

PCR 增强剂在核酸体外扩增检测技术的研究进展

徐蕾¹, 肖桂清², 盛晓菁¹, 戚智青^{1*}, 刁勇^{1*}

1. 华侨大学生物医学学院, 福建 泉州 362021;
2. 福建省银丰干细胞工程有限公司, 福州 350004

摘要: 在各种高致病性病原体、禽流感病毒、食源性微生物等引起的疾病随时大规模流行的背景下, 利用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术对第一例或第一波病例的快速实验室诊断显得尤为重要, 同时发展出多种以 PCR 技术为基础的检测技术以便更加快速、高通量、敏感地对疾病进行诊断、预防或预测。然而, 在实际病原体检测中, 常常出现灵敏度低、准确性差的结果。PCR 增强剂是在 PCR 及 PCR 衍生技术中添加的一类物质, 其可从产率、特异性、灵敏度等方面提高核酸扩增性能, 从而优化核酸检测, 解决病原体检测的应用瓶颈, 为第一例病原体检出节约宝贵的时间。结合以 PCR 为基础的核酸体外扩增检测技术对 PCR 增强剂在其中的应用、优缺点、作用机理进行介绍, 以期为病原体核酸检测的实际应用提供一些参考。

关键词: PCR 增强剂; 核酸检测; 纳米材料

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2019.0105

Research Progress on PCR Enhancer in Nucleic Acid *in vitro* Amplification Detection Technology

XU Lei¹, XIAO Guiqing², SHENG Xiaojing¹, QI Zhiqing^{1*}, DIAO Yong^{1*}

1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Fujian Quanzhou 362021, China;
2. Fujian Yinfeng Stem Cell Engineering Co., Ltd, Fuzhou 350004, China

Abstract: Under the background of the widespread prevalence of diseases caused by various highly pathogenic pathogens, avian influenza viruses, food-borne microorganisms, etc., it is particularly important to use PCR technology for rapid laboratory diagnosis of the first or first wave of cases. At the same time, a variety of PCR-based detection technologies have been developed to diagnose, prevent or predict diseases more quickly, with high throughput and sensitivity. However, in the detection of actual pathogens, the results of low sensitivity and poor accuracy often occur, so the PCR enhancer was added in the PCR amplification system. The PCR enhancer could improve the performance of PCR in terms of yield, specificity, sensitivity, etc. so as to optimize nucleic acid detection, solve the application bottleneck of pathogen detection, and save valuable time for the first pathogen detection. This review introduced the application and mechanism of PCR enhancer in combination with PCR-based nucleic acid *in vitro* amplification detection technology, in order to provide some reference for the practical application of nucleic acid detection.

Key words: PCR enhancer; nucleic acid detection; nanophase materials

当前由生物类因素 (细菌、寄生虫、病毒等) 造成的各种人类、动植物严重流行病, 例如埃博拉病毒^[1]、寨卡病毒^[2]、中东呼吸综合征冠状病毒^[3]和新型冠状病毒^[4], 已引起各国政府及媒体的普遍关注, 但目前尚缺少有效的病原体疫苗及

治疗措施, 若不能对第一例疾病及时诊断, 不仅会造成经济上的损失, 更甚者直接威胁生命。对病原体的检测, 传统的方法是通过体外培养病原体进行镜检, 但该方法耗时长、操作繁琐、误差大, 对操作人员要求也比较高, 还存在一些难以培养的

收稿日期: 2019-11-05; 接受日期: 2019-12-24

基金项目: 福建省科技计划高校产学研合作项目 (2018Y4009; 2016N5007); 华侨大学研究生科研创新基金资助项目 (17013071015); 泉州市科技计划高层次人才项目 (2018C042R)。

联系方式: 徐蕾 E-mail: 1772766997@qq.com; * 通信作者 戚智青 E-mail: zqqi@hotmail.com; 刁勇 E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

微生物检测困难等问题^[5]。而利用免疫学方法进行的酶标法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测病原体存在“窗口期”较长易造成漏检、免疫静默感染以及人工操作误差等问题^[6],因此以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)为代表的体外核酸检测技术(nucleic acid test, NAT)因其简单、快速、安全等优点被广泛应用于细菌、真菌、病毒、寄生虫、支原体、衣原体的快速检测和鉴定以及疾病的早期筛查与诊断中^[7]。

