

聚合酶链式反应(PCR)技术研究新进展*

曹雪雁¹ 张晓东¹ 樊春海^{2**} 胡 钧^{1,2}

1. 上海交通大学生命科学技术学院纳米生物学实验室, 上海 200240; 2. 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800

摘要 聚合酶链式反应(PCR)在生命科学的研究领域已经得到了广泛的应用。文中对 PCR 技术的一些最新进展进行了简要的综述, 其中包括定量 PCR、纳米 PCR、PCR 芯片、原位 PCR 和免疫 PCR 的原理和应用。

关键词 定量 PCR 纳米 PCR PCR 芯片 原位 PCR 免疫 PCR

1983 年 Mullis 等发明了一种特异性 DNA 体外扩增技术——聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)^[1], PCR 是一种在体外模拟体内 DNA 复制的核酸扩增技术, 以少量的 DNA 分子为模板, 经过变性-退火-延伸的多次循环, 以接近指数扩增的形式产生大量的目标 DNA 分子。短短几十年, 该技术已经成为最常用、也最重要的分子生物学技术之一。其应用范围从基本的基因扩增, 扩展到基因克隆、基因改造、传染病源分析、遗传指纹鉴定等, 甚至扩展到许多非生物领域^[2]。在该领域衍生出的新方法更是层出不穷。本文简述近几年在 PCR 方法研究领域中的新进展, 这些新方法有望弥补现有技术的缺陷, 使 PCR 反应在特异性、速度、定量的准确性等方面得到进一步优化和提高。

1 高灵敏度的定量 PCR 技术

随着应用范围的不断扩大和认识的不加深, 研究者们不再满足于仅仅得知某一特异的 DNA 序列是否存在, 他们还希望对其进行精确的定量, 因而基于经典 PCR 衍生出一种新技术——定量 PCR (quantitative PCR), 以其实时监测、定量准确、灵敏度高、反应后不用电泳检测等优点成为分子生物学研究中的重要工具。

在 PCR 扩增过程中, 随循环扩增产物的不断

增加, 与扩增产物结合的染料所产生的荧光也不断增强, 可通过荧光计检测到的荧光强度来测定扩增产物量。在扩增产物量一定的情况下, 起始模板数越多, 所需循环数就越少^[3]。以循环数为横坐标, 以一系列标准 DNA 的起始拷贝数的对数值为纵坐标, 可得到一条标准曲线。将未知样品的循环数对照这个标准曲线就可以进行定量。

目前定量 PCR 技术的方法有很多种, 主要包括: PCR 产物的直接定量, 有限稀释法, 外对照 PCR 定量, 内对照 PCR 定量, 竞争性 PCR 定量以及荧光定量 PCR。其中又以荧光定量 PCR (fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR) 的方法应用最为广泛。目前应用实时荧光定量 PCR 方法已成功地对水资源及居家办公环境中的大肠杆菌、藻青菌和一些寄生虫进行了检测^[4], 同时在转基因生物鉴定和生物种类鉴定等方面都有了很好的应用^[5,6]。现在常用的荧光定量 PCR 技术有 SYBR 荧光染料技术, Taqman 技术, Amplisensor 技术, Molecular beacon 技术, Lightcycler 技术及复合探针法。

FQ-PCR 技术融合了 PCR 和 DNA 探针杂交技术的优点, (1) 具有 DNA 杂交的高特异性和光谱技术的高精确性, 从而进一步提高目的基因检测的特异性和灵敏度。(2) 光谱技术和计算机技术的联合运用, 具有很好的可视性, 同时减少了工作量。(3) 在全封

2006-10-23 收稿, 2006-11-10 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 10674147, 10335070, 10604061)和上海市科委项目(批准号: 0452nm007, 0652nm006)资助

** 通信作者, E-mail: fchh@sinap.ac.cn; junhu22@hotmail.com

闭条件下进行扩增和产物分析,有效地减少了污染,且无复杂的后续处理过程,快速。(4)结果重现性比较好,定量动态范围高达5个数量级。

随后又出现了一些新型的核酸定量方法,如茎环(stem-loop)RT-PCR,此技术主要分为两步即茎环RT和实时PCR,精确度可达单个细胞或总RNA在25 pg内。该方法最大的难点在于环状引物的设计与合成^[7,8]。

