感病毒(Influenza A virus, FluA)绝对定量方法还未系统建立。本研究首先对微滴式 dPCR 的退火温度进行了梯度优化,确定了 dPCR 反应的最佳退火温度为 64.4 °C;利用 FluA 核酸标准品,确定了微滴式 dPCR 对 FluA 的检测范围为 37.7~8.22 × 10<sup>4</sup> 拷贝/μL,检测的检出限为 3.77 拷贝/反应。微滴式 dPCR 的检测方法与标准品拷贝数的相关系数为 R<sup>2</sup> = 0.9988,提示该方法检测结果具有较高的可信度。用建立好的微滴式 dPCR 方法可对待测临床样本中的 FluA 进行了拷贝数定量。因此本研究建立了基于微滴式 dPCR 的 FluA 绝对定量方法,可有效地对临床样本中甲型流感病毒载量进行绝对定量,为临床研究中病毒载量的测定提供了一种技术。

**关键词:**数字 PCR;甲型流感病毒;绝对定量

中图分类号:R373.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8721(2017)01-0001-05

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003095

流行性感冒简称流感,是一种重要的呼吸道传染病。每年的流感流行会引起全世界 5%~10% 的成年人和 20%~30% 的儿童感染,造成 300 万至 500 万的重症病例,其中死亡 25 万至 50 万人<sup>[1]</sup>。抗病毒药物是预防和治疗流感的有效手段之一<sup>[2-3]</sup>。

对临床上进行抗病毒治疗的病人,病毒载量的变化可以直接评价药物治疗的效果<sup>[4-5]</sup>。目前临床上常用的病毒定量方法是荧光定量 PCR (Quantitative PCR, qPCR)技术。qPCR 的定量方法需要制备标准品来建立标准曲线,通过标准曲线来计算样本的含量,并针对每种病原体制备标准品,实验过程耗时费力,且准确性较低。

数字 PCR(Digital PCR, dPCR)技术是一种新的核酸定量方法,与传统定量 PCR(qPCR)技术不同,dPCR 不依赖于标准曲线和标准品,可直接获得样本的拷贝数。其原理是将一个标准的 PCR 反应体系分布到一定数目的反应器中(如微滴、芯片),使大部分的反应器中含有 1 个或 0 个拷贝,进行 PCR 扩增,通过读取荧光信号来确定阳性反应孔和阴性

反应孔的个数,再通过统计学方法泊松分布计算样本中核酸拷贝数。

先前有研究用 dPCR 方法对临床样本中的 H7N9 病毒进行定量,用来监测临床抗病毒治疗的效果<sup>[6]</sup>,然而,文章并未对 dPCR 的退火温度及检出限进行研究,采用 dPCR 对甲型流感病毒(Influenza A virus, FluA)进行绝对定量的检测方法也还未建立。因此,本研究通过对微滴式 dPCR 用于 FluA 检测的最佳退火温度、检测范围、检出限以及检测准确度的研究,建立了基于微滴式 dPCR 技术的 FluA 绝对定量技术,并将其用于临床样本的 FluA 绝对定量,为临床样本中病毒绝对定量方法提供了技术参考。

## 材料与方法

**1 RNA 核酸标准品和临床样本** RNA 核酸标准品由国家流感中心制备并保存。临床样本为 2016 年 1 月采集的湖南省 ILI 病例的咽拭子,经 real-time RT-PCR 确诊为甲型流感病毒阳性的标本。

**2 仪器与试剂** NanoDrop Lite 紫外分光光度计购自美国赛默飞公司;QX200 微滴式数字 PCR 仪、QX200 Droplet Generator、PX1 Plate Sealer 和 QX200 Droplet Reader 均购自美国伯乐公司;Eppendorf PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司;RNA 提取试剂盒(RNeasy mini kit)购自德国凯杰公司;One-step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes、

