

•综述•

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2017.09.02

数字 PCR 及其在现代医学分子诊断中的应用

胡思宏, 鲍登克*, 万绍贵*

(河南大学肿瘤标志物与液体活检实验室, 河南 开封 475000)

摘要 数字 PCR (digital PCR, dPCR) 技术被认为是精确定量核酸分子的全新技术手段, 因为具有较高的灵敏度和特异性等特点而得到迅速发展。数字 PCR 在临床上的多个领域展现出良好的应用前景, 比如肿瘤液体活检、器官移植损伤评估、无创产前筛查、病原微生物分子诊断以及二代测序文库质控和结果验证等。本文就数字 PCR 在上述领域中的应用研究及其进展进行综述。

关键词 数字 PCR; 液体活检; 器官移植; 无创产前筛查; 病原微生物分子诊断; 二代测序
中图分类号 Q7

The Principle of Digital PCR and Its Applications in Current Molecular Diagnosis

HU Si-Hong, BAO Deng-Ke*, WAN Shao-Gui*

(Key Laboratory of Cancer Biomarkers and Liquid Biopsy, Henan University, Kaifeng 475000, Henan, China)

Abstract The novel developed digital PCR (dPCR) has shown promise as a precision nucleic acid quantification technology in medical diagnostic fields because of its high sensitivity and specificity. dPCR were applied to many fields, such as cancer liquid biopsy, donor organ damage assessment, noninvasive prenatal testing, molecular diagnosis for infection diseases, and next generation sequencing library quality control. Here we reviewed the current progression of dPCR applications in the above areas.

Key words digital PCR (dPCR); liquid biopsy; organ transplant; noninvasive prenatal testing; molecular diagnosis for infection diseases; next generation sequencing

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是生物体外 DNA 复制技术, 即在 DNA 聚合酶的作用下特异性合成靶标 DNA 片段, 所得 PCR 产物可用于下游多种分析和应用。该方法是最基础的分子生物学实验手段。PCR 技术发展迅速, 至今已从“第一代 PCR”发展到“第三代 PCR”。“第一代 PCR”通常采用凝胶电泳的方式分析 PCR 产物, 存在检测限过低、操作繁琐、适用于定性研究等局限; “第二代 PCR”是实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR), 其定量依赖标准曲线, 有耐受性差等缺点^[1]; “第三代 PCR”是基于分割体系的绝对定量 PCR, 也称数字 PCR (digital PCR, dPCR)。数字 PCR 技术已经在痕量核酸分子检测、稀有突变体检测和拷贝数变异等方面展现出高灵敏度和精确性等优势, 在医学分子诊断领域具有良好的应用前景^[2]。

1 数字 PCR 的基本原理与优势

1.1 数字 PCR 的基本原理

数字 PCR (dPCR) 是将含有核酸分子的 PCR 反应体系“分割”成数量众多的、纳升级的反应单元,

收稿日期: 2017-02-26; 修回日期: 2017-04-21; 接受日期: 2017-05-08
国家自然科学基金 (No. U1604167) 和河南省高校科技创新人才支持计划 (No. 15HASTIT035) 资助

* 通讯作者 Tel: 0371-23880602, E-mail: bdkmydy12004@126.com; Tel: 0371-23880602, E-mail: wansg@henu.edu.cn.

Received: February 26, 2017; Revised: April 21, 2017; Accepted: May 8, 2017

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. U1604167) and Program for Science and Technology Innovation Talents in Universities of Henan Province (No. 15HASTIT035)

* Corresponding author Tel: 0371-23880602, E-mail: bdkmydy12004@126.com; Tel: 0371-23880602; E-mail: wansg@henu.edu.cn

核酸分子在每个反应单元中随机分布,每个反应单元中包含 0、1 或者多个目标核酸分子;然后进行 PCR 扩增反应;PCR 扩增结束后,对每个反应单元的荧光信号进行计数统计和分析^[3]。有荧光信号的反应单元判读为 1,没有荧光信号的判读为 0,最终根据泊松分布原理及阳性反应单元的个数与比例,计算出目标 DNA 分子的起始拷贝数浓度。理论上,在目标 DNA 分子浓度极低、分割形成的反应单元数量足够多时,每个反应单元只含有 0 或者 1 个目标分子,则有荧光信号的反应单元数目等于目标 DNA 分子的拷贝数;但是通常情况下,每个反应单元可能包含 2 个或者 2 个以上的目标分子,所以数字 PCR 的数据处理需要采用泊松分布公式进行校正和计算。