但目前 PCR 及 PCR 衍生技术的实际操作中,仍有一些难以克服的困难,如非特异性扩增、甚至假阴性结果,导致 NAT 的灵敏度、特异性和准确性差^[8-9],这时往往需要添加一些外部物质来提高 NAT 的灵敏度、特异性和准确性,而这类物质统称为 PCR 增强剂(PCR enhancers)。现在很多公司也相继开发出相关 PCR 增强剂产品,如 PCRx Enhancer System (Thermo Fisher Scientific)、AmpFLSTR™ PCR Enhancer(Thermo Fisher Scientific)、MasterAmp™ 10X PCR Enhancer(Epicentre)、PCR Enhancer(庄盟)。PCR 增强剂作为一种核酸扩增优化的方式越来越被人们所认可,这种新技术进一步推动了以 PCR 为基础的各种检测方法的广泛应用,对于核酸检测中的应用“瓶颈”得到了一定程度的解决,并提高了潜伏期的病原体检测的检出限。

1 以 PCR 为基础的核酸检测技术

PCR 作为分子生物学领域最重要的技术,其允许在不同的 DNA 序列(例如总基因组 DNA)中选择性地扩增特定的目标 DNA 序列^[10]。DNA 分子的拷贝数在每一个扩展步骤中加倍最终产生数百万拷贝,因此 PCR 技术最早被开发用于病原体的检测和亚型鉴定,如今以 PCR 为基础而衍生出来的各类 PCR 技术因高通量、核酸定量、快速等特点也渐渐成为核酸检测的主流。

迄今为止,PCR 衍生出的核酸检测技术主要有实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)、巢式 PCR、数字 PCR(digital PCR, dPCR)。RT-PCR 使用荧光染料将扩增和检测结合起来,依赖于扩增过程中产生的荧光信号定量分析^[11]。RT-PCR 检测方法已经用于病原体的检测,成功

对利什曼原虫^[12]、B 族链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)^[13]、基孔肯雅病毒(*Chikungunya virus*, CHIKV)^[14]等进行鉴定。RT-PCR 相较于常规 PCR 交叉污染显著降低,但 RT-PCR 最大的问题是标准曲线重复性差,定量范围有限。巢式 PCR 又称为多重 PCR,实现了对未知病原体或多种病原体的快速检测^[15]。已有报道利用巢式 PCR 技术来对 447 个临床样品中细菌脑膜炎易感病原体检测,约 3 h 就可得到临床结果,而微生物培养法需 3~7 d^[16-17]。多重 PCR 技术价格低廉、灵敏度高、特异性强,可检测少量 DNA 样品,但多个引物间的配对、相互竞争等均会影响扩增效果,易出现非特异性扩增,需要对实验进行严密的设计。近年来,数字 PCR(digital PCR, dPCR)作为一种新兴的核酸扩增检测技术以优异的检测灵敏度、特异性和重现性在核酸检测中越来越受到重视^[18],dPCR 可敏感地检测脑脊液和外周血单核细胞样本中人体免疫缺陷病毒核酸^[19-21]。dPCR 不存在 RT-PCR 的标准曲线对结果有影响等问题^[22],但因其价格较高尚未广泛应用,在检测低拷贝基因时,dPCR 的灵敏性低也成为核酸检测的限制。

目前,常规 PCR 已经成为最普及使用的核酸检测方法;在单基因检测上 RT-PCR 也得到应用;dPCR 也是目前最灵敏、最高通量的检测方案,实现了同时对多位点基因检测筛选;同时开发出各种新型核酸检测技术如滚环扩增(rolling-circle amplification, RCA)、基因芯片以满足更加灵敏、特异、快速、高通量、低成本的检测需求。

2 核酸检测技术存在的问题

在核酸检测的应用中,利用 PCR 及其衍生技术直接诊断需要高水平的敏感性和特异性,检测的实际情况往往达不到要求,经常出现如下状况。
①灵敏度低。对于早期疫病的诊断,这时标本中病原体的核酸量是极少的,PCR 可检测 pg 级别的核酸,但有时 DNA 含量可能极低且不足以进行 PCR,造成了检测的敏感度较低。
②特异性差。检测中的实验结果经常出现多个非特异性条带、条带弥散、假阳性或假阴性结果,这时特异性差可能是由模板造成的。一方面,用于 PCR 的 DNA 样本往往不是 DNA 扩增的最佳来源,样本中存在