收稿日期:2016-11-03;修回日期:2016-12-24

基金项目:北京市科技计划项目(项目编号:D151100002115003),  
题目:各级综合医院病毒性肺炎筛查检测技术研究;国家科技支撑计划(项目编号:2015BA12B11),题目:病毒性肺炎诊治和网络建设。

作者简介:冯兆民(1990-),男,在读硕士研究生,主要从事流感病毒的研究, Tel:010-58900852, E-mail:fengzhaomin@cnic.org.cn

\*通讯作者:舒跃龙(1970-),研究员,博士生导师,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, Tel:010-58900850, E-mail:yshu@cnic.org.cn

Droplet generation oil for probe 和 Droplet reader oil 均购自美国伯乐公司。

3 引物和探针 引物和探针由大连六合通公司合成(表 1),加水稀释至 10 pM 备用。

表 1 甲型流感病毒的引物和探针

Table 1 Primer and probe sequences for quantification of influenza A viruses by droplet digital PCR

Primer and probe	Sequence
Forward Primer	5'-GACCRATCCTGTACCTCTGAC-3'
Reverse Primer	5'-GGGCATTYTGACAAAKCGTCTACG-3'
Probe	5'-TGCAGTCCCTCGCTCACTGGGCACG-3'

4 dPCR 实验 dPCR 实验使用的是伯乐公司的 QX200 微滴式 dPCR 仪,主要实验步骤如下:

① 微滴生成 配制 20 μl 探针法定量反应体系(混合液 5 μl, 逆转录酶 2 μl, 300 nM DTT 1 μl, 900 nM 的引物 0.9 μl, 250 nM 的探针 0.25 μl, 2 μl RNA 模板, 无核酶水 7.95 μl), 在微滴生成卡夹中加入 70 μl 微滴生成油, 将卡夹放在微滴生成仪上, 开始生成微滴。

② PCR 扩增 将生成的微滴转移到 96 孔板内, 使用 PX1 热封仪对其进行封膜。将封好膜的 96 孔板放在 Eppendorf PCR 仪上进行 PCR 扩增。

③ 微滴读取 将扩增完的 96 孔板平稳放入 QX200 微滴读取仪上, 打开 QuantSoft 软件, 进行微滴结果读取。每个实验中的阴性对照加水代替反应模板。微滴式 dPCR 反应条件如表 2。

表 2 微滴式 dPCR 的反应条件

Table 2 Cycling conditions for droplet digital PCR

Cycling Step	Temperature, °C	Time	Number of cycle
Reverse transcription	45	60min	1
Enzyme activation	95	10min	1
Denaturation	95	30sec	40
Annealing	55-65	1min	-
Enzyme deactivation	98	10min	1
Hold	4	∞	1-

5 退火温度的优化 微滴式 dPCR 的退火温度是最重要的参数,对于反应的特异性有重要影响,退火温度太低可能引起非特异性扩增,退火温度过高会降低反应的灵敏度。退火温度范围:55°C-65°C,在 Eppendorf PCR 上设置温度梯度,梯度设置为 55.2°C、55.4°C、56°C、57°C、58.2°C、59.6°C、61°C、62°C、63.5°C、64.4°C、65°C、65.1°C 共 12 个梯度。用 RNA 核酸标准品进行实验,重复进行三次实验,求平均值,确定最佳的退火温度。

6 微滴式 dPCR 检测范围的确定 RNA 核酸标准品通过 NanoDrop Lite 紫外分光光度计进行定量,将浓度为  $1.03 \times 10^6$  拷贝/μL 的 RNA 标准品进行倍比稀释至 31.44 拷贝/μL,样本编号依次为 S0-S15。在总体积为 20 μl 的微滴式 dPCR 反应体系中加入稀释好的 RNA 模板 2 μl,进行 dPCR 检测范围定量,重复进行三次实验。

