



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109536384 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 18

(21) 申请号 201811582784.8
 (22) 申请日 2018.12.24
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109536384 A
 (43) 申请公布日 2019.03.29
 (73) 专利权人 中国科学院上海微系统与信息技术研究所
 地址 200050 上海市长宁区长宁路865号
 (72) 发明人 毛红菊 程祖乐
 (74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
 31002
 代理人 邓琪 余永莉
 (51) Int. Cl.
 C12M 1/38 (2006.01)
 C12M 1/34 (2006.01)
 C12M 1/00 (2006.01)
 C12Q 1/6851 (2018.01)

(56) 对比文件
 CN 108690874 A, 2018.10.23
 CN 102277294 A, 2011.12.14
 CN 104611223 A, 2015.05.13
 CN 106434330 A, 2017.02.22
 CN 105505761 A, 2016.04.20
 CN 108660191 A, 2018.10.16
 US 2018258465 A1, 2018.09.13
 CN 104894106 A, 2015.09.09
 刘亦敏 等. “一种微腔型PCR集成芯片的设计及其热分析”. 《传感技术学报》. 2011, 第24卷(第8期), 第1092-1097页.
 刘亦敏 等. “一种微腔型PCR集成芯片的设计及其热分析”. 《传感技术学报》. 2011, 第24卷(第8期), 第1092-1097页.
 刘聪 等. “微滴技术的数字PCR研究现状及发展趋势”. 《化学研究与应用》. 2018, 第30卷(第7期), 第1041-1047页.

审查员 汪毅

权利要求书1页 说明书7页
序列表1页 附图6页

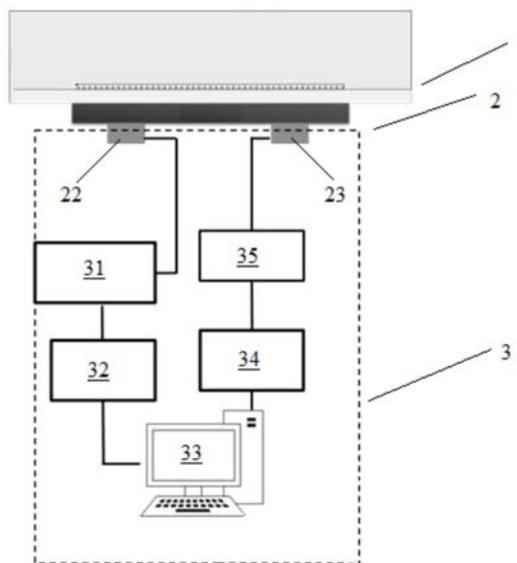
(54) 发明名称

一种用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统及其应用, 该系统包括: 样本反应芯片, 芯片上包括若干相互独立的样本存储腔, 其中可容纳若干个微米级样本反应单元; 用于对样本反应芯片进行加热的微加热盘阵列, 该微加热盘阵列上包括若干相互独立的微加热盘, 一个微加热盘仅仅对应和加热一个样本存储腔; 以及与微加热盘连接实现温度控制的温控系统; 其中, 单个样本存储腔与对应的单个微加热盘共同组成一个快速数字PCR检测单元。根据本发明提供的数字PCR系统具有胜过现有数字PCR系统的各种优点, 可实现大于100°C/s的升温速度和大于50°C/s的降温速度, 单个循环时间少于10s, 从而

实现数字PCR核酸快速绝对定量检测。



1. 一种用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统,其特征在于,包括:

样本反应芯片,所述样本反应芯片上包括若干相互独立的毫米尺度的样本存储腔,单个所述样本存储腔中可容纳若干个微米级样本反应单元,所述样本反应芯片具有液滴分裂功能,所述液滴分裂功能通过管径逐级变窄的微流控管路实现,使得进入到每个样本存储腔的液滴数量基本相等,每个下一级管道的直径为相邻上一级管道直径的65%~70%,所述单个样本存储腔的尺寸为2~5mm×2~5mm;

用于对所述样本反应芯片进行加热的微加热盘阵列,该微加热盘阵列采用刻蚀工艺将硅片刻穿制成,所述微加热盘阵列上包括若干相互独立的毫米尺度的微加热盘,一个微加热盘仅仅对应和加热一个样本存储腔,每个微加热盘集成一个测温电极和一个加热电极,所述测温电极和加热电极分别通过微加热盘两侧不同的窄梁与微加热盘连通,所述微加热盘两两之间采用镂空处理以减少相邻微加热盘之间的温度传递;以及

与所述微加热盘连接实现温度控制的温控系统;

其中,所述样本反应芯片上的单个所述样本存储腔中可容纳2000~10000个微米级样本反应单元,所述样本反应芯片中的微米级样本反应单元包括油包水液滴形式或微腔形式,单个样本存储腔与对应的单个微加热盘共同组成一个快速数字PCR检测单元,通过多个所述快速数字PCR检测单元组成的这样一种数字PCR系统可实现大于50°C/s的温度切换速率,以及小于20 s的单次热循环时间。

2. 根据权利要求1所述的数字PCR系统,其特征在于,每个微加热盘集成一个测温电极和一个加热电极,所述测温电极和加热电极分别通过微加热盘两侧不同的窄梁与微加热盘连通。

3. 根据权利要求1所述的数字PCR系统,其特征在于,所述样本反应芯片由选自聚二甲基硅氧烷、环氧树脂、玻璃、石英玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯中的任意一种材料制成或者多种材料复合而成。