1.2 数字 PCR 的优势

1.2.1 样本需求量低 数字 PCR 检测所需样本量低,在检测珍贵样本或者样本核酸存在降解时,数字 PCR 优势明显。目前,很多基因组研究方法,例如比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)芯片、二代测序(next generation sequencing, NGS)等,需要对有限的临床样本进行扩增,以保证达到实验样本量的要求。而数字 PCR 所需样本量低,避免预扩增带入的实验误差,使结果更加可靠。

1.2.2 高灵敏度和重复性 数字 PCR 处理技术将待检靶序列与大量的背景 DNA 分开,使得待检靶序列的相对含量增加,提高检测的灵敏度和重复性,而且避免非同源异质双链的形成^[4]。例如,在突变频率极低时,突变序列的扩增容易受到大量野生序列的干扰,降低实验结果准确性,而数字 PCR 则降低背景序列的干扰。

1.2.3 PCR 抑制剂耐受性强 反应体系分配的过程中,PCR 反应抑制物被均匀分配到每个反应单元,降低了抑制剂对反应的干扰。所以,数字 PCR 具有对抑制剂耐受性强的特点,很适合血样、石蜡包被的肿瘤组织、痰液等复杂样品中 DNA 绝对定量。

1.2.4 绝对定量 数字 PCR 采用终点荧光检测和分子计数方式进行定量,不需要构建标准曲线和一致的扩增效率,摒弃通过 C_q 值间接定量的方式。最终,通过阳性反应单元比例,以及泊松分布公式计算,即可得出样本起始 DNA 含量,实现真正意义上的绝对定量^[5]。

2 数字 PCR 流程与基本装置

根据反应混合液的分割方式不同,数字 PCR 主

要分为 2 大类:微流控芯片式数字 PCR(chip digital PCR, cdPCR) 和微滴式数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)。

2.1 微流控芯片式数字 PCR

微流控芯片数字 PCR(cdPCR) 是通过微流控技术,将反应液均匀导入到芯片微池或者通孔中进行 PCR 反应,反应结束后用荧光成像仪或者荧光倒置显微镜检测荧光结果。然后,用图像处理软件分析,最终得到目标序列拷贝数。芯片类型有集成微泵阀式芯片、阵列微池式芯片和滑片式芯片。集成微泵阀式芯片是以聚二甲基硅氧烷芯片(polydimethylsiloxane, PDMS) 为材料,采用多层软刻蚀技术(multilayer soft lithography, MSL) 加工,将微流控通道、阀门和反应仓集成在一张芯片上,通过精确地控制微泵阀的开启与关闭,可迅速将反应液分配到若干独立反应单元^[6]。阵列微池式芯片是在芯片上刻蚀微池阵列,反应液由进样孔直接分配进入各反应微池^[7]。滑片式芯片具有上下两片玻璃芯片,滑动芯片可以把样本溶液从流体通道分配到含有反应单元的玻璃芯片上^[8]。

芯片式数字 PCR 有生成微滴体积均一、避免管道造成的样本损失、结果稳定等优点。商业化芯片式 PCR 有 BioMark 和 QuantStudio3D 两种系统。BioMark 系统采用集成微泵阀式芯片,每张芯片上集成有相互独立的 1 万 ~ 4 万个反应仓;QuantStudio3D 系统采用阵列微池式芯片,每张芯片上集成有 2 万个通孔^[9]。典型商业化芯片式数字 PCR 工作流程如 Fig. 1。

2.2 微滴式数字 PCR

微滴式数字 PCR(ddPCR) 采用油包水乳化微滴技术与微流体技术对样品进行微滴化处理。先用微滴发生器将样本中核酸分子随机分配到大量独立的油包水微滴中,每个微滴均进行独立的 PCR 反应,然后,用双光路检测系统逐个读取和分析每个微滴的荧光信号。微滴发生芯片有十字形^[10]、T 形^[11]、Y 形^[12]等多种微通道结构。典型的商业化微滴式数字 PCR 工作流程如 Fig. 2 所示。