PCR抑制剂^[23-24],而纯化过程可能导致目标DNA的丢失,费时费力,增加成本,涉及到多个样本的操作还会增加交叉污染的风险;另一方面,DNA的模板也常含有GC含量高的序列^[25],退火时单链DNA容易形成局部二级结构或发夹结构^[26],并可能导致DNA聚合酶扩增提前停止,或者模板序列高度重复序列、同源重组序列,这些情况都会造成DNA扩增失败,严重影响核酸的特异性正确检测。③保真度低。PCR的保真度往往与DNA聚合酶有关,最常用的Taq DNA聚合酶的错误率为 $(2.7 \times 10^{-4}) \pm (0.8 \times 10^{-4})$,现在市面上出现了价格昂贵的高保真Phu DNA聚合酶、Kod DNA聚合酶使得保真度进一步提高,但在扩增长的片段(>10 kb)时,错配率升高,持续合成能力降低。在基于PCR的病原体诊断中,这些缺陷会成为障碍,需要对PCR技术优化,而PCR增强剂是一种有可能绕过这些限制的优化方法。

3 PCR增强剂在以PCR为基础核酸检测中的研究及应用

PCR增强剂是可以改善PCR及PCR衍生技术的灵敏度、特异性、保真度等的一类添加剂,可以显著改善假阳性、假阴性或无法扩增等情况,使准确度提高,检测的最低检出限提高,甚至当调整循环数、镁离子、引物、dNTP、DNA聚合酶和DNA模板浓度等优化方案无法解决问题时,能够提出一种更有效的策略,这种策略突破了原有检测技术的缺陷,对于病原体正确、快速的诊断具有重要意义。目前关于PCR增强剂存在很多类型,不同类型的PCR增强剂也针对不同核酸扩增问题提出了一定的解决方案。

3.1 小分子化学类PCR增强剂

小分子化学类PCR增强剂是最早出现的增强剂,其中二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)^[27]和n,n,n-三甲基甘氨酸(又称甜菜碱)^[28]是最常用的增强剂。DMSO经常作为PCR标准扩增优化的一部分;甜菜碱作为渗透保护剂,与甘油的功能类似,可以防止DNA聚合酶变性,QIAGEN和Clontech公司PCR增强剂产品也被证明含有甜菜碱^[29]。如今也发现了更多化学物质有此作用,在PCR扩增中加入多种增强剂来提高PCR产物的产率、特异性和一致性,这其中包括

甲酰胺、甘油、四甲基氯化铵等^[30],这些添加剂都对PCR及相关PCR技术扩增产生了有益的影响,而复合型PCR增强剂是将多种PCR增强剂按一定比例混合而成的一种新型PCR增强剂,对PCR的促进效率更高。如利用甘油、甲酰胺、DMSO和甜菜碱的PCR增强剂组合对含高GC的伪狂犬病毒进行PCR,使得之前无法扩增的PCR可以扩增,并且错配率有了明显的降低^[31]。Horkov等^[32]在含有PCR抑制物(如肝素、血红蛋白)的全血中扩增基因片段,通过不同增强剂组合发现1,2-丙二醇和海藻糖组合可以强而特异地进行RT-PCR。其中,海藻糖可通过保护酶免受血液抑制剂的干扰而起作用;1,2-丙二醇可以降低dsDNA片段的退火温度扩增富含GC的模板,为粗血样中富含GC核酸的RT-PCR提供了一种通用增强剂,并且在不同荧光探针中也可以使用。

小分子化学PCR增强剂在商业上容易获得且价格低廉,商业化PCR增强剂也多是以小分子化学物质作为主要成分,这些添加剂虽然可以提高PCR反应的产率、特异性、保真度,但它们对DNA解链温度的影响改变了特定引物模板体系的最佳退火温度,因此可能需要对热循环参数进行优化。同时,因不能预测哪种试剂可能对特定的目标有用,所以需要测试几种不同的添加剂。