4. 根据权利要求1所述的数字PCR系统,其特征在于,所述微加热盘阵列的基底由选自硅、玻璃、石英玻璃中的至少一种材料制成,所述测温电极和加热电极分别由铂,金,银,铜,铬,钛中的任意一种材料或者多种材料制成。

5. 一种根据权利要求1-4中任意一项所述的数字PCR系统的应用,包括核酸靶标分子绝对定量检测,核酸突变绝对定量检测,核酸甲基化绝对定量检测,拷贝数变异绝对定量,测序精准建库。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,包括以下步骤:

1) 提供一种根据权利要求1-4中任意一项所述的数字PCR系统;

2) 核酸样本通过微流控技术分散成均一的微米级样本反应单元,并均匀分配到各个毫米尺度的样本存储腔中;

3) 一个样本存储腔与相应的一个微加热盘组成一个快速数字PCR检测单元,在温控系统的作用下,每个样本存储腔通过相应的微加热盘加热实现快速数字PCR;以及

4) 通过统计每个存储腔内带有荧光信号的样本单元个数即可确定目标核酸初始浓度的准确值,实现对核酸样本的绝对定量。

一种用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸快速扩增和绝对定量检测技术,更具体地涉及一种用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统及其应用。

背景技术

[0002] 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)是一种基因扩增技术,它能够对目标DNA序列在一段时间内进行指数倍的扩增,从而得到大量的目标DNA序列拷贝。

[0003] 传统PCR仪上对核酸样本进行40次扩增循环时间通常要超过一个小时,其中大量的时间耗在了系统升降温过程以及温度稳定上,这个过程不仅消耗大量时间,往往还需要大体积的样本。在一些特定的PCR应用上还会导致反应液蒸发等严重问题。

[0004] 快速PCR技术有望解决这些问题。快速PCR的研究可以追溯到上世纪90年代,Carl W. 等人发现PCR反应过程中的变性和退火反应完成真实时间不到1s,远远小于目前设计的15s,同时一段200bp长的序列的延伸时间也只需10s左右,远远小于设计的60s [Biotechniques.10(1991)].。同时,其研究结果也表明对于核酸扩增来说,长时间的温度过渡过程容易导致非特异扩增以及核酸扩增酶的活力下降。因此他们提出了通过快速的升降温速度和稳定速度缩短PCR系统的温度切换和稳定时间,实现高特异的扩增的快速PCR方法。基于该原理,Neuzil等人利用微加工方法制备了一种基于焦耳热的温度循环装置,利用毫米级的微加热电极具有的低热容的特点,实现了175°C/s的升温和125°C/s的降温速率,并成功地将其应用到一个包含100nl反应液和1μl油相的反应体系中,实现了最快5分钟完成核酸实时荧光定量实验的应用[Nucleic Acids Res.34(2006)].。然而,实时荧光定量PCR在定量目标分子时,需要根据Ct值绘制标准曲线,由于Ct值的细微变化会造成检测精确度降低。在快速qPCR中,由于扩增周期短,扩增效率容易受到影响,且反应体系小,荧光信号检测的较为困难,因此得到的扩增曲线往往没有传统qPCR规则。对于需要分析扩增曲线Ct值的半定量应用,Ct值确定难度大,变化也大。因此快速PCR在核酸实时荧光半定量检测中仍然存在数据准确性的问题。

[0005] 数字PCR是在传统PCR技术上结合微流控技术发展而来的一种绝对定量的核酸检测技术,在疾病早期检测及个体化诊治方面有着巨大的应用前景。数字PCR是一种终点法检测技术,对扩增效率的依赖小,通过直接统计每个反应单元的阴阳性信号的数目来代表目标分子的拷贝数,无需标准曲线就可对目标分子精确检测,实现了目标分子的绝对定量分析。进一步的,其对低丰度样本的检测更是有着巨大的优势。目前对于数字PCR的研究主要集中在液滴生成/腔体制作上,对于数字PCR热循环过程研究较少,使得现在数字PCR的反应依旧采用传统的PCR仪器,整个实验时间可以长达一个多小时。对于数字PCR来说,长时间的热循环反应容易导致液滴破裂以及反应液蒸干等情况。

[0006] 因此考虑PCR的反应时间以及检测精度的问题,发展快速数字PCR技术,缩短数字PCR反应时间,提高数字PCR的检测效率,实现核酸的快速绝对定量检测显得尤为重要。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统及其应用,从而解决现有技术中数字PCR系统反应时间过长、检测效率较低以及检测精度不高的问题。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明采用以下技术方案:

[0009] 根据本发明的第一方面,提供一种用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统,包括:样本反应芯片,所述样本反应芯片上包括若干相互独立的毫米尺度的样本存储腔,单个所述样本存储腔内可容纳若干个微米级样本反应单元;用于对所述样本反应芯片进行加热的微加热盘阵列,所述微加热盘阵列上包括若干相互独立的毫米尺度的微加热盘,一个微加热盘仅仅对应和加热一个样本存储腔;以及与所述微加热盘连接实现温度控制的温控系统;其中,单个样本存储腔与对应的单个微加热盘共同组成一个快速数字PCR检测单元,通过多个所述快速数字PCR检测单元组成的这样一种数字PCR系统可实现大于 $50^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的温度切换速率,以及小于20s的单次热循环时间。