微滴式数字 PCR 的微滴发生卡大多只有一层结构,加工尺度在微米级,比芯片式数字 PCR 成本低,但是存在微滴生成大小不均一的问题。所以,商业化微滴式数字 PCR 采取了标准化措施,即在生成的总微滴中挑选大小均一的微滴进行荧光信号读取,然后再用泊松分布公式进行校正和计算。商业化微滴式数字 PCR 主要有 QX100/200 和 Rain Drop

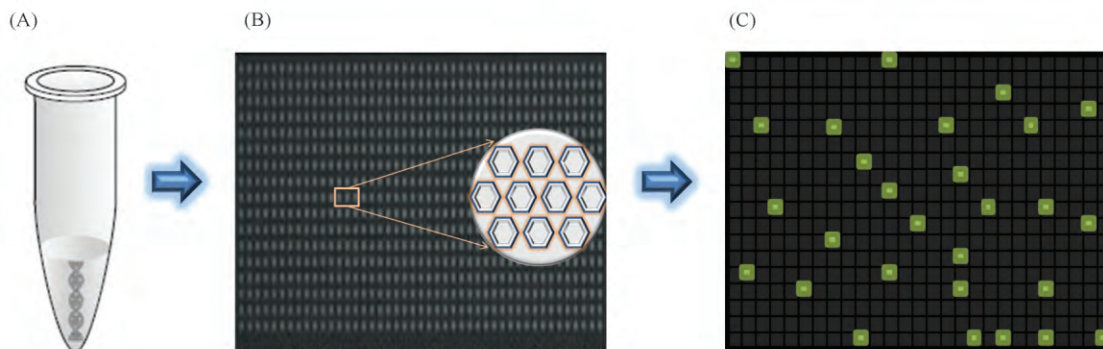


Fig.1 Overview of Chip digital PCR workflow (A) dPCR reactions were prepared in a tube. (B) dPCR reactions were partitioned into individual chamber by microfluidic device for PCR amplification. Each reaction chamber was approximately 0.6 nL in volume. (C) The reaction chambers with green color were assigned as positive reaction containing target template