7 临床样本定量 对临床上感染甲型流感病毒患者的咽拭子,利用 RNA 提取试剂盒提取样本病毒 RNA,进行微滴式 dPCR 定量检测。

## 结果

### 1 退火温度的优化

分别计算温度在 55.2、55.4、56、57、58.2、59.6、61、62.3、63.5、64.4、65、65.1 °C 共 12 个梯度,三次重复试验所检测标准品拷贝数的平均值,结果分别为 187、182、185、191、195、190、219、209、210、221、210 以及 219 拷贝/μL 如图 1 所示。在温度为 64.4 °C 时,检测样品的拷贝数最高,因此确定最佳的退火温度为 64.4 °C。

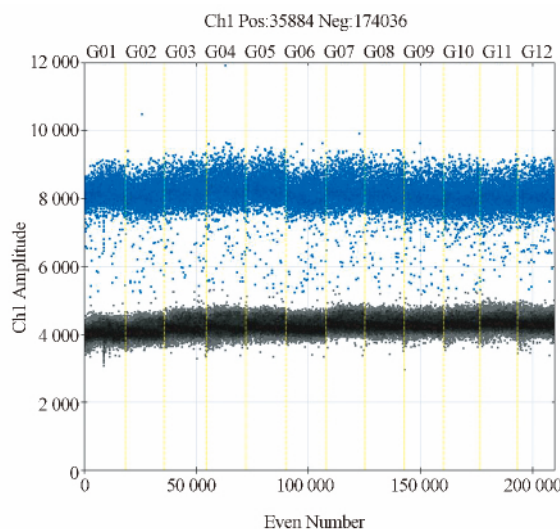


图 1 甲型流感病毒样本 12 个温度梯度微滴式 dPCR 的一维散点图

Figure 1 One-dimensional scatter plot of selected wells/samples at twelve temperature gradients for quantification of RNA in influenza A viruses using droplet digital PCR

### 2 微滴式 dPCR 的检测范围的确定

将稀释好的 RNA 样本重复三次以后进行实验,所有的 PCR 反应(48 个)产生的平均微滴数目为 16 390(最低微滴数 12 141,最高微滴数 19 640),

单个样品内总微滴数是检验实验好坏的指标,可接受的平均微滴数目为 10 000,本实验反应平均微滴数为 16 390,表明所有反应的微滴生成正常,保证了后续实验结果分析的准确性。

在图 2. a 中可以看到,核酸浓度依次降低,阳性反应微滴数(蓝点)由左到右依次减少;阴性反应微滴数(黑点)数目由左向右依次增加,颜色加深。样本 S0 由于浓度过高,超出了微滴式 dPCR 的检测范围,未能检测到样本浓度。图 2. b 中红色为阈值线,阳性反应峰与阴性反应峰分开明显。

