



超快脉冲控制 PCR (upPCR) 技术及应用*

景 伟^{1,2)} 马富强^{2)**}⁽¹⁾ 中国科学技术大学生物医学工程学院 (苏州), 生命科学与医学部, 合肥 230026;⁽²⁾ 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 中国科学院生物医学检验技术重点实验室, 医药酶工程研究中心, 苏州 215163)

摘要 在精准医疗、个性化医疗的大背景下, 分子诊断在病原体检测、肿瘤诊断、优生优育、环境保护、食品安全等领域的应用越来越广泛, 并逐渐向操作简单、快速准确、低成本、适用于基层及家庭使用的分子即时检测 (point-of-care testing, POCT) 方向发展。超快脉冲控制 PCR (ultra-fast pulse-controlled PCR, upPCR) 是实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术的延伸和升级, 该技术利用能量脉冲控制扩增反应中的金属加热元件 (主要是纳米金), 在几百微秒内完成溶液局部微环境的快速升温, 实现模板 DNA 的解链变性, 停止加热后反应微环境可被周围溶液快速冷却到聚合酶的延伸温度, 实现引物退火和模板 DNA 的扩增, 单个变性-扩增循环仅有 1.5~5 s, 远快于传统 PCR (约 90 s/循环), 从而能够极大地加快扩增反应速度。upPCR 技术在保留了传统 qPCR 高灵敏度、高特异性和多重检测等优势的基础上, 增加了超快速 (低于 15 min)、设备简单等新优势, 非常适合用于基层检测等分子 POCT 场景。本文主要对 upPCR 技术的原理、设备、核心原料及在分子诊断中的应用进行综述, 并对该技术存在的优缺点, 以及未来的技术发展和应用趋势进行了讨论。

关键词 分子诊断, 超快脉冲控制 PCR, 纳米金, 分子即时检测**中图分类号** Q5, Q51, Q55**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0513

分子诊断技术在疾病诊断与治疗中发挥着极为重要的作用, 目前广泛应用在传染病、性病、优生优育、司法鉴定、肿瘤、遗传病等多个领域。2019 年国内分子诊断市场规模达 132.1 亿元, 年复合增长率达 31.63%, 是体外诊断领域增速最快的细分领域。2020 年初新型冠状病毒感染 (COVID-19) 疫情的爆发更是极大地促进了分子诊断技术的发展^[1-4]。据国家卫生健康委员会统计, 截至 2022 年 4 月, 中国已经完成约 115 亿人次的严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 核酸检测。目前中国拥有 15.3 万的专业技术人员从事核酸检测技术工作, 拥有 1.3 万家医疗卫生机构可以开展核酸检测, 全国二级以上医院几乎都配备核酸检测能力, 检测能力达到 5 700 万管/d, 相比于 2020 年 3 月 COVID-19 疫情爆发初期 (约 126 万管/d) 提高了将近 50 倍。COVID-19 疫情极大地促进了分子诊断技术的发展和普及, 也为分子诊断技术的发展带来了契机^[5-6]。

分子诊断技术包括核酸扩增检测、基因测序、基因芯片等^[7-10], 其中核酸扩增技术是目前应用最

广泛的分子诊断技术^[3]。实时荧光定量 PCR (qPCR) 是最广泛使用的靶核酸检测技术^[11-12], 是多种疾病诊断的金标准, 目前中国绝大多数 SARS-CoV-2 核酸检测都是基于该技术平台^[13]。qPCR 的发展大致经历了 6 个阶段 (图 1)。1986 年, 美国学者 Mullis 等^[14] 开创了 PCR 技术, 并由美国 Cetus 公司开发, 推出了第一台 PCR 自动化热循环仪, PCR 技术整个扩增流程包括高温变性、低温退火、适温延伸三个步骤^[15], 反应步骤简单, 逐渐成为生命科学研究领域中最常规的实验方法之一。1988 年 Saiki 等^[16] 将分离出的耐热型 DNA 聚合酶 (Taq DNA 聚合酶) 运用于 PCR 技术, 实现了 PCR 过程自动连续循环, Taq DNA 聚合酶的引入为 PCR 的广泛应用带来革命的突破。1993 年 Higuchi 等^[17] 首次采用封闭式检测方式和动态 PCR 的方法对目

* 中科院青促会会员项目 (2022327), 国家自然科学基金 (31900911), 江苏省双创人才项目 (JSJCRC2021548) 和科技部绿色生物制造项目 (2021YFC2104200) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0512-69588088, E-mail: mafuqiang318@sibet.ac.cn

收稿日期: 2022-10-30, 接受日期: 2023-01-09

的核酸数量进行定量分析,首次提出了qPCR技术的概念,qPCR利用荧光染料检测每次PCR循环后产物总量,提高了反应自动化水平,实现了从定性到定量的飞跃。1995年美国Perkin Elmer (PE)公司开发出了TaqMan荧光探针定量技术,荧光探针只与目的序列结合,不受非特异性产物的影响,特异性更高,且定量更准确。Taqman荧光探针定量技术将qPCR带入了更广阔的应用空间,是qPCR技术的重要里程碑^[18-19]。1996年美国Applied Biosystems公司推出全世界首台荧光定量PCR仪,从而正式使qPCR技术应用到市场^[20]。1999年,Bert Vogelstein创造了“数字PCR”^[21],适用于依靠 C_t 值不能很好分辨的应用领域,实现了对起始样品的绝对定量。到目前为止qPCR仍是中国核酸检测的主流技术和金标准,已具备良好的临床基础,是应用最成熟、市场份额最大的分子诊断技术平台^[22]。

全球COVID-19疫情的爆发使原本在专业实验室开展的核酸检测技术为大众所认知,核酸检测是疫情防控的有效手段,可以尽早发现传染源并从源头上抑制疫情的传播。随着分子诊断的发展和推广,对于家庭自测、社区即时核酸检测的需求也逐渐凸显,但目前进行核酸检测的主要方法仍是集中采样后转运至实验室处理,一般要6~48 h才能出检测结果,无法实现即时、快速检测。若要实现快速

社区、居家检测等分子即时检测(point-of-care testing, POCT)应用场景,必须满足检测时间快、设备成本低、操作简便等要求^[23-26]。

为实现快速便捷分子POCT,人们围绕检测设备、检测原料和试剂、技术原理等方面进行了不断改进提升,例如在检测设备上节省设定程序、对升降温速度进行改进、优化结果分析的时间等。伯乐的CFX-96仪器能在55 min内完成40循环的升降温,相比于传统热循环仪的1.5 h大大加快了速度;另外,科学家们还从核心酶角度进行了扩增速度及耐热性改进,比如Kapa公司研制的2G Fast taq酶,该酶通过分子进化显著提升了持续合成能力和延伸速度,相比于野生型Taq DNA聚合酶可以缩短20%~70%的反应时间;在技术原理方面,开发了一系列速度快、操作便捷的等温扩增方法,包括滚环扩增技术(RCA)^[27-28]、重组酶等温扩增(RPA)^[29-30]、链代替扩增(SDA)^[31]、环介导等温扩增反应(LAMP)等^[32-34],等温扩增技术具有无需昂贵PCR仪器、速度快(10~60 min完成反应)等优势,成为分子POCT领域的重要技术,但是相比于传统qPCR技术,等温扩增技术普遍存在不容易进行多重靶标检测、假阳性严重、灵敏度不高等缺点^[35],因此开发速度快、且多重检测和灵敏度等关键性能等指标能够媲美传统qPCR的快速核酸检测技术具有重要的应用价值。