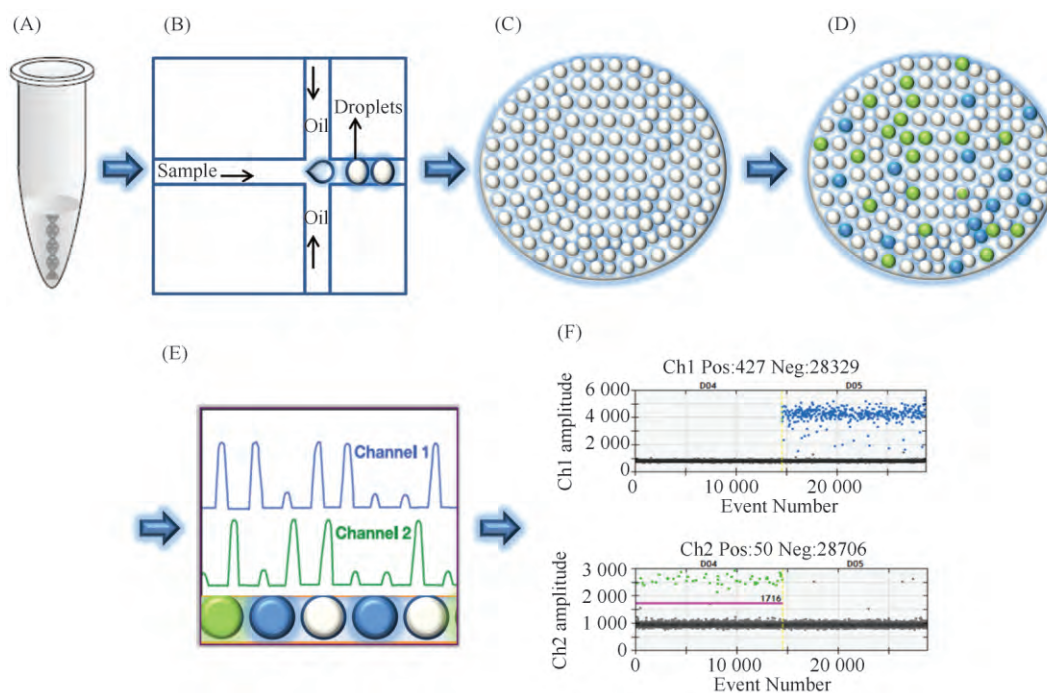


Fig.2 Overview of droplet digital PCR workflow (A) ddPCR reactions were prepared in a tube. (B) The ddPCR reactions were partitioned into individual droplet by droplet generator. (C) The ddPCR reactions in droplets were transferred to a 96-well plate for PCR amplification. (D) Droplets with green or blue color were assigned as positive reaction. Droplets in gray color were assigned as negative. (E) Fluorescence was measured for each droplet by two channels. (F) An example of ddPCR resulted in two fluorescent probes

系统。QX100/200 系统可将每份反应体系分割成 2 万个微滴,Rain Drop 系统可以分割生成 100 万至 1 000 万个微滴的反应乳液^[13]。

3 数字 PCR 的应用

3.1 肿瘤液体活检

筛查患者外周血中特异性突变等分子标志物,以监测肿瘤的发展、复发和稳定性是临床肿瘤学的重要发展方向。尤其在肿瘤的个性化治疗过程中,

由于肿瘤组织呈现异质性,肿瘤的基因表达是动态变化的,而对肿瘤组织重复取样进行实时监控难以实现。所以,通过检测肿瘤患者外周血,对进入外周血中游离的循环肿瘤 DNA (cell-free circulating tumor DNA, ctDNA) 的液体活检是前景广阔的技术手段^[14]。循环肿瘤 DNA 含量低并且高度片段化,对检测方法提出了更高要求。现有的检测方法,比如定量 PCR、毛细管电泳 (capillary electrophoresis) 及二代测序技术都较容易受到背景 DNA 的干扰,使

得检测灵敏度和精确度达不到精准定量的要求。通常,毛细管电泳和定量 PCR 的检测灵敏度在 0.1% ~ 1%^[15],二代测序的灵敏度在 0.1% ~ 10%^[2],而数字 PCR 可到 0.0001% ~ 0.001%^[16]。目前,已经有大量的文献和实例报道了数字 PCR 技术成功运用于 *EGFR*^[17]、*KARS*^[18]、*BRAF*^[19]、*PIK3A*^[20] 等各种癌基因的检测。以 86 位没有接受抑制剂治疗的晚期非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者为研究对象,用 dPCR 检测血浆中循环肿瘤 DNA 的 *EGFR*L858R 突变和 *EGFR* exon19 缺失,显示液态活检相比于组织活检,灵敏度大于 80%,特异性大于 95%^[3]。以 75 个胰腺癌患者为研究对象,通过用 dPCR 对 *KRAS* G12V、G12D、G12R 三个位点检测分析,表明以循环肿瘤 DNA 为研究对象的液体活检,能够克服组织样品的取样部位限制而导致的漏检^[21]。

3.2 器官移植损伤评估

器官移植后出现器官移植排斥反应。肝移植患者在 3 年内出现排斥反应几率为 22%,心和肺移植接近 50%^[22]。常规检测器官移植排斥反应的方法,是监测患者血液中胆红素、天冬氨酸氨基转移酶、肌酸酐水平^[23]。传统方法不能及时评估早期器官移植损伤,比如当检测出肾移植患者血清中肌酸酐含量升高时,大约 50% 的移植器官已经丧失功能^[22]。在接受器官移植手术后,患者需要使用各种免疫抑制剂 (immunosuppressive drugs, ISDs) 来预防术后器官移植排斥的发生。由于缺乏高效的药物治疗监控 (therapeutic drug monitoring, TDM) 技术,难以达到个性化用药。目前,已经开发出一种全新的检测技术,即通过检测来源于移植器官的游离 DNA (graft-derived circulating cell-free DNA, GcfDNA) 作为器官移植排斥反应的早期分子标志物。相比于高通量测序, dPCR 能够更快检测出 GcfDNA 的含量,而且不需要供体的 DNA,结果灵敏且准确^[22]。Beck 等^[24]用 dPCR 建立快速经济的检测 GcfDNA 的方法,选取有用的异源 SNP 位点和 41 个水解探针进行定量实验,检测出稳定肝移植患者体内 GcfDNA 的含量小于 6.8%,稳定肾移植患者小于 2.5%,心移植小于 3.4%。Oellerich 等^[25]采用 dPCR 检测用药患者体内 GcfDNA 含量,进而判断在肝移植中最低的有效免疫抑制剂使用量,实验结果确定免疫抑制剂-他克莫司 (tacrolimus, tacro) 的最低有效量为 6.8 ng/μL。