最近,Brandeis大学的Wangh与他人合作发明了一种新技术——指数后线性PCR(linear-after-the-exponential-PCR, LATE-PCR)^[9],是新型的不对称PCR。常规的不对称PCR^[10]用于定量时,信号强度可以加强^[11],但却很少人去用,因为它的效率相比对称PCR的90%只能达到60%—70%^[12]。而LATE-PCR不但在引物设计方面进行了革新,还发明了一种改良的热循环方式,最终可以在较宽范围的引物比例条件下,产生和对称PCR同样的效率,并将信号强度提高80%—250%。

Wangh引入了一种新的检测温度调控,在延伸步骤后加入了一个较低温度的检测步骤。在低温分子信标作用下,茎环变短,更容易识别等位基因。而LATE-PCR的引物因用量不同而专门设计过,当最终的限量引物退火温度高于非限量引物的5℃以上时,可以得到最好的扩增效率和特异性^[13]。为了保证结果的可靠性和可比性,限量引物量的用量,需要正好能在达到Ct值前耗尽,这样整个反应就能维持普通定量PCR的特性。现在LATE-PCR已经开始被应用到临床诊断,生物武器的检测及其他需要高灵敏度的领域。

另外还出现了一些非依赖PCR的定量方法,如电化学发光法,高效液相色谱法,毛细管电泳^[14]以及共振光散射法等,它们都具有高灵敏度、快速、准确的特点,但各自的缺陷也使它们的广泛使用受到了局限。

2 纳米金辅助的PCR方法

理论上讲,PCR的检测灵敏度可以到达单分子水平,但是PCR在特异性方面却仍有许多改进的地方。特别是在复杂DNA背景、低copy模板、引物设计不理想、多轮PCR和多重PCR等情况下,由于引物与模板之间可能发生错配、引物结合形成

二聚体等原因,经常会导致非特异性扩增。科学家们从不同的角度来尝试解决这个问题,如从模板、引物、Mg²⁺浓度、退火温度等角度改善其特异性,或者将增效剂如甲酰胺、甘油、二甲基亚砷,甜菜碱、氯化四甲基铵等引入PCR体系^[15]。但是在实际应用过程中,有些效果却不尽如人意。

2005年本课题组报道了纳米金粒子对PCR反应的优化作用^[16],简称纳米金辅助的PCR方法(nano-gold assisted PCR, NP-PCR)。纳米金粒子是一种无毒且生物相容性良好的纳米材料,合成方法简单、粒径可控^[17],表面化学性质活泼,容易修饰或吸附其他物质,而且具有独特的光电性能^[18,19],因此近年来国内外对纳米金粒子在生物学领域的应用进行了广泛的研究。在生物分子组装、超灵敏生物传感器、免疫分析标志、生化分析^[20,21]等方面纳米金已显示出潜在的巨大应用价值。但从未尝试将纳米金应用于PCR等反应。我们选择了一个易于产生非特异性扩增的二轮扩增体系来展示纳米金的效果。首先进行一轮循环数为35的PCR反应,从λDNA中扩增出一段283 bp的产物序列,然后将产物稀释100倍为模板再进行下一轮35个循环的扩增。由于非特异性条带在二轮扩增的过程得到了积累,使得常规扩增产物在凝胶电泳图上显示严重的弥散性拖尾,甚至完全得不到目标产物。而向该PCR体系加入粒径为10 nm的纳米金粒子,则扩增的特异性得到非常明显的改善。实验结果表明随着纳米金粒子的浓度的增加,目标条带的产量不断增加,非特异性带不断减弱,当纳米金粒子终浓度为0.4—0.8 nmol/L时,其优化的效果达到最佳,非特异性条带完全消失。同时发现即使将退火温度降低到25℃,仍然可以得到单一的目标产物。这一结果表明,在使用NP-PCR时,不但可以提高特异性,而且设计引物时也更加宽松,不必刻意追求接近的退火温度。