3.2 纳米材料类PCR增强剂

随着纳米技术的出现,纳米材料由于其大的表面积和体积比、表面电荷密度和良好的热导率等优异的物理化学特性以及与单链DNA或蛋白质结合的特点常用来辅助PCR,这种方法被称为纳米-聚合酶链式反应(nano-PCR)。迄今为止,各种纳米系统已被报道用于增强PCR反应^[33-37],例如金纳米颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)、氧化石墨烯(graphene oxide, GO)、量子点(quantum dots, QDs)、上转换纳米粒子(upconversion nanoparticles, UCNPs)、碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)以及其他金属纳米粒子和纳米复合材料。2005年上海交通大学学者首次利用AuNPs改善了易出错的两轮PCR,并抑制了多重PCR的非特异性扩增,与化学类PCR增强剂不同,添加AuNPs即使在非最佳退火温度下也能获得一个单一的产物带^[38]。目前,基于AgNPs建立了一种检测和鉴别野生型和基因缺失型伪狂犬病毒的

分析方法,检测灵敏度比常规 PCR 提高了 100~1 000 倍^[39]。AgNPs 也第一次被应用于猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 的快速临床检测,最低检出限为 $2.7 \times 10^{-6} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ PEDV^[40]。Cui^[41] 首次报道了 CNTs 在 PCR 中的促进作用,即使在不含 Mg^{2+} 参与的 PCR 反应情况下也获得了相似结果。

纳米材料不仅可以作为 PCR 的添加剂,同样也是新型 PCR 技术的主要载体,纳米材料可应用于 PCR 可视化检测、芯片检测、生物传感器。Wang 等^[42] 筛选出 2 种材料 MoS_2 、 WS_2 以增强 SYBR Green I 探针的 RT-PCR 反应信号,结果表明视觉检测的灵敏度可与实时检测结果媲美,同时 MoS_2 、 WS_2 还能抑制非特异性扩增。在基因芯片检测方面,加入 Fe_3O_4 纳米粒子可使 PCR 产率提高 190%^[43],利用 Fe_3O_4 磁性还可快速去除纳米材料。

纳米材料作为一种生物相容性良好的材料,即使在较低的退火温度下,也能提高 PCR 扩增的特异性和灵敏性,而化学类 PCR 增强剂往往需要调整 T_m 值。纳米材料的优良导热性是 PCR 优化的基础,可以快速地提高或降低反应温度,缩短反应时间,以实现病原体的更快速诊断,对疾病控制具有重要意义。但目前在市场上并没有纳米材料 PCR 增强剂相关商品开发,纳米材料复合添加剂的研究也鲜有报道,已有报道称使用 TiO_2 NPs-AgNPs 用于空气中细菌气溶胶的检测,扩增效果明显优于单一纳米类 PCR 增强剂^[44],未来可针对复合型的纳米 PCR 增强剂的研制进一步研究。

纳米材料浓度和大小对 PCR 及衍生技术的扩增也有影响,低浓度的纳米粒子抑制长片段的扩增,高浓度的纳米粒子抑制小片段的扩增,因此在使用时要控制浓度范围。纳米材料辅助 PCR 的另一个问题是如何将纳米材料从 PCR 中分离出来,如低于 20 nm AgNPs 分离需要相当大的离心力,且长时间才使其沉淀,凝胶纯化法是从溶液中去掉纳米材料的一种选择,但对于多个克隆或测序的下游应用来说不是有效的方案。未来的纳米材料可采用涂层或集成 PCR 管,而不是将纳米材料与试剂混合,这种方法可以解决 PCR 产物与纳米材料分离的问题。因此,纳米材料作为一种廉价、高稳定性的物质,在未来的 PCR 及其衍生技术上有很大的应用潜力。

3.3 蛋白质类 PCR 增强剂

在体内的核酸扩增过程中,单链结合蛋白 (single-stranded DNA-binding proteins, SSBs) 以非特异性的方式与单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 结合,保护瞬时形成的 ssDNA 免受核酸酶的攻击,并防止二级结构的形成,在 DNA 复制、重组和修复过程中起重要作用。关于体外核酸扩增的生物类 PCR 增强剂的研究中,人们也将目光转向了 SSBs,与体内 SSBs 不同之处在于用于为核酸检测的 SSBs 必须具有耐热性质,2003 年 Perales 等^[45] 从嗜热杆菌中分离纯化出耐热的 TthSSB,在 PCR 过程中添加 TthSSB,提高了 DNA 扩增的效率和保真度,并使延伸时间缩短。随后 2009 年 Mikawa 等^[46] 发现使用 TthSSB 可使 RCA 中的非特异性 DNA 产物消除。在蛋白质类 PCR 增强剂研究中,T4 基因的 32 蛋白 (GP32) 也是一种单链 DNA 结合蛋白^[47],在促进 PCR 方面有一定的作用。本实验室也在 DNA 结合蛋白的基础上第一次发现了双链 DNA 结合蛋白组蛋白样蛋白 (HU) 也具有 PCR、RCA 增强作用,HU 不仅像 SSB、GP32 结合 ssDNA,对 dsDNA 也有结合,这就意味着 HU 在 PCR 中有着不同的作用机制,同时实验证明 HU 还能抑制非特异性片段的扩增,在实际应用中发现它比 SSB 有更优异的促进作用^[48]。

牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 也是常用的 PCR 增强剂^[49],具有较高的赖氨酸含量,可与酚类化合物和多糖结合,避免聚合酶失活。在血液、粪便和肉的核酸检测中 PCR 抑制剂的存在常使 DNA 聚合酶失活,BSA 的存在降低了抑制物的抑制作用,且老化和降解样品 DNA 含量较低,BSA 提高了 PCR 敏感性。在急性气性咽炎的诊断中,添加 $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA、 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PEG 400、0.5% Tween 20 为 RT-PCR 开发了一种更经济、准确的检测方法^[50]。在防止引物二聚体形成方面,牛凝血酶 (bovine thrombin, BT) 具有独特的效果,通过对人基因组 DNA 和乙型肝炎病毒基因组 DNA 的检测,证实了 BT 的 PCR 增强作用。此外,BT 还能够有效减轻高浓度的纳米材料 (例如 AuNPs 和 GO) 所引起的 PCR 抑制作用,与最受欢迎的 PCR 增强剂 BSA 相比,要达到相同的 PCR 增强水平 BT 比 BSA 所需的浓度低 18~178 倍^[51]。

在复杂的样品中,蛋白质类 PCR 增强剂常作为一种 DNA 聚合酶保护剂,不影响 PCR 的退火温度,在以 PCR 为基础的核酸检测中可能通过模仿体内的复制过程提高灵敏度、特异性,与其他类型的 PCR 增强剂联合使用,更在一定程度上改善其他增强剂引起的高浓度抑制的现象,但蛋白质类 PCR 增强剂添加过多也会产生抑制。蛋白质类 PCR 增强剂的生产制备成本高且不宜于保藏,仅 BSA 因价格低廉成为目前最常用的蛋白质类 PCR 增强剂。由于复杂的 PCR 扩增过程,蛋白质类 PCR 增强剂促进的机理也尚在研究中。

3.4 其他类 PCR 增强剂

除了小分子化学、纳米、蛋白质类 PCR 增强剂,其他类型如元素混合物、核酸类化合物 7-去氮-dGTP (7-deaza-dGTP)^[52]、高聚物聚乙二醇等在核酸检测中也具有 PCR 促进作用。将固体元素混合物金、钛、镍、铋、锑加入多重 PCR,可提高 PCR 的特异性、产率,缩短反应时间。此外,7-去氮-dGTP 是一种 dGTP 类似物^[53],在低 GC 含量(5%~15%)和高 GC 含量(81%~90%)的模板中明显提高扩增,克服了其他类型的 PCR 增强剂在高 AT 模板难于检测的困难。最近,dPCR 中添加 7-去氮-dGTP 有效检测了皮肤黑色素瘤的端粒酶逆转录酶启动子(GC>80%)^[54],而使用 DMSO 作为增强剂无 PCR 产物。这些增强剂在检测中并不常用,但它们具有特殊的性质,往往可以解决其他增强剂无法克服的困难。

4 PCR 增强剂的优化机理

目前关于 PCR 增强剂的优化机理并没有确切的说法,但根据 PCR 增强剂的性质提出以下可能机制:①能以某种方式模拟体内 SSBs 的功能,与 ssDNA 结合,从而使引物与模板之间的错配最小化;②能够与 DNA 模板或 DNA 聚合酶发生强烈的相互作用或结合,从而显著提高聚合酶或 DNA 模板的局部浓度,大大提高 PCR 的特异性和效率;③提高模板与引物之间的特异性结合,降低非特异性或涂片产物形成的机率。不同物质的 PCR 增强剂因性质不同,这 3 种机制可能同时起作用,也可能单独起作用。此外,一些物质还具有特殊的性质,如纳米材料具有良好的热导性可以降低退火温度,蛋白质类 PCR 增强剂 HU 因本身