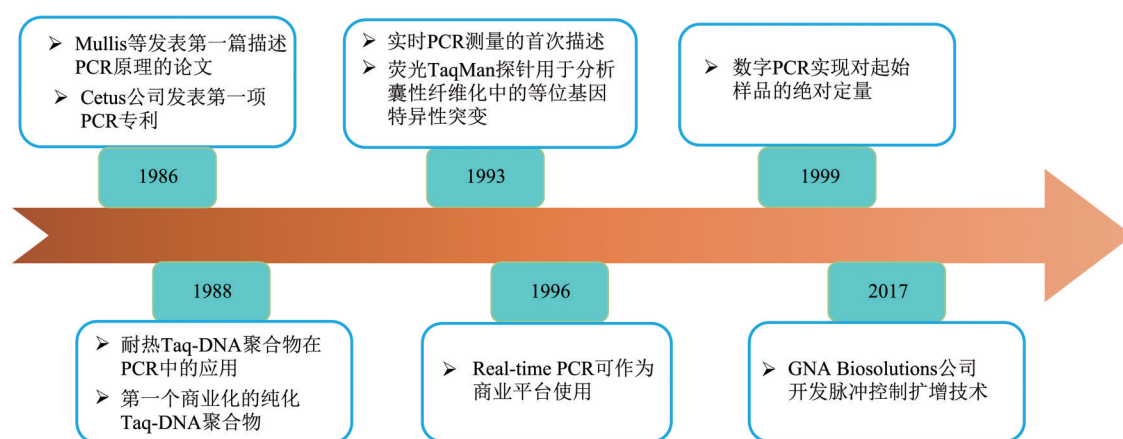


Fig. 1 The development of PCR nucleic acid amplification technology

图1 PCR核酸扩增技术的发展历程

超快脉冲控制PCR (ultra-fast pulse-controlled PCR, upPCR) 是近年来开发出来的分子诊断新技术,是传统qPCR技术的延伸和升级,该技术在保

留传统荧光定量PCR高灵敏度、高特异性和多重检测等优势的基础上,还具有超快速、设备简单、能耗低等新优势,非常适合分子POCT。自从21世

纪初被发明以来, upPCR 技术经过一系列迭代升级, 在加热源、光热纳米粒子、升降温方式上都经历了一系列发展和完善。2008 年 Stehr 等^[36] 使用 DNA 结合的金纳米棒聚集体作为光吸收剂, 将 300 ns 激光脉冲的光能局部转换为热能, 在微秒时间尺度上熔化双链 DNA, 奠定了纳米金作为 upPCR 的核心加热材料的地位。2012 年, Roche 等^[37] 使用金纳米球作为光热纳米材料, 结合相关配套设备的开发, 首次建立了 upPCR 技术。2017 年 GNA Biosolutions GmbH 公司^[38] 开发出商业化的 upPCR 产品, 设备到目前为止已经过多代更新, 形成较为成熟的产品体系。此外还有 ROVER diagnostics 公司也推出 LightSpeed 系统^[39], 该技术展示出广阔的应用前景。

upPCR 通过向反应体系中引入能够快速进行光热/电热转换的纳米材料 (例如纳米金), 从而大幅度提升了反应体系的温度变化速度, 例如, 通过脉冲控制激光或 LED 灯加热溶液中的纳米材料, 能够在毫秒时间实现溶液微环境的快速升温, 停止加热后通过环境溶液对微环境进行快速降温, 该方

法的升降温速度远远高于传统热循环仪的加热模块的升降温速度, 因此可以在 15 min 以内完成整个检测反应。以 GNA Biosolutions 公司开发的 upPCR 技术为例 (图 2), 将含有模板 DNA 的溶液加入到 upPCR 混合溶液, PCR 混合溶液中的金纳米粒子被目标特异性引物功能化, 反应体系在脉冲控制扩增仪中, 当高功率的激光束通过快速脉冲对反应体系进行照射时, 由于激光波长和金纳米粒子的等离子体吸收特性相匹配, 胶体金纳米粒子的激光照射能够对均匀分散的纳米粒子进行微秒级超快速局部加热, 使纳米粒子周围溶液温度迅速上升, 导致 DNA 双链变性解链, 当停止激光照射时, 反应的主体溶液可作为内置冷却容器对反应微环境进行迅速冷却, 单链模板 DNA 与金纳米颗粒上的特异性引物退火, 在 DNA 聚合酶的作用下延伸, 生成新的 DNA 双链。经过多次循环, 最终实现模板 DNA 的大量扩增和检测。在该技术体系中, 由于激光以短脉冲 (微秒级) 加热纳米粒子 (皮摩尔浓度), 并将热循环限制在以纳米粒子为核心的反应微环境中, 因而只对小部分反应体积进行升降温,

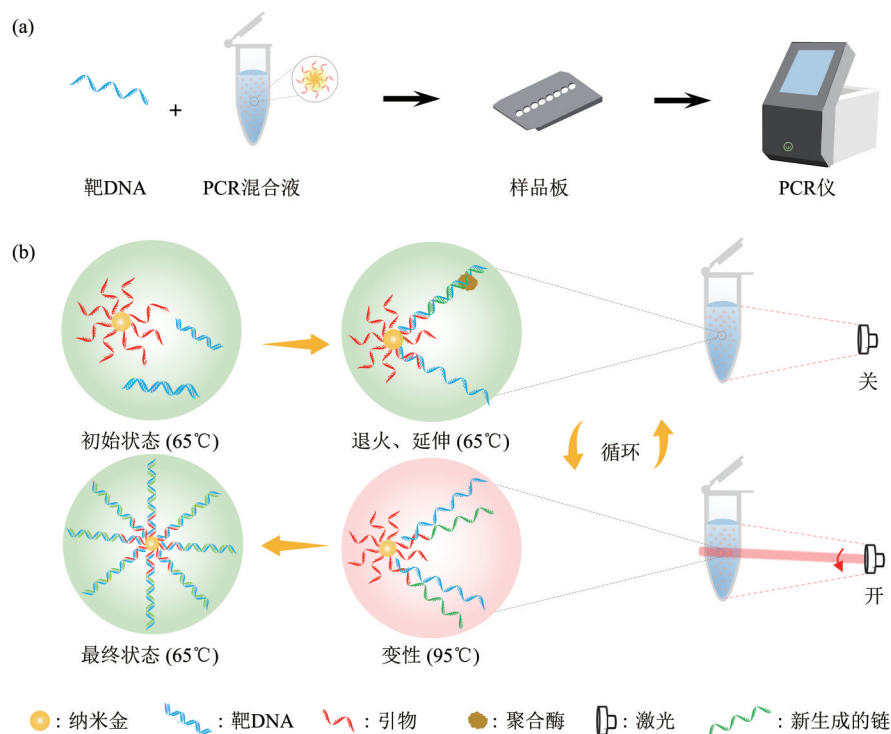


Fig. 2 Principle of ultrafast pulse-controlled PCR amplification

图2 超快脉冲控制PCR扩增原理

(a) 超快脉冲控制PCR过程示意图。将模板DNA与含有金纳米粒子的PCR混合溶液一起转移至样品板上, 将样品板放入PCR扩增仪中, 用于进行扩增和实时等离子体检测。(b) 超快脉冲控制PCR扩增原理示意图。高功率的激光束通过快速脉冲对金纳米粒子进行快速加热, 导致DNA双链变性。当停止激光照射时, 金纳米粒子在周围溶液作用下会迅速冷却至设定的温度, DNA单链与引物退火, 并在DNA聚合酶的作用下延伸, 形成新的双链DNA, 最终实现目标核酸分子的大量扩增和检测。

主体反应温度基本不变,从而可实现超快的加热和冷却循环^[38]。upPCR技术的单个变性-扩增循环仅需1.5~5 s,远低于传统PCR所需的时间(约90 s/循环),从而能够在15 min以内完成扩增检测。

upPCR技术开发的设备重量轻,能耗低,可由电池供电,便携且易于使用,灵敏度与传统qPCR相当,同样支持多重靶标检测,可以在很短的时间内提供具有高灵敏度和特异性的结果。基于此,upPCR可以在实验室外快速检测传染原^[40],在家庭自检和社区快检等分子POCT场景中具有重大应用潜力。本文介绍了upPCR技术的最新进展,对近年来upPCR技术的原理、核心原料、仪器设备的发展情况进行综述,并讨论了该技术的发展趋势和应用前景。

1 upPCR技术的发展

与普通qPCR相比,upPCR技术通过引入纳米金辅助加热。金纳米粒子在PCR中的应用研究可追溯至2005年,上海交通大学与中国科学院应用物理所^[41-42]首次报道了金纳米粒子对于PCR体系的提升作用,该方法通过引入金纳米粒子从而有效抑制了PCR中的非特异性反应,显著提升了PCR技术的性能。同年,Li等^[43]通过将0.7 nmol/L的13 nm金纳米粒子添加到PCR试剂中并与不同的PCR系统比较,结果显示金纳米粒子可用于提高PCR效率和缩短反应时间。2012年,Roche等^[37]将金纳米球作为光热纳米材料引入PCR体系,结合相关配套设备的开发,将商业热循环器中使用的