3 PCR芯片

传统的PCR扩增仪的通病就是体积大,因而所需样品量多,热容量大,降低了反应的效率。随着微电子机械系统(microelectromechanical system, MEMS)技术的发展,20世纪90年代初期Wilding^[22]首先成功地在硅芯片上完成了PCR扩增反应。

PCR芯片的原理是把用硅制薄片制作的反应器代替传统的Eppendoff塑料小管用于PCR反应,构

成一次性 PCR 芯片. 该芯片具有如下特点: (1) 反应体积小, 节约试剂; (2) 热容量小, 加热和冷却速度快 ($15-40^{\circ}\text{C}/\text{s}$); (3) 比表面积增大, 缩短了反应时间; (4) 易于集成化. 芯片的布局模式决定着 DNA 在不同温度区域停留的时间, 而布局决定了样品流过芯片所经历的循环数, 所以不同的结构设计得到的反应结果和时间会有影响. 据报道 Martin 等^[23]使用连续流动式 PCR 完成 20 个循环只需 18.7—1.5 min.

最早的 PCR 芯片是在硅片上刻蚀出小池, 并对其用耐热的玻璃密封, 小池的背面为多晶硅加热器. 但是, 未经表面处理过的裸露硅以及一些硅相关材料对 PCR 扩增反应起抑制作用^[24]. 另外还有一些抑制剂会影响聚合酶的活性, 尽管新型的 PCR 芯片如介电电泳选择性过滤器^[25]和 DNA 固相萃取芯片^[26]能够去除 PCR 抑制剂, 但这些技术相对复杂, 不能得到广泛应用. 目前最常用的方法是对芯片中的微反应池/通道的内表面进行钝化处理. Erill 等^[27]研究发现, 硅相关材料对 PCR 的抑制作用主要是耐高温的 Taq 聚合酶吸附到反应池内壁上, 而不是硅材料直接与 PCR 混合物的化学作用. 一般采用较多的聚合酶来补偿其表面吸附现象^[28], 同时也可以通过添加 BSA 来抵消这种现象. 因为 BSA 和 DNA 聚合酶竞争性地结合到 SiO_2 表面. 但是, BSA 的浓度往往需要精确地优化, 高浓度的 BSA 会导致较低的扩增产物, 甚至完全抑制 PCR 反应. 另外, 聚合物溶液 PEG 和非离子表面活性剂 Tween20^[28,29]也是很好的钝化试剂.

由于 PCR 芯片的反应量一般在微升量级或更小, 这就为 DNA 扩增产物检测带来了困难. 但是, 相对于普通 PCR, PCR 芯片还有一个突出的优点就是易于集成化. 在 PCR 芯片中可以进行各种 PCR 反应, 形成不需要任何辅助设备的一次性微型 PCR 反应器, 同时与样品的上游处理系统及下游的结果分析相结合, 由此就能形成整个生化过程“集合”在一起的微型分析系统或称为芯片实验室.

在集成化 PCR 芯片中, 已经有一些研究者将样品制备过程集成到单一芯片上^[30], 从而实现在单一芯片上进行 PCR 前样品预处理(包括提取、纯化和浓缩等), 尽管这些在线的 PCR 前样品预处理在速度、样品消耗等方面都比手工脱线操作先进, 但

是它所占用的时间还较长, 这也许成为进一步发展的“瓶颈”, 已经引起许多研究者的高度关注. 美国德州大学安德森癌症中心 Gascoyne 等^[31]报道将采用新型微流控芯片的方法来检测疟疾, 首次提出利用介电电泳(dielectrophoresis, DEP)场流分离法(field-flow-fractionation, FFF)来制备疟疾样品, 并首次提出将 DEP-FFF 细胞分离、分离溶解、连续流动式 PCR 以及检测等集成于一体的微流控芯片.