可以与 dsDNA 结合,在 PCR 扩增过程中的机理更为复杂。关于 PCR 增强剂的作用机理可通过高分辨率透射电镜、毛细管电泳-激光诱导荧光偏振等技术进一步研究,为实际应用提供理论基础。

5 展望

2019 年 12 月爆发的新型冠状病毒公共健康危机激起了人们对流行病检测的关注,而近年来的病原体检测中,依靠 PCR 增强剂使核酸检测更加敏感、准确、快速地进行诊断,在传染病防控、遗传病诊断、农业转基因作物鉴定、法医学分析等领域中建立了一种新型、适用性广、快速的检测系统,在大片段基因合成中 PCR 增强剂也可起到优化作用。目前,市售 PCR 增强剂价格昂贵、具有未知的成分及难以调节单个组分的浓度^[55],同时对 PCR 体系所使用的酶也有所限制,使得产品在基础检验领域并未广泛适用。本文对目前最常用、最新的 PCR 增强剂进行了总结,对一些病原体核酸检测的缺陷也提出了解决策略,未来可针对高爆发的流行病利用一种或几种 PCR 增强剂研制 PCR 及相关衍生技术试剂盒,这对流行病大爆发时核酸的快速、准确检测具有重要意义。

如今也发现纳米材料不仅作为 PCR 增强剂发挥作用,纳米材料也是可视化、基因芯片检测、生物传感器等 PCR 新型技术的重要载体,在未来核酸检测领域有望开发出集特异性、敏感性、准确性为一体的新型检测技术。化学类、纳米类、蛋白质类及其他类 PCR 增强剂在核酸检测中都可提高检测灵敏性、特异性、产率,但 PCR 增强剂的使用也存在缺点,PCR 增强剂的浓度和添加量需要在一定的范围内才起到有益的促进作用,添加超出或少于此范围时会起到抑制作用,同时由于每个样本的模板、实验仪器、场所等情况不同,因此在不同的核酸检测中只能通过大量实验或已有研究添加,不能预测实际情况,所以未来还需开发更加稳定、廉价、应用范围广的 PCR 增强剂以克服核酸检测缺陷的新型核酸检测技术。