[0010] 所述样本反应芯片还具备将样本分割成微米级样本反应单元的功能。

[0011] 优选地,样本反应芯片中的单个样本存储腔内可容纳2000~10000个微米级样本反应单元。

[0012] 进一步优选地,样本存储腔内的样本反应单元为油包水液滴形式,该油包水液滴的直径为20~100 μm 。

[0013] 优选地,所述样本反应芯片还具有液滴分裂功能,所述液滴分裂功能通过管径逐级变窄的微流控管路实现,使得进入到每个样本存储腔的液滴数量基本相等。

[0014] 具体地,样本进样管和油相进样管汇集成一根主微流控管路后,所述主微流控管路一分为二形成两根二级微流控管路,每根二级微流控管路再分别一分为二形成两根三级微流控管路,以此类推,直至连接到每个样本存储腔。优选地,每个下一级管道的直径为相邻上一级管道直径的60~70%,65%~70%更佳,使得液滴在从上一级管道进入下一级管道时会被均匀的分成两个较小的液滴,直至液滴进入样本存储腔中。

[0015] 根据本发明,该管径逐级变窄的微流控管路设计的优点包括:1)可以提高液滴生成频率,缩短微流控操作时间,使整个微流控操作在5分钟之内就可以完成;2)更是保证了每个样本存储腔中的液滴数目和尺寸都是相等的;3)这种管道逐级变窄的设计还增加了管道的流阻,随着管径逐渐变窄,流阻会越来越大,从而防止进入样本存储腔后的液滴在后续加热过程中流回管道,以及各个样本存储腔之间的液滴流动这类现象。

[0016] 还优选地,样本存储腔内的样本反应单元可以为微腔形式,微腔直径为20~100 μm ,高度在30~100 μm 。

[0017] 每个微加热盘集成一个测温电极和一个加热电极,所述温控系统分别与所述测温电极和加热电极连接以实现与所述微加热盘的温度控制。

[0018] 优选地,所述微加热盘阵列包括通过刻蚀,腐蚀等方法制备的若干微加热盘,每个微加热盘分别通过两侧不同的窄梁同主体框架连接,这种短而窄的连接梁保证了加热盘的强度,同时也实现了微加热盘上独立且均匀的样本加热区域。可选地,该窄梁的尺寸分别为300 $\mu\text{m}\times 350\mu\text{m}$ 和300 $\mu\text{m}\times 600\mu\text{m}$ 。

[0019] 还优选地,每个微加热盘集成一个测温电极和一个加热电极,测温电极和加热电极分别通过微加热盘两侧的窄梁与微加热盘连通,使得加热电极线路和测温电极线路之间

相互分隔,降低串扰的可能,同时该设计简化了加热阵列的线路布置,在拥有大于等于八个加热盘数量时有着较大的布线优势,进一步的,该设计缩短了焊盘与加热电极,测温电极之间的距离,降低了系统额外的热量消耗。

[0020] 优选地,所述样本反应芯片由选自聚二甲基硅氧烷、环氧树脂、玻璃、石英玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯等材料中的任意一种制成或者多种材料复合而成。

[0021] 优选地,样本反应芯片由至少两种材料通过等离子键合,超声波焊接,化学键合等方式相接复合。

[0022] 优选地,所述微加热盘阵列的基底由选自硅、玻璃、石英玻璃等材料中的任意一种材料或者多种材料制成,所述测温电极和加热电极分别由铂,金,银,铜,铬,钛等材料中的任意一种或者多种材料制成。

[0023] 根据本发明的一个优选实施方式,温度控制系统包括:基于恒流源的测温模块,用于数据采集和通信的数据采集卡,用于数据处理的上位机,PWM电子开关以及提供加热功率的执行器,比如12V电源。

[0024] 优选地,所述样本反应芯片还包含介质层,所述微加热盘通过所述介质层加热样本存储腔中的样本,所述微加热盘不与样本直接接触。优选地,该介质层的厚度在100~300 μm 。

[0025] 所述介质层可由选自聚二甲基硅氧烷、环氧树脂、玻璃、石英玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯等材料中的任意一种制成或者多种材料复合而成。

[0026] 应当理解的是,样本反应芯片上样本存储腔的数量可以是任何适当的数量,也可以是任何适当的排列方式。

[0027] 还应当理解的是,微加热盘阵列上微加热盘的数量与样本反应芯片上样本存储腔的数量相等,排列方式也基本相同,换句话说,微加热盘阵列上微加热盘的数量以及排列方式根据样本反应芯片上的样本存储腔而定。

[0028] 根据本发明的第二方面,还提供一种如上所述的快速数字PCR系统作为普适平台在核酸绝对定量领域中的应用,包括但不限于核酸(DNA和RNA等)靶标分子绝对定量检测,核酸突变绝对定量检测,核酸甲基化绝对定量检测,拷贝数变异绝对定量检测,测序精准建库等核酸绝对定量检测在科学研究,医学检验,食品检测,环境监测,国防安全等领域的应用。

[0029] 根据本发明的一个优选实施方式,该应用包括以下步骤:1)提供一种如上所述的数字PCR系统;2)核酸样本通过微流控技术分散成均一的微米级样本反应单元,并分配到各个毫米级样本存储腔中;3)一个样本存储腔与相应的一个微加热盘组成一个快速数字PCR检测单元,在温控系统的作用下,每个样本存储腔通过相应的微加热盘加热实现快速数字PCR;以及4)通过统计每个存储腔内带有荧光信号的样本单元个数即可确定目标核酸初始浓度的准确值,实现对核酸样本的绝对定量。