PCR 芯片体积小, 但相应的检测系统如果不能微型化、集成化, 则与生化微分析系统的目标还是相背的. 随着 PCR 检测方法的发展, 集成检测系统的 PCR 芯片的报道也越来越多. Liu 等^[32]通过 CO_2 激光烧蚀也在 PC 衬底材料上完成 PCR 扩增、DNA 杂交以及杂交冲洗等过程的集成, 从而对大肠杆菌 K-12MG1655 (221 bp) 和粪肠球菌 DNAE (195 bp) 两种基因进行扩增和杂交分析. 另外, Liu 等^[33]利用传统计算机控制微制造技术在 PC 衬底材料上开发了集样品制备、PCR 扩增、DNA 杂交以及电化学检测等过程于一体的高度集成化的塑料生物芯片, 其中样品制备模块包括基于磁珠技术的细胞捕获、预浓、纯化以及溶解. 该芯片的最大特点是完全“独立”, 即不需要外界压力源、流体贮藏、机械泵以及阀来操纵微流体, 从而消除可能的样品污染, 也大大简化了微流控芯片装置的操作.

Rodriguez^[34]等也报道了一种将 PCR 和毛细管电泳集成在一起的芯片. PCR 微反应池和电泳芯片的制作材料分别是硅和玻璃, 两个单元用 PCMS 衬垫组装起来. 芯片可在 13 min 内完成 30 个循环, 产物通过压力驱动转移到电泳芯片的样品池中. 毛细管电泳通道选用的筛分介质为羟丙甲基纤维素, 使两个只有 18 个碱基差别的基因片段实现分离. 此芯片成功分析了鸡和鸽子的基因片段.

4 原位 PCR

PCR 对许多疾病的靶序列进行分析时, 需要破碎细胞或组织来提取核酸, 因此不能将扩增结果直接在组织中定位, 难以确定靶序列所在的细胞和组织的类型, 这是 PCR 技术的一个明显的局限性. 而常用的原位定位方法——复位杂交的敏感性又比较低. 1990 年, Haase 等^[35]首次将 PCR 和原位杂交技术相结合的方法检测了羊绒毛膜丛细胞中的

绵羊脱髓鞘脑炎病毒。自此,原位多聚酶链式反应技术(*in situ* PCR, IS-PCR)得到了不断改进和快速发展,主要应用于病毒检测和定位^[36,37]、基因突变、基因重排和染色体移位^[38]。最近用原位 PCR 检测组织中寄生虫感染的文献也有报道^[39]。

原位 PCR 是通过在单细胞或组织切片上对特异的 DNA 或 cDNA 进行原位 PCR 扩增,然后采用 DNA 分子原位杂交技术、免疫组化或荧光检测技术进行细胞内特定核酸序列检出及定位的分子技术。目前原位 PCR 主要有几种类型:直接原位 PCR,间接原位 PCR,原位 RT-PCR 和原位再生序列复制反应。

直接原位 PCR 使用标记的引物进行反应,所以扩增结果可以直接观察而不需要进行原位杂交,具有操作简便、流程短、省时的优点。但与常规 PCR 一样,易发生引物错配或非特异性退火,且标记后的引物会降低 PCR 效率。而间接原位 PCR,因为在扩增后用杂交来检测结果,所以克服了引物错配引起的非特异扩增问题,成为目前最广泛使用的方法。但整个过程的所需时间比较长。

由于细胞或组织内的靶序列很多都是 mRNA,所以原位的逆转录 PCR 技术^[40](reverse transcription PCR, RT-PCR)应运而生。该技术可以将 mRNA 原位逆转录为 cDNA,然后进行原位 PCR,因此可用于扩增和检测标本中罕见的 mRNA。目前已有报道被成功用于鉴定和定位许多低丰度靶基因和扩增产物的细胞起源^[41]。

由于在原位逆转录 PCR 时,一个细胞作为一个独立的反应微容器,在一个较高浓度的反应液中扩增,所以蛋白酶的消化在实验中起着非常重要的作用。组织标本经蛋白酶消化后能增加通透性,允许反应试剂进入细胞内,并暴露靶序列用来扩增。但有时还需要在酶消化之前进行一些其他的处理。Johansen^[42]在对甘蔗叶片石蜡切片标本进行蛋白酶消化之前,进行了果胶酶处理。他认为采用羟基毛地黄毒苷(digoxigenin)和异硫氰酸荧光素(FITC)进行核苷酸标记时,果胶酶处理可去除非特异性物质的污染。