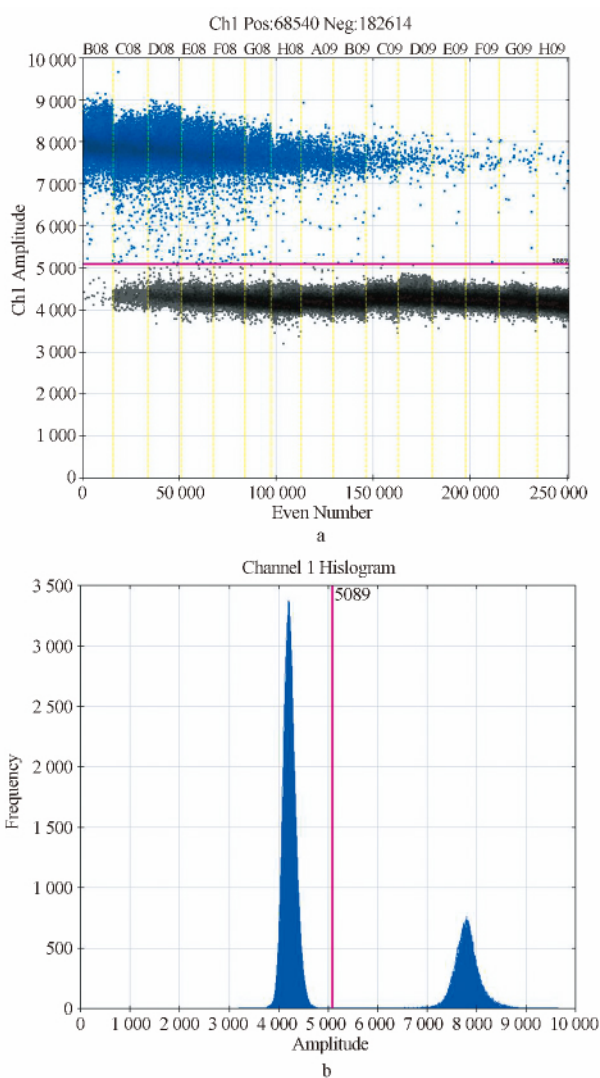


图 2 不同浓度下的 FluA RNA 微滴式 dPCR 检测结果的一维散点图(a)和直方图(b)

Figure 2 One-dimensional scatter plot (a) and histograms (b) of selected wells/samples for quantification different concentrations of influenza A viruses RNA by droplet digital PCR

### 3 微滴式 dPCR 检测结果相关性评估

由图 3 可知,微滴式 dPCR 的检测范围,从 S1

到 S12,甲型流感病毒 RNA 浓度范围在  $8.22 \times 10^4 \sim 37.7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时,紫外分光光度计测定的甲型流感病毒的拷贝数与微滴式 dPCR 检测的拷贝数成线性函数,线性相关系数  $R^2 = 0.9988$ ,线性关系良好,提示该微滴式 dPCR 检测方法是可靠的。

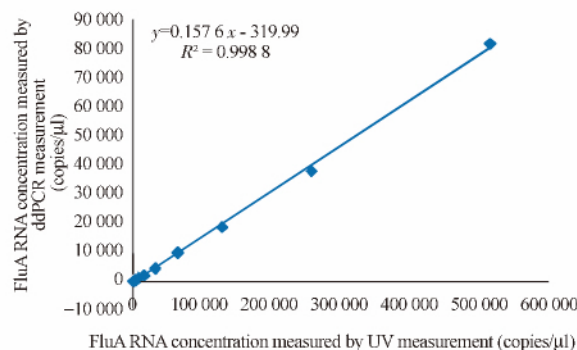


图 3 微滴式 dPCR 测定甲型流感病毒的检测范围

Figure 3 Dynamic range of droplet digital PCR for quantification influenza A viruses

### 4 微滴式 dPCR 检测甲型流感病毒的检出限的确定

由图 3 和表 3 可知,样本 S12 为可准确定量的最低浓度,在检测浓度在 S1~S12 之间线性关系良好,样本 S1-S12 定量的偏倚和变异系数接近,微滴式 dPCR 测定的 S12 的平均浓度为 3.77 拷贝/反应,因此该方法检测甲型流感病毒的检出限为 3.77 拷贝/反应。

表 3 微滴式 dPCR 定量倍比稀释样本的拷贝数

Table 3 Dilution series output of droplet digital PCR for quantification of influenza A viruses

No.	UV measured (copies/ $\mu\text{L}$ )	dPCR measured (copies/ $\mu\text{L}$ )	Mean copies (copies/ $\mu\text{L}$ )	Bias (%)	SD (S)	CV (%)
S0	$1.03 \times 10^6$	No Call				
S1	$5.15 \times 10^5$	81 000	82166.7	84.05	5346.3	6.51
S2	$2.575 \times 10^5$	39 700	38166.7	85.18	2003.3	5.25
S3	$1.2875 \times 10^5$	18 870	18890	85.33	1780	9.42
S4	$6.4375 \times 10^4$	10 340	10066.7	84.36	240.1	2.39
S5	$3.2188 \times 10^4$	4 560	4580	85.77	340.4	7.43