[0030] 根据本发明提供的数字PCR系统可以实现大于20 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的PCR升降温速率,其中变性时间为1s~5s,变性温度为90~98 $^{\circ}\text{C}$,延伸时间为5s~15s,延伸温度为48~72 $^{\circ}\text{C}$,单个循环时间少于20s,40个循环的总时间少于15分钟。

[0031] 优选地,提供50 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 或更大的PCR加热速率以及30 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 或更大的降温速率。

[0032] 特别优选地,检测单元可以实现大于100 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的升温速度和大于50 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的降温速

度,PCR反应变性时间小于2s,延伸时间小于8s,单个循环时间少于10s。

[0033] 根据本发明,样本反应芯片在进行热循环时,油相进样口始终保持正向压力,保证腔内压力平衡。

[0034] 根据本发明提供的数字PCR系统,样本反应芯片包含多个毫米级样本存储腔,每个样本存储腔可容纳2000~10000个微米级样本反应单元,微加热盘阵列由具有良好导热性的基底材料以及金属材质电极组成,单个微加热盘尺寸在毫米级。其中,单个样本存储腔与对应的单个微加热盘共同组成一个快速数字PCR检测单元,在温控系统的作用下,单个样本存储腔通过相应的微加热盘加热实现快速数字PCR。由于该数字PCR系统的各个检测单元具有系统热容小的特点,并且各个微加热盘之间相互独立,因此根据本发明提供的数字PCR系统具有胜过现有数字PCR系统的各种优点,包括在PCR期间快速的升降温速率以及准确的热控制,甚至可实现大于100°C/s的升温速度和大于50°C/s的降温速度,PCR反应变性时间小于2s,延伸时间小于8s,单个循环时间少于10s,从而实现数字PCR核酸高特异性快速绝对定量检测。

[0035] 总之,本发明提供了一种反应时间大大缩短、检测效率提高的用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统及其应用。

附图说明

[0036] 图1是根据本发明的一个优选实施例的数字PCR系统中的样本反应芯片的俯视图;

[0037] 图2是如图1所示的样本反应芯片的剖视图;

[0038] 图3是根据该优选实施例的数字PCR系统的微加热盘阵列的俯视图;

[0039] 图4是根据该优选实施例的数字PCR系统的整体结构示意图;

[0040] 图5是根据本发明提供的数字PCR系统在对人脐静脉内皮细胞cDNA样本中GAPDH基因的扩增和检测的应用中的温度循环示意图;

[0041] 图6是根据该优选实施例对人脐静脉内皮细胞cDNA样本中GAPDH基因的扩增和检测的应用中在自然光下观察得到的结果图;

[0042] 图7是根据该优选实施例对人脐静脉内皮细胞cDNA样本中GAPDH基因的扩增和检测的应用中在荧光下观察得到的局部结果图;

[0043] 图8(a)、图8(b)、图8(c)、图8(d)是根据该优选实施例对不同浓度样本中GAPDH基因拷贝数检测的局部结果图。

具体实施方式

[0044] 以下结合具体实施例,对本发明做进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限制本发明的范围。

[0045] 根据本发明的一个优选实施例,提供一种数字PCR系统,该系统主要包括:样本反应芯片1,微加热盘阵列2以及温控系统3。

[0046] 如图1所示,样本反应芯片1上包括八个相互独立的样本存储腔11,一个样本进样口12,一个油相进样口13以及连接前述结构的微流控管道15,根据该优选实施例,这八个相互独立的样本存储腔11分为两列整齐排列在样本反应芯片1上,本实施例中单个样本存储腔11的尺寸为2mm×2mm,实际也可优选为2~5mm×2~5mm。该微流控管道15的优选的排布

路线如图中所示,样本进样口12所在的样本进样管、油相进样口13所在的油相进样管汇集一根主微流控管路后,该主微流控管路一分为二形成两根二级微流控管路,每根二级微流控管路再分别一分为二形成两根三级微流控管路,以此类推,直至连接到每个样本存储腔,其中,每个下一级管道的直径为相邻上一级管道直径的70%。

[0047] 应当理解的是,样本存储腔11的数量及其排列方式,以及微流控管道15的排列方式并不仅限于图1所示,此处仅作为举例而非限制,实际也可以是其他任何适当的数量,以及其他任何适当的排列方式。根据本发明,单个样本存储腔11的尺寸优选为毫米尺度。

[0048] 根据该优选实施例,当核酸样本经样本进样口12注入,受到来自油相进样口13的油相的剪切生成大尺寸液滴,每经过一次更窄微流控管道的分级,较大尺寸的液滴将被均匀的分成两个较小的液滴,依次类推,核酸样本最终被均匀分配至各个样本存储腔11中,形成若干个微米级样本反应单元。优选地,单个样本存储腔内包含2000~10000个微米级样本反应单元。

[0049] 还应当理解的是,样本的分散形式并不仅限于本实施例所示的油包水液滴形式,实际也可以是微腔形式。

[0050] 如图2所示,该样本反应芯片1由聚二甲基硅氧烷(PDMS)芯片16和玻璃基底17通过等离子体键合的方式键合而成。

[0051] 但是应当理解的是,该样本反应芯片1可以由选自聚二甲基硅氧烷、环氧树脂、玻璃、石英玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯中的任意一种材料制成或者多种材料复合制成。还优选地,该样本反应芯片1由至少两种材料通过等离子键合、超声波焊接、化学键合等方式中的一种相接复合。