参 考 文 献

- [1] VEGA M A D L, CALEO G, AUDET J, *et al.* Ebola viral

- load at diagnosis associates with patient outcome and outbreak evolution[J]. *J. Clin. Invest.*, 2015, 125(12):4421-4428.
- [2] HERNÁNDEZÁVILA J E, PALACIOMEJÍA L S, LÓPEZGATELL H, *et al.*. Zika virus infection estimates, Mexico[J]. *Bull. World Health Organ.*, 2018, 96(5):306-313.
- [3] DONNELLY C A, MALIK M R, ELKHOLY A, *et al.*. World-wide reduction in MERS cases and deaths since 2016[J]. *Emerg. Infect. Dis.*, 2019, 25(9):1758-1760.
- [4] ZHU N, ZHANG D, WANG W, *et al.*. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. *N. Engl. J. Med.*, 2020, 382(8):727-733.
- [5] LEONARDI G P, MITRACHE I, PIGAL A, *et al.*. Public hospital-based laboratory experience during an outbreak of pandemic influenza A (H1N1) virus infections[J]. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, 48(4):1189-1194.
- [6] MOOR A C E, DUBBELMAN T M A R, VANSTEVENINCK J, *et al.*. Transfusion-transmitted diseases: risks, prevention and perspectives[J]. *Eur. J. Haematol.*, 1999, 62(1):1-18.
- [7] MCCULLOUGH J, BIANCO C, BRACEY A, *et al.*. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases[J]. *Transfusion*, 2000, 40(2):143-159.
- [8] KWOK S. Avoiding false positives with PCR [J]. *Nature*, 1989, 339: 237-238.
- [9] YANG S, ROTHMAN R E. PCR-based diagnostics for infectious diseases; uses, limitations, and future applications in acute-care settings[J]. *Lancet Infect. Dis.*, 2004, 4(6): 337-348.
- [10] MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, *et al.*. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro; the polymerase chain reaction[J]. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1986, 51: 263-273.
- [11] ESPY M J, UHL J R, SLOAN L M, *et al.*. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing [J]. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, 19(1): 165-256.
- [12] GALLUZZI L, CECCARELLI M, DIOTALLEVI A, *et al.*. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis [J]. *Parasit Vectors*, 2018, 11(1): 273[2019-12-19]. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>.
- [13] AMENEH K, RANDIS T M, ANNA C, *et al.*. Improving the sensitivity of real-time PCR detection of group B streptococcus using consensus sequence-derived oligonucleotides [J/OL]. *Open Forum. Infect. Dis.*, 2018, doi: 10.1093/ofid/ofy164 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy164>.
- [14] 郑丽兰, 冯海欢, 陈鑫华, 等. CHIKV Real-time PCR 检测方法的建立及试剂盒研发[J]. *中国热带医学*, 2018, 18(4): 345-350.
- [15] HENEGARIU O, HEEREMA N A, DLOUHY S R, *et al.*. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. *Biotechniques*, 1997, 23(3): 504-511.
- [16] ALBUQUERQUE R C, MORENO A C R, DOS SANTOS S R, *et al.*. Multiplex-PCR for diagnosis of bacterial meningitis [J]. *Braz. J. Microbiol.*, 2019, 50(2): 435-443.
- [17] DE ALMEIDA S M, DALLA COSTA L M, SIEBRA C, *et al.*. Validation of multiplex PCR for the diagnosis of acute bacterial meningitis in culture negative cerebrospinal fluid [J]. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 2019, 77(4): 224-231.
- [18] CAO L, CUI X, HU J, *et al.*. Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2017, 90: 459-474.
- [19] KISELINOVA M, PASTERNAK A O, DE SPIEGELAERE W, *et al.*. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA [J/OL]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e85999 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085999>.
- [20] PÉREZ-SANTIAGO J, SCHRIER R D, DE OLIVEIRA M F, *et al.*. Cell-free mitochondrial DNA in CSF is associated with early viral rebound, inflammation, and severity of neurocognitive deficits in HIV infection [J]. *J. Neurovirol.*, 2016, 22(2): 191-200.
- [21] DE OLIVEIRA M F, GIANELLA S, LETENDRE S, *et al.*. Comparative analysis of cell-associated HIV DNA levels in cerebrospinal fluid and peripheral blood by droplet digital PCR [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(10): e0139510 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139510>.
- [22] KUYPERS J J, KEITH R. Applications of digital PCR for clinical microbiology[J/OL]. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, 55(6): JCM.00211-17 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17>.
- [23] AKANE A, MATSUBARA K, NAKAMURA H, *et al.*. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification [J]. *J. Forensic. Sci.*, 1994, 39(2): 362-372.
- [24] ALAEDDINI R. Forensic implications of PCR inhibition—a review[J]. *Forensic. Sci. Int. Genet.*, 2012, 6(3): 297-305.
- [25] SACCONI S, DE SARIO A, DELLA V G, *et al.*. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89(11): 4913-4917.
- [26] MCDOWELL D G, BURNS N A, PARKES H C. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1998, 26(14): 3340-3347.
- [27] WINSHIP P R. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide [J/OL]. *Nucl. Acids Res.*, 1989, 17(3): 1266 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1093/nar/17.3.1266>.
- [28] WEISSENSTEINER T, LANCHBURY J S. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing [J]. *Biotechniques*, 1996, 21(6): 1102-1108.
- [29] FRACKMAN S, KOBBS G, SIMPSON D, *et al.*. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR [J]. *Prom. Notes*, 1998, 65(27-29): 27-29.
- [30] GREEN M R, SAMBROOK J. Polymerase chain reaction [J/OL]. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2019, 2019(6): pdb.top095109 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>.
- [31] 孔会利, 王超, 肖亮, 等. 高 G+C 含量模板进行 PCR 扩增