微升体积减少到纳升或皮升体积,首次建立了upPCR技术。2017年GNA Biosolutions GmbH公司^[38]将金纳米颗粒与引物偶联,通过高功率激光束快速脉冲选择性和特异性地照射金纳米颗粒,从而实现反应微环境局部加热,和环境溶液快速降温,开发出了商业化的脉冲控制PCR产品。

纳米金的光热效应主要依靠其对不同特定波长的光的强烈吸收,通过非辐射弛豫途径将光能转化为热能。金纳米粒子对激光脉冲能量的吸收分为三个步骤:电子吸收、电子-声子热化、外部热扩散^[44-46]。原理如图3所示:激光照射时,在共振波长的激发下,在粒子表面形成的极化电荷导致振荡偶极子,表现出增强的吸收和散射截面。共振相对于波长的位置由颗粒的大小和几何形状决定。振荡偶极子的共振能量通过欧姆加热损失分散到周围介质。释放的能量可用于快速加热溶液,其中每个颗粒成为加热元件。停止激光照射后,具有高导热性的金纳米颗粒可以借助周围溶液快速冷却。通过打开或关闭激发光,可以实现在金纳米颗粒表面上快速加热和冷却。因此,使用该方法可以在几分钟内实现具有高加热和冷却速率的超快PCR。应用纳米材料的光热效应优点是可以很容易地控制溶液的加热和冷却,进而控制溶液中DNA的变性和扩增^[37]。

金纳米粒子可以使用各种技术灵活合成,得到所需的形状和大小^[47-51],其中金纳米球、金纳米棒和金双锥体等是upPCR中常用形状^[52-53],相较于其他贵金属,金纳米粒子有其独特优势^[44, 54-56],

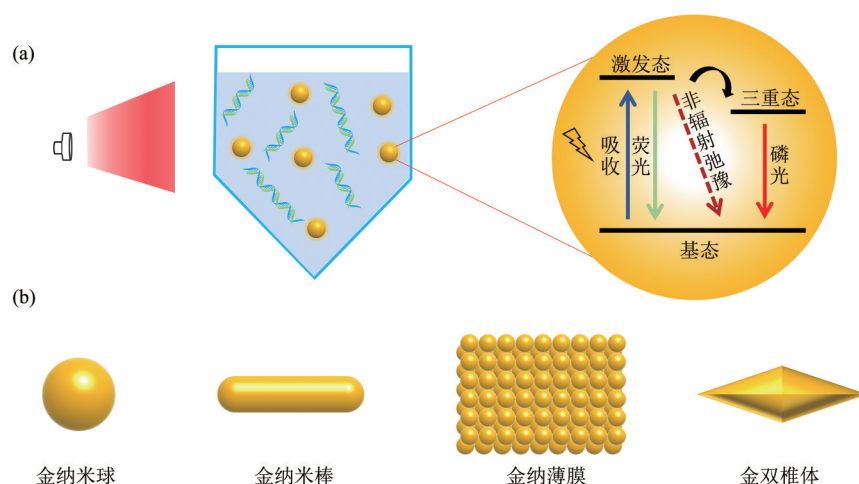


Fig. 3 Schematic diagram of photothermal effects of gold nanoparticles

图3 金纳米粒子光热效应原理图

(a) 金纳米粒子光热效应原理图。在激光激发下金纳米粒子表面的极化电荷会导致振荡偶极子,其共振能量通过欧姆加热损失分散到周围介质从而快速加热溶液。(b) 不同种类金纳米粒子示意图。包括金纳米球、金纳米棒、金纳米薄膜和金双锥体。

包括: a. 金纳米粒子具有较高的表面等离子体吸收和高光散射能力, 在短时间内可迅速升温, 使其在 upPCR 技术中得到广泛应用^[57-60]; b. 金纳米粒子可通过调整金尺寸和形状, 导致其从可见光调谐到近红外光 (NIR) 的共振, 由于组织在 NIR 范围内的吸收性较低, 因此它非常适合生物学应用; c. 金纳米粒子表面可以简单地进行修饰, 允许用各种化合物对金纳米粒子进行功能化, 例如 DNA、抗体、蛋白质、碳水化合物、脂质等; d. 金纳米粒子的氧化作用很弱, 生物相容性高, 无细胞毒性, 兼容多种生化、分子和细胞实验。

不同形状的金纳米粒子具有不同的光学性能。

a. 金纳米薄膜可快速吸光强光, 使其表面电子激发到更高的能量状态并产生热电子, 从而对 PCR 溶液进行加热。b. 金纳米球比表面积高, 负载量高, 易于表面功能化, 在 upPCR 中可通过与特异性引物偶联实现溶液局部加热, 并通过主体溶液实现冷却。c. 金纳米棒比金纳米球具有更为独特的光电性质, 在近红外区对光的吸收和散射能力都很强, 可快速吸收光源实现加热, 另外金纳米棒还具有合成方法简单、化学性质稳定等优点。d. 金双锥体具有更高的吸光度系数, 尺寸分布更均匀, 这使得它们更有效地吸收入射光, 此外, 金双锥体具有更高的光热转换效率, 可以进一步提高入射光的利用率。近年来, 科学家们将不同形状的金纳米粒子应用于 PCR 反应体系中, 结合引物偶联、光加热、脉冲控制等辅助手段, 形成了具有不同性能的 upPCR 体系, 下文将对这些体系进行了归纳和讨论。

1.1 基于金纳米膜的 upPCR 技术

2015 年, Son 等^[61]开发了一种基于金纳米膜的 upPCR 技术, 基于金纳米膜作为光热转换器的光子 PCR 使用 LED 作为激发光。当 LED 照射金纳米膜时, 金纳米膜会发生对等离子体辅助的强光吸收, 导致等离子体表面附近的电子激发到更高的能量状态, 在 100 fs 内产生热电子。热电子可以迅速扩散到整个金属薄膜, 从而形成平衡且均匀的温度场。当关闭 LED 灯后, 加热后的溶液可通过散热风扇和高导热率的金薄膜散热, 从而实现快速热循环。反应加热速率约为 12.8°C/s, 冷却速率为 6.6°C/s, 可在 5 min 内完成 30 个超快热循环。但单层金纳米薄膜层技术的热扩散引起的 PCR 溶液温度均匀性差, 导致扩散效率相对较低, 2016 年 Son 等^[62]通过引入两个平行的金纳米膜形成 3D PCR 室, 解决了仅一侧加热导致溶液温度均匀性差及用

于温度控制的热电偶的可靠定位问题。改进后技术的原理为: LED 的光首先被反射、吸收并传输到底部金纳米薄膜, 被底层吸收产生热量, 随后透射光被反射、吸收并透射到顶部的金纳米薄膜, 反射光经多次反射、吸收和透射并产生热量。相对于单层金纳米薄膜层技术, 双层金纳米薄膜层温度变化相对较慢, 但精度和稳定性显著提高, 灵敏度和可重复性也显著提升, 可以实现 10 min 内完成反应。

1.2 基于金纳米双锥体的 upPCR 技术

2017 年, Lee 等^[63]通过使用具有更高光吸收系数的金双锥体实现了超快热循环。将金双锥体纳米粒子均匀分散在 PCR 反应混合物中, 溶液的加热与冷却可通过脉冲红外 LED (IR-LED) 实现, 当红外发光二极管照射时, 金双锥体作为纳米反应器可以吸收光子能并将其转化为热能, 金双锥体吸收光子后, 除散热外没有明显的能量损失途径。在热扩散的作用下迅速提高整体溶液的温度, 实现 DNA 双链的变性。该方法使用的金纳米双锥体允许特定的光激发和热释放, 并确保精确均匀的加热, 可以在 7.5 min 内可以完成 40 个循环, 实现更快的热循环, 加热过程只是对占比很少的微环境进行加热, 但该体系中引物和模板是随机分布在反应体系, 大部分的模板并没有被加热, 存在靶向性加热不强的问题, 理论扩增效率低, 如果将纳米金与引物偶联则有望大幅度提升加热和反应效率。