[0052] 如图3所示,该微加热盘阵列2采用刻蚀工艺将硅片刻穿,刻出八个相互独立的微加热盘21,这八个微加热盘21分为两列整齐地排列,一个微加热盘21仅仅对应和加热一个样本存储腔11,因此该微加热盘21的数量与样本反应芯片1上样本存储腔11的数量相等,排列方式也基本相同。但是应当理解的是,微加热盘21的数量以及排列方式并不仅限于图3所示,此处仅作为举例而非限制,实际上,该微加热盘21的数量以及排列方式根据样本反应芯片1上的样本存储腔11而定。

[0053] 其中,微加热盘21还通过两侧的窄梁24,24'同主体框架连接,这种短而窄的连接梁保证了加热盘的强度,同时也实现微加热盘上独立且均匀的样本加热区域。优选地,这两侧的窄梁24,24'尺寸分别为 $300\mu\text{m}\times 350\mu\text{m}$ 和 $300\mu\text{m}\times 600\mu\text{m}$ 。每个微加热盘21还分别通过窄梁24,24'连接一个测温电极22和一个加热电极23。

[0054] 根据该优选实施例,微加热盘21两两之间采用镂空处理,如图所示,微加热盘21与微加热盘21'之间为镂空区域25。在该优选实施例中,加热电极23还以环形布置。通过该环形加热电极23以及镂空处理充分保证了各微加热盘21之间测温和加热过程相互独立,串扰少,从而实现单个微加热盘21对单个样本存储腔11独立而准确的加热。

[0055] 根据本发明的优选实施例,微加热盘阵列2的基底由选自硅、玻璃、石英玻璃中的任意一种材料或者多种材料制成,测温电极22和加热电极23由选自铂,金,银,铜,铬,钛中的任意一种材料或者多种材料制成。

[0056] 根据本发明的一个优选实施例,样本反应芯片1还包含介质层,微加热盘21通过介质层加热样本存储腔11中的样本,微加热盘21不与样本直接接触。

[0057] 如图4所示,根据本实施例提供的数字PCR系统中,温度控制系统3主要由恒流源31,数据采集卡32,上位机33,PWM电子开关34以及执行器35组成,这里,执行器可选地是12V电源。该温控系统3的工作原理为:采用恒流源31作为测温电路,利用数据采集卡32读取测温电极22端的电压并将电压信号传输至上位机33端,上位机33处理电压信号,并换算成实时的温度,同时利用PID控制算法得出调节参数,并生成PWM信号,PWM信号通过PWM电子开关34来调节执行器35对加热电极的功率输出,从而实现对本发明提供的数字PCR系统对样本反应芯片1的加热。

[0058] 根据该优选实施例提供的数字PCR系统,单个样本存储腔11和与其对应的单个微加热盘21共同组成一个快速数字PCR检测单元,在温控系统3的作用下,单个样本存储腔11通过相应的单个微加热盘21加热实现快速温度变化。由于该数字PCR系统的各个检测单元具有系统热容小的特点,并且各个微加热盘21之间相互独立,因此根据本发明提供的数字PCR系统具有胜过当前数字PCR系统的各种优点,比如,在PCR期间快速的升降温速率以及准确的热控制,在本实施例中温度切换和稳定时间小于2s,提供至少大约50°C/s或更大的PCR加热速率以及30°C/s或更大的降温速率,单个数字PCR循环时间少于20s,总数字PCR循环时间少于15分钟。

[0059] 根据本发明的一个优选实施例,将上述数字PCR系统应用于人脐静脉内皮细胞cDNA中GAPDH基因的扩增和检测。其中,该数字PCR扩增体系为:

试剂	体积
Takara Premix Ex Taq	12.5μL
Forward Primer (10μM)	0.5μL
Reverse Primer (10μM)	0.5μL
FAM-荧光探针	0.5μL
cDNA样本	2.0μL
水	9.0μL

[0061] 快速数字PCR程序如图5所示,95°C热启动30s,40个循环,每个循环包括95°C变性反应3s,60°C退火延伸反应15s,扩增总耗时12min 30s。

[0062] 使用引物序列如下:

[0063] F:5' GGGAAACTGTGGCGTGAT3' (SEQ ID NO.1)

[0064] R:5' GAGTGGGTGTCGCTGTTGA3' (SEQ ID NO.2)

[0065] 扩增模板序列如SEQ ID NO.3所示。

[0066] 结果统计:将完成扩增的样本反应芯片放置显微镜下观察,采用倒置显微镜的FAM通道,分别在自然光(图6)和荧光下(图7)统计总液滴数N和具有荧光信号的液滴数n,即可通过泊松分布得到样本中GAPDH基因的拷贝数k:

$$[0067] \quad k = -N \ln \left(1 - \frac{n}{N} \right)$$

[0068] 进一步的,我们分别采用该系统对已知浓度梯度的不同cDNA样本中GAPDH基因的拷贝数做了检测,检测结果如图8(a)、图8(b)、图8(c)、图8(d)中所示,检测到的阳性液滴数计算得到的样本中GAPDH拷贝数同已知样本浓度之间有着良好的对应关系,该结果表明根据本发明提供的这样一种数字PCR方法在实际应用中具有可靠性。