- 的高效缓冲液体体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2006 (2): 106-109.
- [32] HORÁKOVÁ H, POLÁKOVIČOVÁ I, SHAIK G M, *et al.*. 1, 2-propanediol-trehalose mixture as a potent quantitative real-time PCR enhancer[J/OL]. BMC Biotechnol., 2011, 11(1): 41 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-41>.
- [33] LOU X, ZHANG Y. Mechanism studies on nanoPCR and applications of gold nanoparticles in genetic analysis[J]. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2013, 5(13): 6276-6284.
- [34] SANG F, ZHANG Z, YUAN L, *et al.*. Quantum dots for a high-throughput Pfu polymerase based multi-round polymerase chain reaction (PCR) [J]. Analyst, 2018, 143(5): 1259-1267.
- [35] ZHANG X, ZHUANG H. A carbon nanotube-enhanced real-time immuno-PCR for ultrasensitive detection of AHTN in water [J]. Anal. Biochem., 2018, 544: 22-28.
- [36] WILLIAMS R M, NAYEEM S, DOLASH B D, *et al.*. The effect of DNA-dispersed single-walled carbon nanotubes on the polymerase chain reaction[J/OL]. PLoS ONE, 2014, 9(4): e94117 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094117>.
- [37] HWANG S H, IM S G, HAH S S, *et al.*. Effects of upconversion nanoparticles on polymerase chain reaction[J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e73408 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073408>.
- [38] LI H, HUANG J, LV J, *et al.*. Nanoparticle PCR: nanogold-assisted PCR with enhanced specificity[J]. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2005, 44(32): 5100-5103.
- [39] MA X, CUI Y, QIU Z, *et al.*. A nanoparticle-assisted PCR assay to improve the sensitivity for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies virus and gene-deleted vaccine strains[J]. J. Virol. Methods, 2013, 193(2): 374-378.
- [40] YUAN W, LI Y, LI P, *et al.*. Development of a nanoparticle-assisted PCR assay for detection of porcine epidemic diarrhea virus[J]. J. Virol. Methods, 2015, 220: 18-20.
- [41] CUI D X, TIAN F R, KONG Y, *et al.*. Effects of single-walled carbon nanotubes on the polymerase chain reaction[J]. Nanotechnology, 2004, 15(1): 154-157.
- [42] WANG L, HUANG Z, WANG R, *et al.*. Transition metal dichalcogenide nanosheets for visual monitoring PCR rivaling a real-time PCR instrument[J]. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2018, 10(5): 4409-4418.
- [43] KAMBLI P, KELKAR-MANE V. Nanosized Fe₃O₄ an efficient PCR yield enhancer- comparative study with Au, Ag nanoparticles[J]. Colloids Surf. B Biointerfaces, 2016, 141: 546-552.
- [44] XU S, YAO M. NanoPCR detection of bacterial aerosols[J]. J. Aerosol. Sci., 2013, 65: 1-9.
- [45] PERALES C, CAVA F, MEIJER W J J, *et al.*. Enhancement of DNA, cDNA synthesis and fidelity at high temperatures by a dimeric single-stranded DNA-binding protein[J]. Nucl. Acids Res., 2003, 31(22): 6473-6480.
- [46] MIKAWA T, INOUE J, SHIGEMORI Y. Single-stranded DNA binding protein facilitates specific enrichment of circular DNA molecules using rolling circle amplification [J]. Anal. Biochem., 2009, 391(2): 81-84.
- [47] KREADER C A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(3): 1102-1106.
- [48] 戚智青, 刁勇, 杜民. 一种高效扩增核酸分子的方法: CN. Patent 104388419A [P]. 2018-01-16.
- [49] AL-SOUD W A, RÅDSTRÖM P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat[J]. J. Clin. Microbiol., 2000, 38(12): 4463-4470.
- [50] KOLUKIRIKI M, YILMAZ M, INCE O, *et al.*. Development of a fast and low-cost qPCR assay for diagnosis of acute gas pharyngitis[J/OL]. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 2016, 15(1): 46 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0162-0>.
- [51] ZHANG Y, LI X, ZOU R, *et al.*. Bovine thrombin enhances the efficiency and specificity of polymerase chain reaction[J]. Biotechniques, 2014, 57(6): 289-294.
- [52] LI H, HUANG J, LV J, *et al.*. Method of optimizing amplification in PCR: U.S. Patent 7,651,839 [P]. 2010-1-26.
- [53] GUIDO N, STAROSTINA E, LEAKE D, *et al.*. Improved PCR amplification of broad spectrum GC DNA templates [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(6): e0156478 [2019-12-19]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156478>.
- [54] COLEBATCH A J, WITKOWSKI T, WARING P M, *et al.*. Optimizing amplification of the GC-Rich TERT promoter region using 7-deaza-dGTP for droplet digital PCR quantification of TERT promoter mutations[J]. Clin. Chem., 2018, 64(4): 745-747.
- [55] RALSER M, QUERFURTH R, WARNATZ H J, *et al.*. An efficient and economic enhancer mix for PCR[J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 347(3): 747-751.