续表 3

No.	UV measured (copies/ $\mu$ l)	dPCR measured (copies/ $\mu$ l)	Mean copies (copies/ $\mu$ l)	Bias (%)	SD (S)	CV (%)
S6	$1.6094 \times 10^4$	4 250	2186.7	86.41	166.53	7.62
		2 320				
		2 240				
		2 000				
S7	$8.047 \times 10^3$	1 210	1233.3	84.67	32.15	2.61
		1 270				
		1 220				
		643				
S8	4023.5	686	630.3	84.33	62.96	9.99
		562				
		356				
		304				
S9	2011.75	280	313.3	84.43	38.85	12.4
		162				
		158				
		132				
S10	1005.88	77	150.6	85.03	16.29	10.82
		70				
		79				
		36				
S11	502.94	38	75.3	85.03	4.73	6.28
		39				
		26				
		23				
S12	251.47	20	37.7	85.01	1.53	4.06
		20				
		13				
		21				
S13	125.74	13	23	81.71	3	13.04
		13				
		13				
		13				
S14	62.87	5.7	18	71.37	4.36	24.22
		23				
		23				
		23				
S15	31.44	5.7	13.9	55.79	8.69	62.52
		23				
		23				
		23				

Note: "No Call" denotes that the virus load was beyond the detection range.

### 5 微滴式 dPCR 对临床样本中拷贝数定量检测的应用

对临床上感染甲型流感病毒患者的 8 份样本,进行微滴式 dPCR 定量,结果分别为:62.5、55.5、4080、2735、1540、287、27400 和 22615 拷贝/ $\mu$ L。利用建立好的微滴式 dPCR 方法对临床标本进行了准确定量,定量结果在本方法的检测范围内。

## 讨 论

随着分子生物学技术的发展,dPCR 的应用越来越广泛,在癌症检测<sup>[7-8]</sup>,产前诊断<sup>[9-10]</sup>,二代测序<sup>[11]</sup>,核酸定量上应用越来越多<sup>[12]</sup>。先前有文章利用 dPCR 对 GBV-C RNA 病毒和水中 RNA 病毒进行绝对定量<sup>[13-14]</sup>,也有研究对 HIV 和 HBV 病毒载

量进行定量<sup>[15-17]</sup>,而利用 dPCR 对流感病毒进行绝对定量的研究和应用相对较少。

本研究通过 dPCR 的技术,建立了病毒载量绝对定量的方法,确定了微滴式 dPCR 定量流感病毒的最佳退火温度、检测范围及最低的检出限,能够直接计算出样品中流感病毒的拷贝数,实现真正意义上的绝对定量。dPCR 也有自己的不足之处,对于浓度太高的样本,容易超出 dPCR 的检测范围,但可以将样本稀释,再进行检测。阈值线的设置可能会引起结果的偏倚,反应微粒处于阈值的中间可能会被定义为阳性或阴性<sup>[18]</sup>,造成错误的结果,因此在进行样本检测时,应确保不超过 dPCR 的检测范围。研究中,由于利用的一步法 dPCR 方法,需要将 RNA 反转录为 DNA,再进行定量检测,反转录效率比较低,导致定量结果与实际 FluA 核酸标准品差异较大。

综上所述,本研究建立了基于微滴式 dPCR 技术的 FluA 绝对定量的方法,并可对临床样本中的病毒含量进行绝对定量,对研究抗病毒药物,指导临床的药物治疗,监测治疗的效果及疾病的转归具有重要的意义。