3.3 无创产前诊断

产前检查是减少出生缺陷二级预防措施的重要手段。传统的产前诊断采用羊水穿刺和绒毛取样等侵入性取样方式,存在一定致流产机率。1997 年发现,母体血浆中存在胎儿游离 DNA (cell-free fetal DNA, cfDNA),研究者们开始无创产前诊断 (noninvasive prenatal testing, NIPT) 的研究热潮^[26]。胎儿游离 DNA 在母体血浆中含量非常少。有研究表明,胎儿游离 DNA 在母体血浆 DNA 占 10% ~ 20%^[27]。极低的胎儿游离 DNA 含量混杂于大量母体 DNA 中,这需要高灵敏度的分子诊断技术。dPCR 为无创产前诊断提供了新的技术思路 and 手段。只需克服母体血浆 DNA 背景的干扰,对其中含量极低的胎儿游离 DNA 标记进行精确定量分析,即可达到在基因水平对各种遗传疾病准确检测。染色体非整倍体、单基因遗传病、常染色体隐性遗传病是产前诊断的重要内容。El Khattabi 等^[28]建立 dPCR 与水解探针结合来定量血浆循环 DNA 含量的方法,以 213 名怀孕妇女的血浆 DNA 为材料进行研究。结果认为, dPCR 可以满足在无创产前诊断中对 21 三体综合征的筛查工作; Barrett 等^[29]研究 dPCR 在无创产前诊断中,检测镰状细胞性贫血 (sickle cell disease, SCD) 的可行性。结果显示, dPCR 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。dPCR 技术应用于无创产前诊断,准确性高于现行常规产前筛查技术,有成为产前常规检测技术的巨大潜力。

3.4 病原微生物分子诊断

以病毒为主的病原微生物的临床检测 (molecular diagnosis for infection diseases),目前最主要的方法之一是体外核酸扩增技术,其中荧光定量 PCR 应用最为广泛,可以检测多种临床样本。比如:脑脊液、血浆和各种组织样本。但是, qPCR 技术本身缺点明显:检测需要依赖建立标准曲线;不同来源或者不同批次的标准品或者对照之间存在误差,导致实验室内或者不同实验室之间的 qPCR 检测结果有差异。而且, qPCR 耐受性低,导致样本定量结果偏低,甚至出现假阴性结果。dPCR 能实现对病原微生物目标核酸的绝对定量,表现出较高的灵敏度和可重复性。Strain 等^[30]用 dPCR 对患者外周血样本中 HIV 病毒的 2-LTR (long terminal repeat, LTR) 进行检测,发现 dPCR 相对于 qPCR,对 2-LTR 检测的精确度提高 20 倍以上。目前广泛使用的 HHV-6 定量 PCR 无法有效区分 HHV-6 和染色体整

合的 HHV-6 (chromosomally integrated HHV-6 , ciHHV-6) 感染。Sedlak 等^[31]用 dPCR 检测经过荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization , FISH) 验证的 ciHHV-6 阳性的患者血浆样品 , 检测灵敏度达到 100% , 特异性达到 82% , 表现出临床检测 ciHHV-6 的巨大前景。