扩增完成后对细胞内产物的检测主要有两种方式:(1)直接法。将地高辛、生物素等标记好的 dNTP 加入热循环 PCR 反应体系中,可以用免疫组化法直接检测标记的核苷酸。(2)间接法。用标记探针和扩增产物进行原位杂交。探针长度普遍认为在 50~200 bp^[43]

之间敏感性比较好,最近 Zhang 等用 19—24 bp 的寡核苷酸探针也得了很好的效果^[44]。间接法检测时特异性明显较好,所以被大多数实验室所采用。

5 免疫 PCR

免疫 PCR (immunopolymerase chain reaction, IM-PCR)综合了抗原-抗体反应的特异性和 PCR 扩增技术的高效性。与传统免疫学反应类似,1992 年 Sano 等^[45]利用链亲和素-蛋白 A 嵌合体蛋白作为连接分子,建立了灵敏度很高的免疫 PCR 技术。

免疫 PCR 技术的基本原理和常规的标记免疫技术相似,只是标记物不同。用一段已知 DNA 分子标记抗体作为探针,与待测抗原反应,PCR 扩增黏附在抗原抗体复合物上的 DNA 分子,电泳检测。根据特异性 PCR 产物的有无,来判断待测抗原是否存在。免疫 PCR 是迄今最敏感的一种抗原检测方法,理论上可以检测单个抗原分子,这使得低于常规检测方法极限的痕量抗原的检测成为可能。目前,国内外报道的免疫 PCR 的敏感度比现行的 ELISA 法高 10^2 — 10^8 倍^[46]。因此该法主要用于检测肿瘤标志物、细胞因子、神经内分泌活性多肽、病毒抗原、细菌、酶、支原体等微量抗原。

免疫 PCR 是以物理吸附和抗原抗体特异性结合为基础的标记免疫分析技术,所以与其他标记免疫技术一样,要完全避免生物素-抗体复合物或免疫探针的非特异性吸附是不太可能的。Suzuki 等^[47]发现,这种非特异性扩增几乎只与生物素-DNA 复合物的拷贝数有关,而降低拷贝数的话反应的灵敏度又会下降。所以为了减少非特异性扩增,Zhou 等^[48]通过提高封闭液中的 BSA 浓度,及添加脱脂牛奶和鲑精 DNA 来进行封闭。Chang 等^[46]也发现 2%BSA 的封闭效果很好。

随着 PCR 技术和其他生物学技术的快速发展,研究人员将多项技术融合,发展出了许多新型的免疫 PCR 技术。(1)原位免疫 PCR 是一种原位检测组织或细胞中抗原的技术。Cao 等^[49]用原位免疫 PCR 检测肝石蜡切片上的乙肝表面抗原(HBsAg),其敏感性比免疫组化方法有显著提高。(2)单引物免疫 PCR,设计 DNA 报告分子的两侧翼含同样的引物序列,所以可用单引物进行 PCR 扩增。该法能提高扩增效率^[48]。(3)磁珠免疫 PCR,将磁珠技术和免疫 PCR 技术相结合,有效地除去了 PCR 扩增的抑制物,保

证了PCR的有效性和可靠性。Monteiro等^[50]运用该方法设计出一种检测粪便中幽门螺杆菌的新方法。(4) T₇RNA聚合酶扩增免疫检测技术^[51],用一种特异性抗体与含有T₇启动子的双链寡核苷酸结合,利用同位素标记的底物和T₇RNA聚合酶扩增寡核苷酸,生成一定分子量大小的RNA转录物,经电泳后分析结果。该方法避免了常规免疫PCR中温度变化的问题,其敏感度是ELISA的10⁹倍。但由于流程比较复杂,所以限制了其在临床上的推广。(5) 荧光定量免疫PCR技术,将指示分子通过化学交联剂与抗体交联,利用荧光定量PCR仪检测指示分子,通过PCR测定出指示分子的量与检测标本中特异性抗体的水平呈正比例关系来推测样品中特异性抗体的含量。McKie等^[52]最早用该法检测了腮腺炎病毒特异性抗体。荧光定量免疫PCR具有重复性好、无需扩增后的处理、结果可靠且可实时分析报告和易于自动化等优点^[53],所以该技术将会使免疫PCR技术得到越来越广泛的应用,并成为免疫PCR检测系统的发展趋势。