[0069] 以上所述的,仅为本发明的较佳实施例,并非用以限定本发明的范围,由于本应用

实施例所采用的方案与权利要求中其他应用有着技术相通性,本发明的上述实施例还可以做出如权利要求中所述各种应用变化。凡是依据本发明申请的权利要求书及说明书内容所作的简单、等效变化与修饰,皆落入本发明专利的权利要求保护范围。本发明未详尽描述的均为常规技术内容。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国科学院上海微系统与信息技术研究所
- [0003] <120> 一种用于核酸快速绝对定量的数字PCR系统及其应用
- [0004] <160> 3
- [0005] <210> 1
- [0006] <211> 18
- [0007] <212> DNA
- [0008] <213> 人工序列
- [0009] <400> 1
- [0010] gggaaactgt ggcgtgat 18
- [0011] <210> 2
- [0012] <211> 18
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <400> 2
- [0016] gagtgggtgt cgctgttga 19
- [0017] <210> 3
- [0018] <211> 299
- [0019] <212> DNA
- [0020] <213> GAPDH基因
- [0021] <400> 3
- [0022] gggaaactgt ggcgtgatgg ccgcggggct ctccagaaca tcatccctgc ctctactggc 60
- [0023] gctgccaagg ctgtgggcaa ggtcatccct gagctgaacg ggaagctcac tggcatggcc 120
- [0024] ttccgtgtcc cactgcca cgtgtcagtg gtggacctga cctgccgtct agaaaaacct 180
- [0025] gccaaatag atgacatcaa gaaggtggtg aagcaggcgt cggagggccc cctcaagggc 240
- [0026] atcctgggct aactgagca ccaggtggtc tcctctgact tcaacagcga cacccactc 299