1.3 基于镀金钨丝的 upPCR 技术

GNA Biosolutions 公司使用成本更低的镀金钨丝 (直径 15 μm , Au 涂层 200 nm) 替代纳米金颗粒, 开发了一种更为经济的 upPCR 方法^[40, 64]。该体系采用电流而非光能对反应体系进行加热——通过将快速脉冲电压施加到 75 根镀金钨丝阵列, 仅在每根导线周围的微米级液体层内引起超快速加热, 实现溶液局部加热。而剩余的大部分反应体积 (超过 99%) 则保持在用于退火和延伸的基础温度。由于局部加热的方法仅在导线周围的加热层内使双链 DNA 变性, 该技术对引物进行了局部加热, 以提高加热和反应效率。该技术通过 Au-S 键将引物固定到镀金钨丝, 使其中引物 5' 端连接到镀金钨丝的表面, 3' 端在溶液中保持游离, 以便于扩增反应。扩增反应的双链 DNA 变性步骤只需要热循环总反应体积通常所需的能量的一小部分即可。局部加热使得大部分反应溶液体积可用作镀金钨丝被动冷却过程的冷却容器, 在电压脉冲后镀金钨丝通过热扩散在毫秒时间尺度上冷却下来, 从而产生超快

的热循环。由于直接将引物偶联在纳米金载体上流程复杂, 工艺要求高等, GNA Biosolutions 公司通过磁珠与引物结合替代电阻丝直接固定的方式, 将引物悬浮在镀金钨丝两侧从而进行局部脉冲加热, 实现热循环。磁珠在偶联上具有更高的比表面积和操作更加方便、快捷的优点, 该方法每个循环的周期为 1.5~5 s, 可在 14 min 内完成扩增。

1.4 基于金纳米棒的upPCR技术

2022 年, ROVER diagnostics 公司推出了一种基于金纳米棒的可多路荧光监测的 LightSpeed 系统^[39]。金纳米棒对近红外区对光的吸收和散射能力都很强, 可快速实现溶液整体加热。该系统将金纳米棒悬浮在 0.2 ml PCR 管中的溶液中, 将 3 个 LED 模块同心放置在 PCR 管周围并连接到散热器和散热器风扇上, 通过带有线热电偶的闭环传感或通过非接触式开环控制来实现温度控制。加热时金纳米棒快速吸收 LED 发出的光, 由于红外辐射与金纳米棒的电子相互作用产生热量, 对溶液整体进行加热, DNA 双链在高温下变性成为单链。停止加热后使用风扇对溶液辅助冷却, 目的片段进行退火延伸, 从而实现快速循环扩增。该装置在初始温

度保持 2 min (用于逆转录), 变性时间为 10 s, 可在 15 min 内完成 45 个快速热循环周期, 每周期加热时间为 6.7°C/s, 降温速度为 4.7°C/s。每次退火延伸结束时可通过 488 nm 激光和光谱仪设置进行实时荧光检测从样品到结果检出可在 30 min 内完成。

随着 upPCR 技术的发展, upPCR 形成了不同的性能体系 (表 1)。在对 PCR 溶液加热范围方面, 可通过将纳米金与引物偶联的方式实现溶液的局部加热, 溶液整体温度不变; 也可将纳米金直接加入到溶液内对溶液进行整体加热。局部加热靶向性强, 升降温速度快, 但引物偶联到纳米金的技术复杂, 成本较高; 而整体加热无需额外的引物偶联, 但需要较长的升降温时间。在 PCR 溶液的加热方式上, 可分为光加热与电加热, 电加热成本更低, 可控性更强, 但需要将电阻丝和反应芯片整合, 反应容器制备工艺较复杂, 光加热相比于电加热, 光源高频通断控制相比电流控制技术难度稍高, 但非接触加热方法降低了芯片制造的复杂性, 因而适用性高, 目前应用更广。

Table 1 Comparison of ultra-fast pulse-controlled PCR experimental technology based on different thermal cycling modes

表1 基于不同热循环方式的超快脉冲控制PCR实验技术对比

热材料	加热方式	加热范围	冷却方式	热循环速度	参考文献
金纳米膜	LED	整体加热	散热扇及金薄膜导热散热	10 min内完成30个热循环	[61]
金双锥体	LED	整体加热	风扇辅助散热	5.6 min内完成30个热循环	[63]
镀金钨丝	电加热	局部加热	主体溶液作为冷却容器散热	14 min内完成扩增	[40]
金纳米棒	LED	整体加热	风扇辅助散热	10 min内完成30个热循环	[39]

2 upPCR技术的核心原料

2.1 引物及功能化

upPCR 技术兼容荧光染料法的 qPCR 体系, 也兼容多重 Taqman 探针, 在整体加热的 upPCR 中, 可直接兼容常规 qPCR 引物, 引物无需功能化, 而在局部加热的 upPCR 技术中, 需要将引物与纳米金特异性偶联, 使加热温度局限在纳米金表面, 从而实现反应的局部化。由于纳米金合成方式不同, 导致其表面化学性质不同, 进行引物功能化的方式也不同。

金纳米球易于表面修饰并且能与柠檬酸盐离子直接置换, 它们可以通过直接吸附未修饰的寡核苷

酸或接枝硫醇末端寡核苷酸实现引物功能化^[65]。相比之下, 金纳米棒由于其表面生长所必需的十六烷基三甲基溴化铵双层, 与 DNA 的功能化更具有挑战性^[66]。金纳米棒功能化主要分三步: 第一步用巯基-聚乙二醇-甲氧基 (HS-PEG-OMe) 部分置换十六烷基三甲基溴化铵分子并转移到有机介质中; 第二步用 6-巯基己酸对金纳米棒的表面进行改性, 通过添加异丙醇使末端羧酸基团电离, 并在缓冲介质中再分散; 第三步通过电荷筛选进行 DNA 功能化, 洗涤 3 次后在缓冲液中再分散。对于使用镀金钨丝的 upPCR 技术而言, 如果在镀金钨丝上直接偶联引物, 需要用硫醇修饰的正向引物对镀金钨丝进行功能化, 使用多聚 A 尾 (poly-A-tail) 和

亚磷酸胺 (Int Spacer 9) 将硫醇修饰添加到引物的 5'端, 通过强 Au-S 键将引物固定到镀金钨丝实现引物功能化。磁珠与寡核苷酸的偶联有以下几种方法^[67-68]: a. 共价固定法, 典型的共价化学连接键包括形成酰胺键、酯键或者二硫键, 通过 5'-反应基团- (如 5'-氨基-) 固定; b. 离子或偶极作用, 通过离子或偶极相互作用将带负电荷的磷酸主链与部分带正电荷的表面作用, 并通过紫外线照射进行交联; c. 亲和作用, 利用亲和配体相互作用, 例如生物素化核酸在亲和素表面的偶联。

2.2 核心酶

upPCR 技术可以将 PCR 运行时间从几小时缩短到几分钟, 因而对酶的模板亲和力、催化速度等关键性能提出了更高要求。PCR 过程的速度取决于许多因素^[45, 69], 包括所用聚合酶的延伸率、热循环器的升降温速度和 DNA 模板的复杂性等。选择合适的 DNA 聚合酶对 PCR 实验尤为重要, 是开展实验前首要考虑的问题。DNA 聚合酶是影响反应速度的重要因素, PCR 体系中最常用的 DNA 聚合酶是 Taq DNA 聚合酶, Taq DNA 聚合酶具有较好的耐热性, 可在 PCR 高温变性过程中保持活性, 在整个 PCR 循环中无需多次补加酶^[70-72]。但用于常规 PCR 的 Taq DNA 聚合酶延伸速度较慢, Taq DNA 聚合酶的标准延伸率约为 1 kb/min^[73], 而 upPCR 技术通常需要具有更快的延伸速率的热稳定聚合酶。例如快速 Taq DNA 聚合酶, 快速 Taq DNA 聚合酶在扩增速度、扩增效率、特异性以及酶本身的稳定性都显著优于普通 Taq 酶, 在大幅度缩短反应时间的同时能提高扩增效果。科学家们对 Taq DNA 聚合酶进行了一系列提升反应速度的酶工程改造, Davidson 等^[74]通过在 Taq DNA 聚合酶拇指结构与上插入硫氧还蛋白结构域, 将 DNA 聚合酶速度提升了 20~50 倍。Wang 等^[75]将 Taq DNA 聚合酶和非序列特异性的 dsDNA 结合蛋白 Sso7d 融合, 增强酶和 DNA 模板结合, 将 DNA 聚合酶速度提升了 16 倍。这些快速突变体及其组合有望用于 upPCR 体系。