6 结论和展望

总之,上述PCR方法已经在灵敏度、特异性和微型化方面有了很大的发展,为分子生物学及其他学科的发展提供了便利,在科研领域表现出了明显的优越性,不过仍然存在各自不可避免的局限性。各项技术的优势融合将会成为生物技术领域的一个趋势。将来,基因分析的定量化和均相化是未来基因诊断的发展趋势,而生物芯片技术与荧光探针定量技术的结合将有助于该技术在生命科学领域的应用和普及,特别是临床诊断领域的推广。

参 考 文 献

- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987, 155: 335-351
- Cadwell RC. *Mutagenic PCR*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994
- Becker A, Reith A, Napiwotzki J, et al. A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Anal Biochem*, 1996, 237(2): 204-207
- Rees CB, Li W. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. *Aquat Toxicol*, 2004, 66(4): 357-368
- Tesson L, Heslan JM, Menoret S, et al. Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res*, 2002, 11(1): 43-48
- Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, et al. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst Appl Microbiol*, 2004, 27(2): 198-210
- Ridzon D, Tan RY, Nguyen J. MicroRNA expression signature in human glioblastoma multiforme brain tumor. <http://www.Wzw.tum.de/gene2quantification/qpcr2005/Posters.Html>, 2005
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(20): e179
- Sanchez JA, Piece KE, Wangh LJ et al. Linear-after-the-exponential(LATE)-PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(7): 1933-1938
- Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(20): 7652-7656
- Poddar SK. Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon probe in the detection of a target gene of adenovirus. *Mol Cell Probes*, 2000, 14(1): 25-32
- Gyllensten UB, Allen M. Sequencing of *in vitro* amplified DNA. *Methods Enzymol*, 1993, 218: 3-16
- Piece KE, Sanchez JA, Wangh LJ, et al. Linear-after-the-exponential(LATE)-PCR: Primer design criteria for high yields of specific single-stranded DNA and improved real-time detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(24): 8609-8614
- 郭丹,陈娜娜,陈英. 高效毛细管电泳法测定注射用头孢曲松钠的含量. *华西药学杂志*, 2005, 20(4): 343-345
- Sambrook F E, Maniatis J T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1989
- Li HK, Huang JH, Lv JH, et al. Nanoparticle PCR: Nanogold-assisted PCR with enhanced specificity. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 2-5
- Gu J, Hacker G W. *Gold and Silver Straining: Techniques in Molecular Morphology*. Boca Raton, FL: CRC, 2002
- Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, 289: 1757-1760
- Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, 2002, 295: 1503-1506
- Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 14036-14039