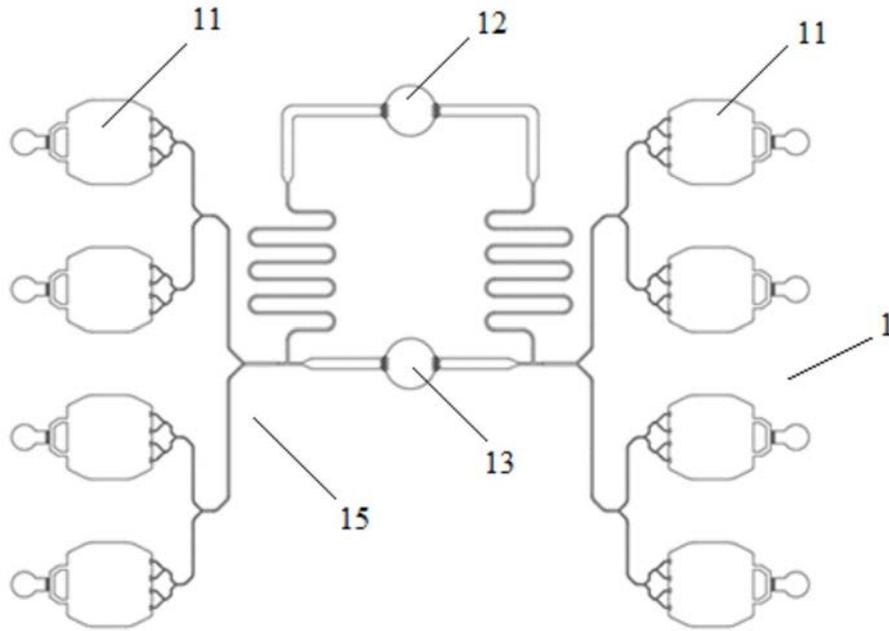


图1

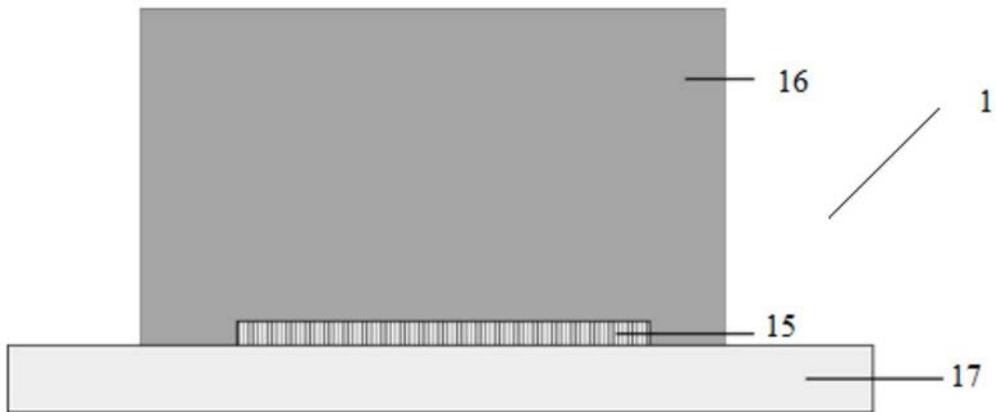


图2

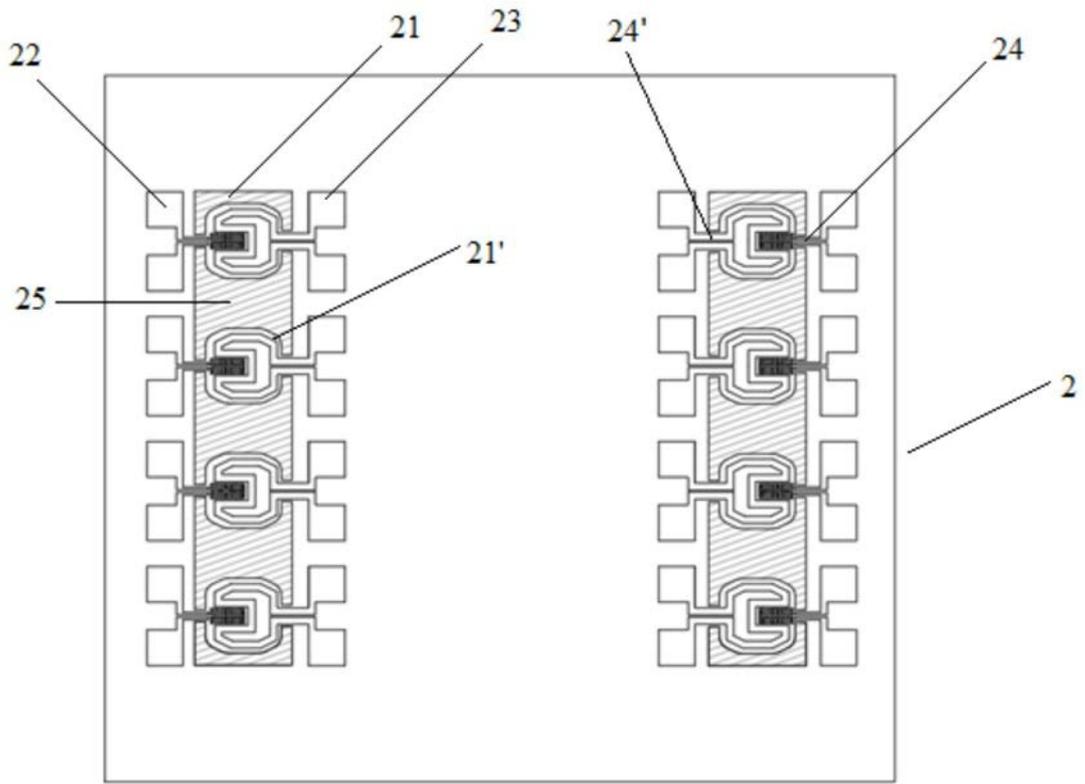


图3

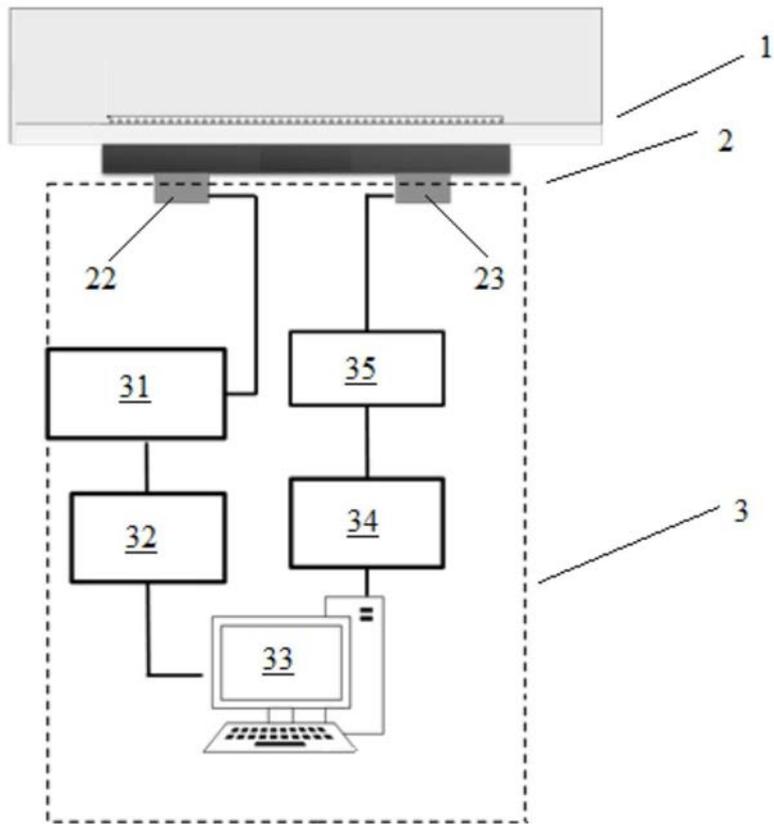


图4

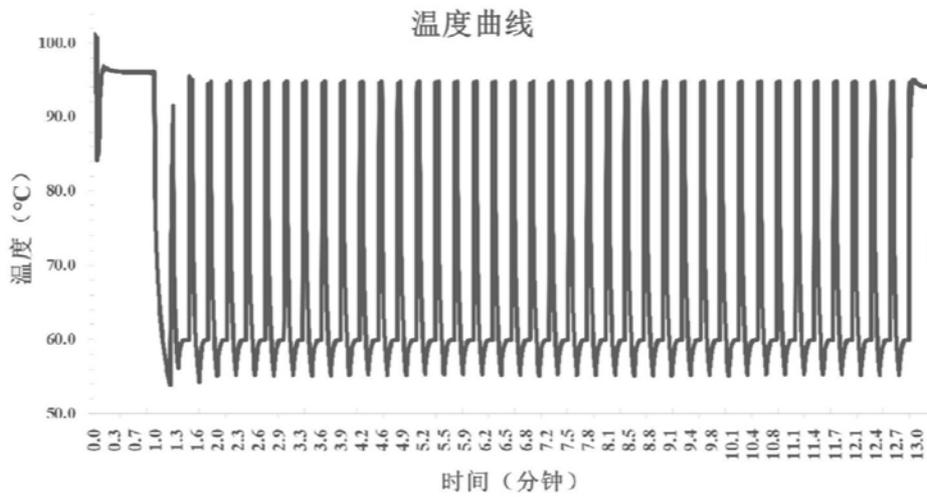


图5

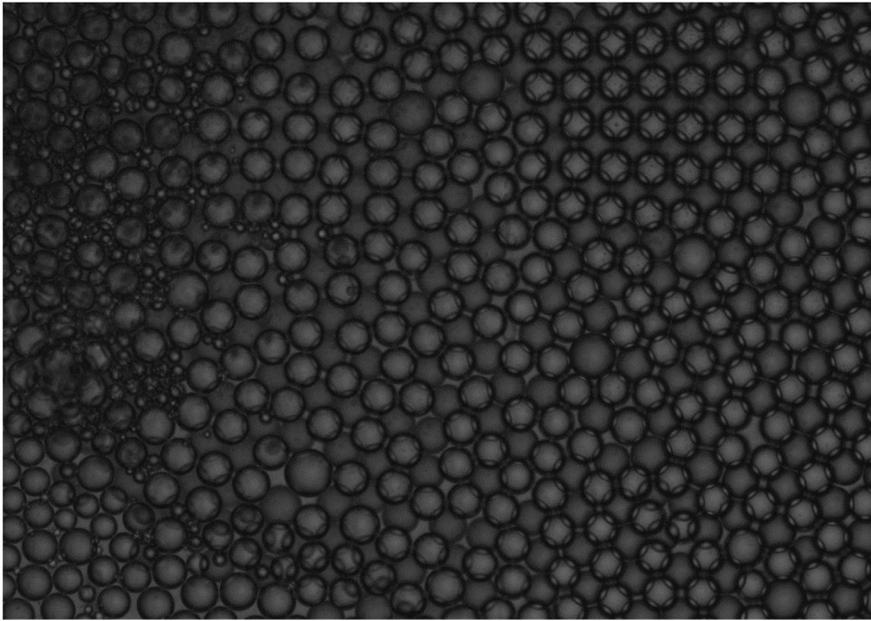