当检测靶标是 RNA 时, 需要通过逆转录酶 (reverse transcriptase) 将 RNA 逆转录为 DNA 才能进行 PCR 扩增。目前已发现的逆转录酶大多不能耐受高温环境, 在 PCR 过程中难以保持活性。例如从如从克隆有莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶基因的大肠杆菌中分离到的莫洛尼鼠白血病病毒 (MMLV) 逆转录酶和从禽类成骨髓细胞白血病病

毒纯化到的禽类成髓细胞病毒 (AMV) 逆转录酶等。用于 PCR 的逆转录酶需要高度耐热性, 科学家利用蛋白质工程的方法对 MMLV 进行了一系列改造, 大幅度提升了稳定性, 耐热温度提高到 60°C 以上, 并实现了商品化, 如赛默飞公司的 SuperScript 系列等, 在提升热稳定性的同时也提升了逆转录活性和产量。另外从自然界中发现超级耐热的逆转录酶也在开展, 例如 Moser 等^[76]从病毒宏基因组库中分离出一种基于热稳定 3173 Pol 的先天逆转录酶活性的独特单酶替代品, 该酶具有高热稳定性、高灵敏度和特异性。上述这些新酶资源有望运用到 upPCR 中。

除此之外, upPCR 体系还包括其他核心酶, 例如 RNase 抑制剂、尿嘧啶 DNA 糖基酶 (UDG) 等。RNase 抑制剂可以减少和控制 RNase 的污染, 提高转录及翻译的效率, 确保 RNA 分析结果的准确性。常用的 RNase 抑制剂有焦碳酸二乙酯 (DEPC)、氧钒核糖核苷复合物 (RVC)、异硫氰酸胍和 RNA 酶的蛋白质抑制剂 (RNasin) 等。尿嘧啶 DNA 糖基酶 (UDG) 可与脱氧尿苷三磷酸 (dUTP) 搭配使用, 建立 PCR 防污染体系, 避免气溶胶污染, 提升扩增结果的准确性。

3 upPCR设备体系开发

upPCR 技术需要配备特殊的配套设施, 近年来陆续有几家国外公司开发出 upPCR 设备, 例如 GNA Biosolutions 公司开发的一系列脉冲控制设备, Pharos V8、Pharos Micro、GNA Octea 等, Curiosity Diagnostics 公司开发的 PCR One 设备及 ROVER diagnostics 公司开发的 LightSpeed 设备等。

GNA Biosolutions 公司基于 upPCR 技术开发了一系列的设备产品 (图 4a), 第一台设备 Pharos 400 世界上第一台 upPCR 仪器, 可快速安全的制备样品, 超快分析 DNA, 但由于技术成本等问题并未商业化供应。Pharos V8 是世界上第一台商业化的 upPCR 仪器, Pharos V8 通过利用纳米金将温度循环控制在纳米尺度上, 实现溶液局部加热, 可在 10 min 或更短的时间内进行超快实时核酸检测, 将 PCR 反应时间加快了 10 倍, 同时仪器具有直观的操作界面和易于使用的软件, 并可以远程访问。但目前该平台无法进行实时 PCR, 只能用于半定量的检测。Pharos Micro 是一台可实时荧光检测的脉冲 PCR 设备。两个常规加热块在芯片底部和顶部设置为恒温, 通过 USB 连接到仪器的平板电脑

上使用专用软件进行操作, 可以将反应体积保持在65°C的恒温以进行引物的退火和延伸。该设备可以连接到固定实验室中的电源也可以由电池供电以供现场使用。GNA Octea是第一台使用薄箔电加热完成的脉冲扩增PCR仪。GNA Octea通过将磁珠结合的样品悬浮在反应容器的两侧, 从而实现局部温度脉冲进行快速热循环。可以在20 min内分析8个样本, 包括咽拭子和测试准备的总时间约为40 min, 灵敏度为96.7%, 特异度为100%, 体积小、重量轻、可移动, 可以快速、方便地安装和使用。GNA Helios是一个自动化的样本-结果分子测试系统, 目前还未上市, GNA Helios主要由分析仪和一次性集成测试盒组成。该系统可同时检测9~12种目标病原体, 并可在15~30 min内提供结果。GNA Nano是一种小型化的分子诊断系统, 目前正处于研发状态, 该系统可用于一次测试一个患者样本, 或并行地添加一个基站, 可以在10~20 min内提供结果。

Curiosity Diagnostics公司基于upPCR技术开发了PCR One系统(图4b), PCR One通过采用IR加热扩增技术, 最快可在7 min内完成40个热循环。该系统可以在15 min完成从样本到结果的检测,

PCR One的微流体在单独的微孔中进行每个PCR, 并可以对来自患者的原始样本进行多达20个目标的多重检测, 每个靶标可进行3孔重复。PCR One系统可做到样品进, 结果出, 适用于快速检测。

哥伦比亚大学Sia教授和他的团队^[39]开发了一种LightSpeed仪器用于检测新型冠状病毒感染(COVID-19)(图4c), 该设备使用金纳米棒粒子将光转化为热, 通过冷却风扇实现热循环。LightSpeed仪器主要由3个850 nm IR-LED模块、冷却风扇以及1个用于荧光检测的488 nm激光和分光光度计装置组成。LightSpeed仪器采用了质子纳米粒子热循环和基于荧光测量的光学读数的组合, 可以在大约25 min内完成从样本到结果的实时PCR检测, 扩增速度比传统qPCR的快数倍。通过使用该仪器与赛默飞QuantStudio 6 Pro仪器进行的qPCR测试相比, LightSpeed仪器在上具有100%的灵敏度和特异性。LightSpeed仪器设备小巧, 大约只有0.91 kg重, 仪器的商品成本为1 500美元, 每项检测的成本约为5美元, 检测成本低, 具备较好的便携性, 且过程全封闭, 适用于分子POCT应用场景。



Fig. 4 Development of equipment for ultra-fast pulse-controlled PCR technology

图4 超快脉冲控制PCR技术的设备开发

(a) GNA Biosolutions公司技术开发的一系列超快脉冲控制PCR设备产品。(b) Curiosity Diagnostics公司基于超快脉冲控制PCR技术开发的PCR One系统。(c) 哥伦比亚大学Sia教授开发的LightSpeed仪器。

4 upPCR技术的应用

upPCR 技术由于其检测快速、流程简单、无需提取核酸、可在非实验室环境的现场进行检测等特点, 适用于分子 POCT 现场检测, 目前在分子诊断领域具有广阔的应用前景 (表 2)。

2015 年 Son 等^[61] 通过 λ -DNA 的扩增验证了基于金纳米膜的 upPCR 的方法。通过 E-Gel 2% 琼脂糖凝胶和 SYBR Safe 可视化扩增后与台式热循环仪 (Bio-Rad C1000) 对比发现, upPCR 能够有效扩增出目的条带, 证明该方法可成功扩增 λ -DNA。扩增结果与商用台式热循环仪的扩增结果一致, 验证了该系统的实用性和对核酸扩增的适用性。2016 年 Son 等^[62] 引入两个平行的金纳米膜形成 3D PCR 室, 成功地扩增了从非小细胞肺癌细胞 (NSCLC, H1975) 制备的 c-MET cDNA。该方法可以在 4~10 min 内完成 30 个 PCR 热循环, 并可以在 15 min 内扩增低至 2×10^6 拷贝/L 的核酸浓度, 比传统 PCR 的总反应时间减少了 70%~85%, 显示 upPCR 对异质生物样品的实用性。GNA Biosolutions 公司将 upPCR 技术用于检测埃博拉病毒^[77], 该技术所使用的设备为 Pharos 400, 通过激光脉冲对所有 cDNA 立即扩增并实时荧光探针检测。该方法可以检测样品中最低 6×10^7 拷贝/L 的埃博拉病毒 RNA, 为快速诊断埃博拉病毒提供方法。该公司还采用 Pharos V8 设备对 MRSA (耐甲氧西林金黄色葡萄球菌) 的 *mecA* 抗性基因进行检测^[38], 在 100 μ l 的反应体积中可以检测到从 MRSA 基因组 DNA 中纯