3.5 二代测序文库质控和测序结果验证

二代测序 (NGS) 拥有巨大的数据信息和并行样本处理能力 , 在临床领域拥有绝对优势。二代测序文库的精确定量是测序平台的准确上样和高效利用的关键步骤。dPCR 能对测序文库进行质控 , 通过精确控制测序文库上样量 , 实现不同文库的等摩尔混合 , 确保均匀测序 , 大大提高二代测序的使用效率与成功率。微滴式数字 PCR 的微滴扩增产物具有可回收特性 , 为测序文库的预扩增提供新手段 , 帮助减少扩增偏好性的不良影响 , 增加稀有序列的覆盖度。此外 , dPCR 平台能与二代测序平台进行数据间的验证。特别是单核苷酸多态性、稀有突变和拷贝数变异^[32]的测序结果验证 , dPCR 有巨大优势。Backenroth 等^[33]用 dPCR 对二代测序分析结果进行验证 , 在二代测序分析得到的 28 个 CNV 位点中 , 19 个位点得到 dPCR 确认。Laurie 等^[34]利用微滴荧光振幅与扩增子大小之间的关系 , 用 ddPCR 开发出新的分析系统——Quantisize , 用于同时测定未知可扩增 DNA 分子的绝对浓度和长度 , 可对二代测序文库进行质量控制。

4 问题与展望

数字 PCR 的高精确度、灵敏度和特异性为痕量核酸分子的准确定量技术带来革命性的进步 , 实现了真正意义上的绝对定量。但是 , 同时也需要克服一些现有的不足。首先 , 不同的数字 PCR 平台具有不同的体系分割数量。因此 , 对于跨平台之间数据的稳定性分析成为数字 PCR 数据分析的关键。如何提高不同类型仪器结果的可比性需要深入研究。其次 , 能否进一步扩展对非核酸物质的检测功能的开发 , 拓宽数字 PCR 的运用范围 , 值得研究者们思索。因为本身灵敏度很高 , 所以数字 PCR 的实验过程容易受到污染 , 尤其干扰对低丰度基因的检测 , 对于实验室的空气环境和操作者的专业技能要求很高。最后 , 数字 PCR 相对于荧光 PCR 成本高 , 如果能伴随技术的发展而大幅度降低实验成本 , 则有助于数字 PCR 的进一步推广和普及。

参考文献 (References)

- [1] Kim TG , Jeong SY , Cho KS. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil [J]. Appl Microbiol Biotechnol , 2014 , **98** (13) : 6105-6113
- [2] Day E , Dear PH , McCaughan F. Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine [J]. Methods , 2013 , **59** (1) : 101-107
- [3] Zhu G , Ye X , Dong Z , et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. J Mol Diagn , 2015 , **17** (3) : 265-272
- [4] Vargas DY , Kramer FR , Tyagi S , et al. Multiplex real-time PCR assays that measure the abundance of extremely rare mutations associated with cancer [J]. PLoS One , 2016 , **11** (5) : e0156546
- [5] Sanders R , Mason DJ , Foy CA , et al. Evaluation of digital pcr for absolute rna quantification [J]. PLoS One , 2013 , **8** (9) : e75296
- [6] Ramakrishnan R , Qin J , Jones RC , et al. Integrated fluidic circuits (IFCs) for digital PCR [J]. Methods Mol Biol , 2013 , **949** : 423-431
- [7] Watanabe R , Soga N , Fujita D , et al. Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity [J]. Nat Commun , 2014 , **5** : 4519
- [8] Song Q , Gao Y , Zhu Q , et al. A nanoliter self-priming compartmentalization chip for point-of-care digital PCR analysis [J]. Biomed Microdevices , 2015 , **17** (3) : 9970
- [9] 詹成 , 燕丽 , 王琳 , 等. 数字 PCR 技术的发展和应 [J]. 复旦学报 (Zhan C , Yan L , Wang L , et al. The development and application of digital PCR [J]. Fudan Univ J Med Sci) , 2015 , **42** (6) : 786-789
- [10] Shih SC , Gach PC , Sustarich J , et al. A droplet-to-digital (D2D) microfluidic device for single cell assays [J]. Lab Chip , 2015 , **15** (1) : 225-236
- [11] Shuga J , Zeng Y , Novak R , et al. Single molecule quantitation and sequencing of rare translocations using microfluidic nested digital PCR [J]. Nucleic Acids Res , 2013 , **41** (16) : e159
- [12] Giuffrida MC , Zanolini LM , D'Agata R , et al. Isothermal circular-strand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices [J]. Anal Bioanal Chem , 2015 , **407** (6) : 1533-1543
- [13] 王琦 , 范颖. 微滴式数字 PCR 技术进展 [J]. 中国医学前沿杂志 (Wang Q , Fan Y. The development of droplet digital PCR [J]. Chin J Front Med Sci) , 2016 , **8** (11) : 15-19
- [14] Gevensleben H , Garcia-Murillas I , Graeser MK , et al. Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR [J]. Clin Cancer Res , 2013 , **19** (12) : 3276-3284
- [15] Barakat FH , Luthra R , Yin CC , et al. Detection of nucleophosmin 1 mutations by quantitative real-time polymerase chain reaction versus capillary electrophoresis: a comparative study [J]. Arch Pathol Lab Med , 2011 , **135** (8) : 994-1000
- [16] Deng X , Custer BS , Busch MP , et al. Simultaneous estimation of detection sensitivity and absolute copy number from digital PCR serial dilution [J]. Comput Biol Chem , 2017 , **68** : 1-5
- [17] Zhang Y , Xu Y , Zhong W , et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA EGFR mutation detection using droplet digital PCR [J]. Oncotarget , 2017 , **8** (4) : 5861-5873
- [18] Denis JA , Patroni A , Guillemin E , et al. Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict KRAS mutations before surgery [J]. Mol Oncol , 2016 , **10** (8) : 1221-1231
- [19] Reid AL , Freeman JB , Millward M , et al. Detection of BRAF-V600E and V600K in melanoma circulating tumour cells by droplet digital PCR [J]. Clin Biochem , 2015 , **48** (15) : 999-1002