图6

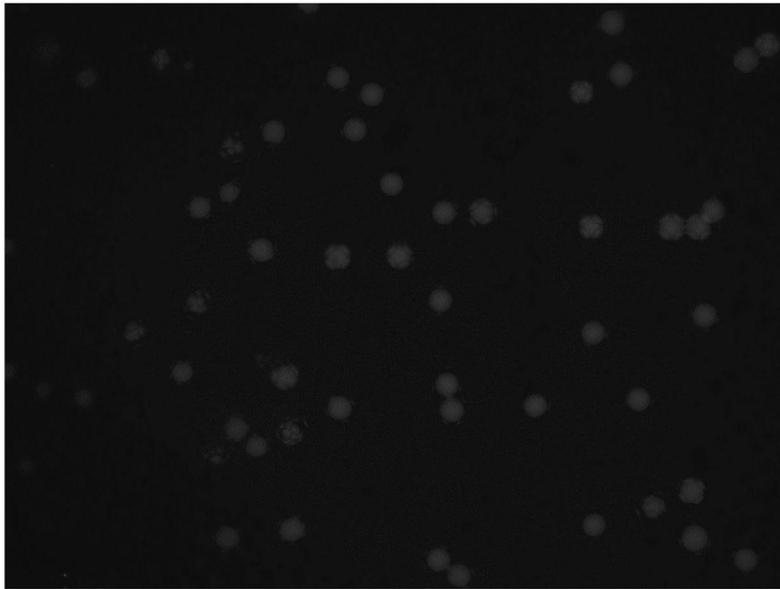
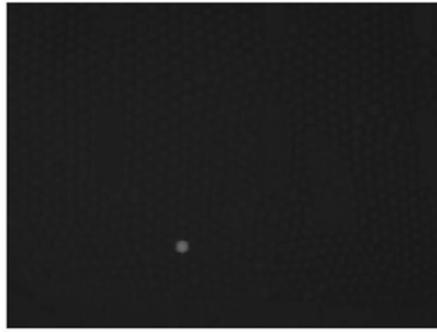
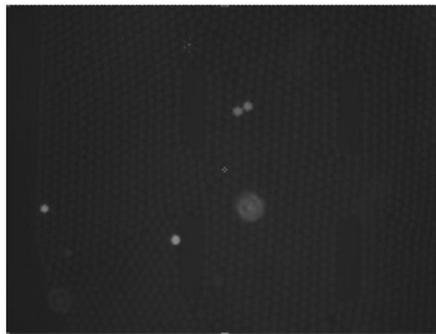


图7



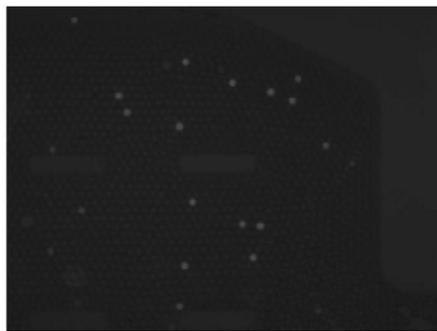
10¹ 拷贝/微升

图8 (a)



10² 拷贝/微升

图8 (b)



10³ 拷贝/微升

图8 (c)



10⁴ 拷贝/微升

图8 (d)