化的 10 拷贝的 *mecA*。Muller 等^[40] 使用 Pharos Micro 检测鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*), 使用 *pla* 基因作为靶标, 整个运行可在 14 min 内完成。纯化 DNA 每次反应的 LOD (95%) 为 434 拷贝, 对目标基因的测定可实现较低拷贝数, 验证了该技术的有效性。

2021 年 Zwirgmaier 等^[64] 将 upPCR 技术用于模式样本检测, 开发了一种逆转录 upPCR 检测 RNA 靶标的方法, 无需事先提取 RNA 便可直接从拭子样本中检测 SARS-CoV-2。该方法使用的仪器为 Pharos Micro, 阳性样本可在 15 min 内被检测到。整个运行在 40 min 内完成, 检测限为 4.9×10^6 拷贝/L。

2022 年 Sia 等^[39] 通过使用 LightSpeed 仪器检测以不同病毒载量掺入人类唾液中的灭活 SARS-CoV-2 病毒颗粒 (BEI Resources), 将 upPCR 技术应用于临床样本检测。包括 RT-PCR 热循环的所有步骤在内, 该技术平均运行时间为 17.9 min。实时设置可以成功检测出低至每毫升 4 425 个拷贝的病毒浓度。为进一步分析等离子 RT-qPCR 的定量能力, 该团队测试了包括 10 个阳性和 9 个阴性在内的 19 个人类唾液样本, 将不同病毒检测浓度的 C_t 值与在实验室 PCR 上运行的样本进行了比较, 证明了在该仪器中进行定量分析的潜力。该团队还通过测试 49 个经鼻收集的人体临床标本 (20 个阳性和 29 个阴性), 在同一管中同时检测到两 COVID 目标: N1 和 N 基因。并与在基于实验室的 PCR 仪器上运行的相同样品的 C_t 值相比, 进一步说明这种方法的多功能性和广泛的适用性。

Table 2 Practical application of ultra-fast pulse-controlled PCR technology
表 2 超快脉冲控制PCR技术的实际应用

检测靶标	加热方式	是否样本提取	灵敏度/ (拷贝 · L ⁻¹)	检测速度/min	仪器	参考文献
c-MET cDNA	金纳米薄膜	是	2×10^6	15	光子PCR热循环仪	[62]
埃博拉病毒 (Ebola virus)	金纳米颗粒	是	6×10^7	15	Pharos 400	[77]
MRSA	金纳米颗粒	是	1×10^5	15	Pharos V8	[38]
鼠疫杆菌 (<i>Yersinia pestis</i>)	镀金钨丝	否	未提及	14	Pharos Micro	[40]
SARS-CoV-2	镀金钨丝	否	4.9×10^6	15	Pharos Micro	[64]
SARS-CoV-2	金纳米棒	否	4.4×10^6	22~23	LightSpeed	[39]

5 总结与展望

qPCR 由于其快速、高精度、技术成熟、可定量检测等优点牢牢占据着国内外市场, 市场应用发

展成熟, 在疾病筛查领域被广泛使用。且随着技术的发展和进步, 中国的 qPCR 检测仪器、设备及检测试剂已在一定程度上实现国产代替, 在未来 10 年内 qPCR 仍将是大型集中检测的主流技术。但

qPCR技术在实验室和非医疗环境中进行基因识别扩增时, 需要从DNA样品制备和最终扩增子检测和量化的过程, 以及对检测试剂、设备、场地、操作人员要求较高, 难以做到大规模快速筛查, 也不适合基层医疗机构及家庭检测。

等温扩增技术是一系列恒温分子诊断技术的统称, 包括LAMP、RCA、RPA、SDA等, 以其设备简单、反应快速等优势, 在分子POCT领域崭露头角, 以SARS-CoV-2检测为例, 国外推出了一系列基于恒温扩增技术的快检产品, 包括美国Lucira Health公司开发的Lucira COVID-19一体化试剂盒, Cue Health公司开发的Cue's COVID-19 Diagnostic Test, Detect公司开发的Detect COVID-19 Test等。已形成几十亿美元的销售额, 等温扩增在未来分子POCT场景中具有重大应用潜力, 但等温扩增技术目前也存在一系列缺点, 比如较难兼容多重检测体系、假阳性较高、试剂稳定性不高(等温扩增大多采用中温酶)、灵敏度不够、试剂常温储存的冻干技术缺乏等。

upPCR技术在继承了常规qPCR的兼容多重检测、灵敏度高、试剂稳定性好等优势的基础上, 也兼具了等温扩增的反应快速、设备简单等优点, 在未来分子POCT领域中具有很大应用潜力。此外, 在转基因检测市场上, 常规qPCR检测技术复杂且昂贵, 而upPCR技术操作简单、成本低, 可对转基因成分准确定量检测, 使其在转基因检测市场上具有较强的竞争力。可以预见, 在未来发展中, upPCR及多种等温扩增技术有可能与qPCR技术以互补的形式存在于市场: qPCR由于其特异性高、检测范围宽、可定量检测等特点, 在大型医院、第三方检验机构、科研实验室等大型专业终端场景中仍然长期占据主要市场; 而upPCR及等温扩增技术有望成为家庭自检、社区快检等分子POCT领域中的主要技术。

值得注意的是, upPCR技术目前仍处于技术研发阶段, 对扩增过程中所使用的核心酶仍具有改进空间, 相较于普通PCR, upPCR技术检测速度更快, 在扩增过程中需要具有热稳定性更高、延伸速率更快的聚合酶。通过对核心酶分子进行改造, 提升酶分子的热稳定性及延伸速度对upPCR技术尤为重要, 目前改造酶分子的方式主要是化学修饰法、通过基因工程技术生产酶和通过蛋白质工程技术改造酶。而近年来生物信息学的发展, 使得关于酶序列和结构的数据更易获取, 通过计算机辅助设

计和基于结构信息的分析使得现有的酶分子定向进化技术得到进一步发展, 使用计算机辅助联合方法对热稳定聚合酶进行改造将成为upPCR技术研发的一种新方法。在探针法的upPCR中, 除了要求酶具有很高的延伸速度, 还要求酶的5'→3'外切酶结构域能够更快速地切割荧光探针, 目前这方面的分子改造仍缺乏报道, 因此提升5'→3'外切酶活性是后续对快速Taq DNA聚合酶进行研发的一个重点方向。除热稳定聚合酶外, 逆转录酶的分子改造对提升upPCR技术的灵敏性和检测速度也至关重要。upPCR反应过程需要高度耐热性的逆转录酶, 如何提高逆转录酶的耐热性, 增强逆转录酶与模板的亲合力, 也是后续研发的重点内容。除此之外, 对局部加热与整体加热、光能加热与电能加热技术的优劣也并未形成定论, 对纳米金批量制备技术、引物-纳米金偶联技术, 以及超快速核心酶的开发也较为薄弱, 因此upPCR技术离真正的商业化成熟还有较大距离。upPCR技术相应的配套设备的开发也比较少, 这使得upPCR的技术研究缺少必要的硬件工具, 也阻碍了该技术的进步。虽然目前国外已经有少数公司推出了upPCR的商品化解决方案, 但在国内关注并研究该技术的机构仍较少, 期待随着国内分子诊断技术的进步, 未来将会有越来越多的分子POCT新技术被开发出来。