### 参考文献:

- [1] World Health Organization Influenza (Seasonal)[OL]. Fact sheet No. 211, 2009. <http://www.who.int/bulletin/volumes/90/4/11-097808/en/>.
- [2] Monto A S. The role of antivirals in the control of influenza[J]. Vaccine, 2003, 1: 21(16): 1796-1800.
- [3] De Jong J C, Beyer W E, Rimmelzwaan G F, et al. Neuraminidase inhibitors oseltamivir and zanamivir: new means of defence against influenza [J]. Ned Tijdschr Geneeskde, 2004, 14, 148(7): 348.
- [4] Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. Anal Chem, 2011, 83: 8604-8610.
- [5] Hu Y W, Lu S H, Song Z J, et al. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance[J]. Lancet, 2013, S0140-6736 (13): 61123-61125.
- [6] Yan Y, Jia X J, Wang H H, et al. Dynamic Quantification of Avian Influenza H7N9 (A) Virus in a Human Infection during Clinical Treatment Using Droplet Digital PCR[J]. J Virol Methods, 2016, 234: 22-27.
- [7] Wang J, Ramakrishnan R, Tang Z, et al. Quantifying

- EGFR alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital PCR arrays[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(4): 623-632.
- [8] Yung T K, Chan K A, Mok T S, et al. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients [J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(6): 2076-2084.
- [9] Lo Y M, Lun F M, Chan K C, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 13116-13121.
- [10] Barrett A N, McDonnell T C, Chan K C, et al. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia[J]. *Clin Chem*, 2012, 58: 1026-1032.
- [11] White R, Blainey P, Fan H C, et al. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 116.
- [12] Srain M C, Lada S M, Luong T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e55943.
- [13] White R A, Quake S R, Curr K. Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus[J]. *J Virol Methods*, 2012, 179: 45-50.
- [14] Racki N, Morisset D, Gutierrez-Aguirre I, et al. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 661-667.
- [15] Henrich T J, Gallien S, Li J Z, et al. Low-level detection and quantitation of cellular HIV-1 DNA and 2-LTR circles using droplet digital PCR [J]. *J Virol Methods*, 2012, 186: 68-72.
- [16] Shen F, Sun B, Kreutz J E, et al. Multiplexed quantification of nucleic acids with large dynamic range using multivolume digital RT-PCR on a rotational SlipChip tested with HIV and hepatitis C viral load[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 17705-17712.
- [17] Huang J T, Liu Y J, Wang J, et al. Next Generation Digital PCR Measurement of Hepatitis B Virus Copy Number in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Hepatocellular Carcinoma Tissue [J]. *Clin Chem*, 2015, 61, 1: 290-296.
- [18] Bosman K J, Nijhuis M, Van Ham P M, et al. Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13811.

## Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Method for Absolute Quantification of Influenza A Viruses

FENG Zhaomin, ZHAO Xiang, ZOU Xiaohui, ZHU Wenfei, CHEN Yongkun,  
WANG Dayan, SHU Yuelong\*

(World Health Organization Global Influenza Collaboration Center for Reference and Research, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Collaboration Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory for Medical Virology, National Health and Family Planning Commission, Beijing 102206, China)

**Abstract:** Digital polymerase chain reaction (dPCR) is a new method for absolute quantification. However, an absolute quantification method for influenza A viruses based on droplet digital polymerase chain reaction (dPCR) has not been established. In this study, we found that: (i) the annealing temperature of dPCR was optimized at 64.4°C; (ii) the detection range of dPCR was 37.7~8.22×10<sup>4</sup> copies/μl for influenza A viruses; (iii) the limit of detection of dPCR was 3.77 copies/reaction. The linear correlation coefficient ( $R^2$ ) was found to be 0.9988, suggesting the high reliability of our dPCR method. The dPCR method could be used to detect influenza A viruses clinically. In summary, we developed a dPCR method for absolute quantification of influenza A viruses. This method could be used effectively to quantify influenza A viruses in clinical samples. Therefore, our method could be a new tool for the absolute quantification of viral load.

**Key words:** Digital polymerase chain reaction; Influenza A virus; Absolute quantification

\*Corresponding author: SHU Yuelong, E-mail: yshu@cnic.org.cn