- [20] Beaver JA , Jelovac D , Balukrishna S , *et al.* Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer [J]. Clin Cancer Res , 2014 , **20**(10) : 2643-2650
- [21] Kinugasa H , Nouse K , Miyahara K , *et al.* Detection of k-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer [J]. Cancer , 2015 , **121**(13) : 2271-2280
- [22] Oellerich M , Walson PD , Beck J , *et al.* Graft-derived cell-free DNA as a marker of transplant graft injury [J]. Ther Drug Monit , 2016 , **38 Suppl 1**: S75-S79
- [23] 冉江华,张熙冰,刘静 等. 恒河猴肝移植模型急性排斥反应中白细胞介素 6 的表达 [J]. 中国组织工程研究(Ran JH , Zhang XB , Liu J , *et al.* Interleukin-6 expression in rhesus monkey models with acute rejection after liver transplantation [J]. Chin J Tissue Eng Res) , 2014 , **18**(36) : 5758-5763
- [24] Beck J , Bierau S , Balzer S , *et al.* Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury [J]. Clin Chem , 2013 , **59**(12) : 1732-1741
- [25] Oellerich M , Schütz E , Kanzow P , *et al.* Use of graft-derived cell-free DNA as an organ integrity biomarker to reexamine effective tacrolimus trough concentrations after liver transplantation [J]. Ther Drug Monit , 2014 , **36**(2) : 136-140
- [26] Hudecova I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids [J]. Clin Biochem , 2015 , **48**(15) : 948-956
- [27] Papageorgiou EA , Patsalis PC. Non-invasive prenatal diagnosis of aneuploidies: New technologies and clinical applications [J]. Genome Med , 2012 , **4**(5) : 46
- [28] El Khattabi LA , Rouillac-Le Sciellour C , Le Tessier D , *et al.* Could digital PCR be an alternative as a non-invasive prenatal test for trisomy 21: A proof of concept study [J]. PLoS One , 2016 , **11**(5) : e0155009
- [29] 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
- [30] Strain MC , Lada SM , Luong T , *et al.* Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR [J]. PLoS One , 2013 , **8**(4) : e55943
- [31] Sedlak RH , Cook L , Huang ML , *et al.* Identification of chromosomally integrated human herpesvirus 6 by droplet digital PCR [J]. Clin Chem , 2014 , **60**(5) : 765-772
- [32] Handsaker RE , Van Doren V , Berman JR , *et al.* Large multiallelic copy number variations in humans [J]. Nat Genet , 2015 , **47**(3) : 296-303
- [33] Backenroth D , Homsy J , Murillo LR , *et al.* CANOES: detecting rare copy number variants from whole exome sequencing data [J]. Nucleic Acids Res , 2014 , **42**(12) : e97
- [34] Laurie MT , Bertout JA , Taylor SD , *et al.* Simultaneous digital quantification and fluorescence-based size characterization of massively parallel sequencing libraries [J]. Biotechniques , 2013 , **55**(2) : 61-67