参 考 文 献

- [1] 王振飞, 武颖彩, 贾永峰. 分子诊断技术在新型冠状病毒肺炎防控中的应用进展. 重庆医学, 2020, 49(17): 2811-2815
Wang Z F, Wu Y C, Jia Y F. Medicine in Chongqing, 2020, 49(17): 2811-2815
- [2] Poste G H. Molecular diagnostics: a powerful new component of the healthcare value Chain. Expert Rev Mol Diagn, 2001, 1(1): 1-5
- [3] 陈馨宁, 黄斐, 张春燕, 等. 分子诊断技术在新型冠状病毒核酸检测中的应用及发展. 临床检验杂志, 2021, 39(6): 401-406
Cheng X N, Huang F, Zhang C Y, et al. Journal of Clinical Laboratory Medicine, 2021, 39(6): 401-406
- [4] 朱镭, 朱庆义. 新型冠状病毒及其分子生物学诊断新技术. 中华临床实验室管理电子杂志, 2021, 9(3): 174-181
Zhu L, Zhu Q Y. Chinese Journal of Clinical Laboratory Management, 2021, 9(3): 174-181
- [5] 中国政府网. 我国核酸检测能力达每天5165万管检测能力和可及性不断提升[EB/OL]. 北京: 中国政府网, 2022[2022-12-31]. http://www.gov.cn/xinwen/2022-04/18/content_5685684.htm
Chinese Government Website. China's Nucleic Acid Testing Capacity Has Reached 51.65 Million Tubes per Day, and The Testing Capacity and Accessibility Are Constantly Improving

- [EB/OL]. Beijing: the Central People's Government of the PRC, 2022[2022-12-31]. http://www.gov.cn/xinwen/2022-04/18/content_5685684.htm
- [6] 中国政府网. 全国核酸检测能力较3月初提高200% [EB/OL]. 北京: 中国政府网, 2022[2022-12-31]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-06/25/content_5521722.htm
- Chinese government website. The National Nucleic Acid Detection Capacity Was 200% Higher Than That in Early March [EB/OL]. Beijing: the Central People's Government of the PRC, 2022[2022-12-31]. http://www.gov.cn/xinwen/2020-06/25/content_5521722.htm
- [7] Liu W T, Tong M, Lin F Y, *et al.* Advances of clinical applications of molecular diagnostic techniques. *Lett Biotechnol*, 2020, **31**(2): 240-250
- [8] Su N, Yang L, Liu J, *et al.* Application research progress of gene chip technology in China. *Lett Biotechnol*, 2016, **27**(2): 289-292
- [9] Salk J J, Schmitt M W, Loeb L A. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nat Rev Genetics*, 2018, **19**(5): 269-285
- [10] Kadri S, Long B C, Mujacic I, *et al.* Clinical validation of a next-generation sequencing genomic oncology panel *via* cross-platform benchmarking against established amplicon sequencing assays. *J Mol Diagn*, 2017, **19**(1): 43-56
- [11] 东锐. 聚合酶链式反应技术及应用. 绿色科技, 2018(8): 230-231
- Dong R. *Journal of Green Science and Technology*, 2018(8): 230-231
- [12] Corman V M, Landt O, Kaiser M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 2020, **25**(3): 2000045
- [13] Silva Júnior J V J, Merchoratto I, de Oliveira P S B, *et al.* End-point RT-PCR: a potential alternative for diagnosing coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Virol Methods*, 2020, **288**: 114007
- [14] Mullis K B, Faloona F, Scharf S J, *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986, **51**(01): 263-273
- [15] Yu M, Cao Y, Ji Y. The principle and application of new PCR Technologies. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 2017, **100**: 22-25
- [16] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988, **239**(4839): 487-491
- [17] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, *et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 1993, **11**(9): 1026-1030
- [18] Tang J, Khan S, Delmiglio C, *et al.* Sensitive detection of Tomato ringspot virus by real-time TaqMan RT-PCR targeting the highly conserved 3'-UTR region. *J Virol Methods*, 2014, **201**: 38-43
- [19] 姜文灿, 岳素文, 江洪, 等. TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 的应用和研究进展. 临床检验杂志, 2015, **4**(1): 797-805
- Jiang W C, Yue S W, Jiang H, *et al.* *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2015, **4**(1): 797-805
- [20] Schneeberger C, Speiser P, Kury F D, *et al.* Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl*, 1995, **4**(4): 234-238
- [21] Vogelstein B, Kinzler K W. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(16): 9236-9241
- [22] Zhu H, Zhang H, Ni S, *et al.* The vision of point-of-care PCR tests for the COVID-19 pandemic and beyond. *Trends Anal Chem*, 2020, **130**: 115984
- [23] Dickson E M, Zambon M, Pebody R G, *et al.* Do point-of-care tests (POCTs) offer a new paradigm for the management of patients with influenza?. *Eurosurveillance*, 2020, **25**(44): 1900420
- [24] Kumar A, Parihar A, Panda U, *et al.* Microfluidics-based point-of-care testing (POCT) devices in dealing with waves of COVID-19 pandemic: the emerging solution. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, **5**(5): 2046-2068
- [25] Keshav V, Scott L E, David A, *et al.* Antigen-based point of care testing (POCT) for diagnosing SARS-CoV-2: assessing performance. *Methods Mol Biol*, 2022, **2452**: 45-62
- [26] Dugerdil A, Flahault A. Update on rapid diagnostic testing for SARS-CoV-2. *Anaesth Crit Care Pain Med*, 2022, **41**(4): 101114
- [27] Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M. Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation-rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(3): e19
- [28] Ali M M, Li F, Zhang Z, *et al.* Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem Soc Rev*, 2014, **43**(10): 3324-3341
- [29] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, *et al.* DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*, 2006, **4**(7): 211-212
- [30] Behrmann O, Bachmann I, Spiegel M, *et al.* Rapid detection of SARS-CoV-2 by low volume real-time single tube reverse transcription recombinase polymerase amplification using an exo probe with an internally linked quencher (exo-IQ). *Clin Chem*, 2020, **66**(8): 1047-1054
- [31] Walker G T, Little M C, Nadeau J G, *et al.* Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(1): 392-396
- [32] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12): e63
- [33] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?. *Cells*, 2021, **10**(8): 1931
- [34] Thi V L D, Herbst K, Boerner K, *et al.* A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med*, 2020, **12**(556): eabc7075
- [35] 姜苏, 李一荣. 等温扩增技术的原理及应用. 中华检验医学杂志, 2020, **43**(5): 591-596
- Jiang S, Li Y R. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2020, **43**(5): 591-596
- [36] Stehr J, Hrelescu C, Sperling R A, *et al.* Gold nanostoves for microsecond DNA melting analysis. *Nano Lett*, 2008, **8**(2): 619-623
- [37] Roche P J, Beitel L K, Khan R, *et al.* Demonstration of a plasmonic

- thermocycler for the amplification of human androgen receptor DNA. *Analyst*, 2012, **137**(19): 4475-4481
- [38] Ullerich L, Campbell S, Krieg-Schneider F, *et al.* Ultra-fast PCR technologies for point-of-care testing. *J Lab Med*, 2017, **41**(5): 239-244
- [39] Blumenfeld N R, Bolene M A E, Jaspan M, *et al.* Multiplexed reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction using plasmonic nanoparticles for point-of-care COVID-19 diagnosis. *Nat Nanotechnol*, 2022, **17**(9): 984-992
- [40] Muller K, Dassen S, Holowachuk S, *et al.* Pulse-controlled amplification-a new powerful tool for on-site diagnostics under resource limited conditions. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, **15**(1): e0009114
- [41] Li H, Huang J, Lv J, *et al.* Nanoparticle PCR: nanogold-assisted PCR with enhanced specificity. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, **44**(32): 5100-5103
- [42] 刘清岱, 王金菊, 王勇. 纳米粒子 PCR 研究进展. *生物学通报*, 2010, **45**(2): 1-3
Liu Q D, Wang J J, Wang Y. *Bulletin of Biology*, 2010, **45**(2): 1-3
- [43] Li M, Lin Y C, Wu C C, *et al.* Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticles. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(21): e184
- [44] Sztandera K, Gorzkiewicz M, Klajnert-Maculewicz B. Gold nanoparticles in cancer treatment. *Mol Pharm*, 2019, **16**(1): 1-23
- [45] Ignatov K B, Barsova E V, Fradkov A F, *et al.* A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. *Biotechniques*, 2014, **57**(2): 81-87
- [46] Hrelescu C, Stehr J, Ringler M, *et al.* DNA melting in gold nanostove clusters. *J Phys Chem C*, 2010, **114**(16): 7401-7411
- [47] Shi M, Wang Z. Valence, Size and shape control of gold nanoparticles under synthesized by electron-assisted reduction. *Chem Asian J*, 2020, **15**(22): 3904-3912
- [48] Liu K, He Z, Curtin J F, *et al.* A novel, rapid, seedless, *in situ* synthesis method of shape and size controllable gold nanoparticles using phosphates. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 7421
- [49] Hussain M H, Abu Bakar N F, Mustapa A N, *et al.* Synthesis of various size gold nanoparticles by chemical reduction method with different solvent polarity. *Nanoscale Res Lett*, 2020, **15**(1): 140
- [50] Kalimuthu K, Cha B S, Kim S, *et al.* Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: a review. *Microchem J*, 2020, **152**: 104296
- [51] Nedyalkov N N, Imamova S E, Atanasov P A, *et al.* Interaction of gold nanoparticles with nanosecond laser pulses: nanoparticle heating. *Appl Surface Sci*, 2011, **257**(12): 5456-5459
- [52] Elahi N, Kamali M, Baghersad M H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review. *Talanta*, 2018, **184**: 537-556
- [53] Kumar D, Soni R K, Ghai D P. Pulsed photoacoustic and photothermal response of gold nanoparticles. *Nanotechnology*, 2019, **31**(3): 035704
- [54] Lou X, Zhang Y. Mechanism studies on nanoPCR and applications of gold nanoparticles in genetic analysis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, **5**(13): 6276-6284
- [55] Baffou G, Quidant R. Thermo-plasmonics: using metallic nanostructures as nano-sources of heat. *Laser Photonics Rev*, 2013, **7**(2): 171-187
- [56] Xiang Z, Wang K, Zhang W Z, *et al.* Gold nanoparticles inducing osteogenic differentiation of stem cells: a review. *J Cluster Sci*, 2017, **29**: 1-7
- [57] Lou X, Zhang Y. Mechanism studies on nanoPCR and applications of gold nanoparticles in genetic analysis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, **5**(13): 6276-6284
- [58] Tabatabaei M, Islam R, Ahmed M. Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: a review. *Anal Chim Acta*, 2021, **1143**(25): 250-266
- [59] Cheong K H, Yi D K, Lee J G, *et al.* Gold nanoparticles for one step DNA extraction and real-time PCR of pathogens in a single chamber. *Lab Chip*, 2008, **8**(5): 810-813
- [60] Huang J, Zhang X D, Wang C, *et al.* Size and surface effect of gold nanoparticles (AuNPs) in nanoogold-assisted PCR. *Surface Rev Lett*, 2008, **15**: 757-762
- [61] Son J H, Cho B, Hong S, *et al.* Ultrafast photonic PCR. *Light Sci Appl*, 2015, **4**(7): e280
- [62] Son J H, Hong S, Haack A J, *et al.* Rapid optical cavity PCR. *Adv Healthc Mater*, 2016, **5**(1): 167-174
- [63] Lee J H, Cheglakov Z, Yi J, *et al.* Plasmonic photothermal gold bipyramid nanoreactors for ultrafast real-time bioassays. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(24): 8054-8057
- [64] Zwirgmaier K, Weyh M, Kruger C, *et al.* Rapid detection of SARS-CoV-2 by pulse-controlled amplification (PCA). *J Virol Methods*, 2021, **290**: 114083
- [65] Hurst S J, Lytton-Jean A K, Mirkin C A. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal Chem*, 2006, **78**(24): 8313-8318
- [66] Baumann V, Friedrich Röttgermann P J, Haase F, *et al.* Highly stable and biocompatible gold nanorod-DNA conjugates as NIR probes for ultrafast sequence-selective DNA melting. *RSC Adv*, 2016, **6**(105): 103724-103739
- [67] Rödiger S, Liebsch C, Schmidt C, *et al.* Nucleic acid detection based on the use of microbeads: a review. *Microchim Acta*, 2014, **181**(11-12): 1151-1168
- [68] Zhang D, Yu X, Wu L, *et al.* Ultrasensitive electrochemical detection of Pb²⁺ based on DNAzyme coupling with exonuclease III-assisted target recycling. *J Electroanal Chem*, 2021, **882**: 114960
- [69] Harris S J, Jones D B. Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci*, 1997, **54**(3): 166-173
- [70] Bhadra S, Maranhao A, Paik I, *et al.* One-enzyme reverse transcription qPCR using taq DNA polymerase. *Biochemistry*, 2020, **59**(49): 4638-4645
- [71] Yamagami T, Matsukawa H, Tsunekawa S, *et al.* A longer finger-subdomain of family A DNA polymerases found by metagenomic analysis strengthens DNA binding and primer extension abilities. *Gene*, 2016, **576**(2): 690-695

- [72] 王会文, 赵晓瑜, 静天玉. 几种耐热DNA聚合酶的比较. 生物学杂志, 2001(3): 36-39
Wang H W, Zhao X Y, Jing T Y. Journal of Biology, 2001(3): 36-39
- [73] de Araujo C B, Calderano S G, Elias M C. The dynamics of replication in trypanosoma cruzi parasites by single-molecule analysis. J Eukaryot Microbiol, 2019, **66**(3): 514-518
- [74] Davidson J F, Fox R, Harris D D, *et al.* Insertion of the T3 DNA polymerase thioredoxin binding domain enhances the processivity and fidelity of Taq DNA polymerase. Nucleic Acids Res, 2003, **31**(16): 4702-4709
- [75] Wang Y, Prosen D E, Mei L, *et al.* A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*. Nucleic Acids Res, 2004, **32**(3): 1197-1207
- [76] Moser M J, DiFrancesco R A, Gowda K, *et al.* Thermostable DNA polymerase from a viral metagenome is a potent RT-PCR enzyme. PLoS One, 2012, **7**(6): e38371
- [77] Rebuffo-Scheer C, Ullerich L, Joachim S, *et al.* Rapid detection of cDNA from Ebola virus isolate by laser PCR. Sensors (Basel), 2015, **15**(4): 8605-8614

Applications of Ultra-fast Pulse-controlled PCR (upPCR)*

JING Wei^{1,2)}, MA Fu-Qiang^{2)**}

⁽¹⁾*School of Biomedical Engineering (Suzhou), Division of Life Science and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;*

⁽²⁾*Medical Enzyme Engineering Center, CAS Key Lab of Bio-Medical Diagnostics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China)*

Abstract Under the background of precision medicine and personalized medicine, molecular diagnosis is more and more widely applied in pathogen detection, tumor diagnosis, eugenics and fertility, environmental protection, food safety and other fields, and continues to develop in the direction of molecular point-of-care testing (POCT) with advantages of fast and accurate, low-cost, simple operation. Ultra-fast pulse-controlled PCR (upPCR) is an extension and upgrade of real-time quantitative PCR (qPCR) technology, which uses energy pulses to control metal heating elements (mainly gold nanoparticles) in amplification reactions to complete the rapid heating of the local microenvironment of the solution within a few hundred microseconds, and realize the melting and denaturation of template DNA; after stopping heating, the reaction microenvironment can be rapidly cooled by the surrounding solution down to the extension temperature of the polymerase to achieve amplification of template DNA. A single denaturation-amplification cycle of upPCR is only 1.5–5 s, which is much faster than traditional PCR (about 90 s per cycle), and can thus greatly speed up the PCR reaction. On the basis of retaining the advantages of traditional qPCR such as high sensitivity, high specificity and multiplex detection, ultra-fast pulse control PCR technology adds new advantages such as ultra-fast reaction time (less than 15 min) and simple operation, which is very suitable for molecular POCT scenarios such as home detection and community screening. This paper mainly reviews the principle, core raw materials, equipments and applications of upPCR technology in molecular diagnosis, and discusses the advantages and disadvantages of this technology, as well as future technology development and application trends.

Key words molecular diagnosis, ultra-fast pulse-controlled PCR, gold nanoparticles, molecular POCT

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0513

* This work was supported by grants from Member Project of Youth Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (2022327), The National Natural Science Foundation of China (31900911), Jiangsu Provincial Entrepreneurship and Innovation Talent Project (JSJCRC2021548), and Green Bio-manufacturing Project of the Ministry of Science and Technology (2021YFC2104200).

** Corresponding author.

Tel: 86-512-69588088, E-mail: mafuqiang318@sibet.ac.cn

Received: October 30, 2022 Accepted: January 9, 2023