- 21 Fan C, Wang S, Hong JW, et al. Beyond superquenching; Hyper-efficient energy transfer from conjugated polymers to gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100: 6297—6301
- 22 Wilding P, Shoffner MA, Kricka LJ. PCR in a silicon microstructure. *Clin Chemistry*, 1994, 40(9): 1815—1818
- 23 Martin UK, Andrew J, De M. Chemical amplification continuous flow PCR on a chip. *Science*, 1998, 280(15): 1046—1048
- 24 Shoffner MA, Cheng J, Hvichia GE, et al. Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chip for PCR. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(2): 375—379
- 25 Perch-Nielsen IR, Bang DD, Poulsen CR, et al. Removal of PCR inhibitors using dielectrophoresis as a selective filter in a microsystem. *Lab on a Chip*, 2003, 3: 212—216
- 26 Ferrance JP, Wu Q, Giordano B, et al. Developments toward a complete micro-total analysis for Duchenne muscular dystrophy diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 500: 223—236
- 27 Erill I, Campoy S, Erill N, et al. Biochemical analysis and optimization of inhibition and adsorption phenomena in glass-silicon PCR-chips. *Sensors and Actuators B*, 2003, 96: 685—692
- 28 Cady NC, Stelick S, Kunnavakkam MV, et al. Real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* using an integrated microfluidics platform. *Sensors and Actuators B*, 2005, 107(1): 332—341
- 29 Obeid PJ, Christopoulos TK. Continuous-flow DNA and RNA amplification chip combined with laser-induced fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 494: 1—9
- 30 Anderson RC, Su X, Bogdan GJ, et al. A miniature integrated device for automated multistep genetic assays. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): e60
- 31 Gascoyne P, Satayavivad J, Ruchirawat M. Microfluidic approaches to malaria detection. *Acta Tropica*, 2004, 357—369
- 32 Liu Y, Rauch CB, Stevens RL, et al. DNA Amplification and hybridization assays in integrated plastic monolithic devices. *Anal Chem*, 2002, 74(13): 3063—3070
- 33 Liu RH, Yang J, Lenigk R, et al. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Anal Chem*, 2004, 76(7): 1824—1831
- 34 Rodriguez I, Lesaichere M, Tie Y, et al. Practical integration of polymerase chain reaction amplification and electrophoretic analysis in microfluidic devices for genetic analysis. *Electrophoresis*, 2003, 24: 172—178
- 35 Haase AT, Retzel EF, Staskus KA. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 4971—4975
- 36 Alzahrani AJ, Valley PJ, McMahon ET. Development of a novel nested in situ PCR-ISH methods for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *J Virol Meth*, 2002, 99: 53—61
- 37 Bagasa O, Hauptman SP, Lischner HW. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction. *N Engl J Med*, 1992, 326: 1385—1391
- 38 Long AA, Komminoth P, Lee E. Comparison of indirect and direct *in situ* polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. *Histochemistry*, 1993, 99: 151—162
- 39 李爽,甘绍伯,彭瑞云,等. 原位PCR对弓形虫感染鼠毒力检测效果的观察. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(3): 41—43
- 40 Hoyland JA, Mee AP, Baird P, et al. Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using *in situ* reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Bone*, 1997, 20: 87—92
- 41 Yin J, Maplitt MG, Pfaff DW. *In situ* PCR and *in vivo* detection of foreign gene expression in rat brain. *Cell Vision*, 1994, 1: 58—59
- 42 Johansen BO. *In situ* PCR on plant material with sub-cellular resolution. *Annals of Botany*, 1997, 80(5): 697—700
- 43 Retzel EF, Staskus KA, Embretson JE, et al. The *in situ* PCR: Amplification and detection in a cellular context. [Http://www.cbc.med.umn.edu/Virtlibrary/Retzel/chapter_3.7_fm.html](http://www.cbc.med.umn.edu/Virtlibrary/Retzel/chapter_3.7_fm.html), 1994/2003-01-17
- 44 Zhang ZD, Kitching P. A sensitive method for the detection of FM-DV by *in situ* hybridization using biotin labeled oligodeoxynucleotides signal amplification. *J Virol Meth*, 2000, 88: 187—192
- 45 Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: Very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 1992, 258: 120—122
- 46 Chang TC, Huang SH. A modified immunopolymerase chain reaction for detection of beta-glucuronidase from *Escherichia coli*. *J Immunol Methods*, 1997, 208(1): 35—42
- 47 Suzuki A, Itoh F, Hinoda YJ, et al. Double determinant immunopolymerase chain reaction; A sensitive method for detecting circulating antigens in human sera. *Jpn J Cancer Res*, 1995, 86: 885—889
- 48 Zhuo H, Fisher J, Papas TS. Universal immuno-PCR for ultrasensitive target protein detection. *Nucl Acids Res*, 1993, 21: 6038—6039
- 49 Cao Y, Kathrin Kopplow, Guang Yaw Liu, et al. *In situ* immuno-PCR to detect antigens. *Lancet*, 2000, 356(9234): 1002—1003
- 50 Monteiro L, Gras N, Megraud F. Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human faces. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(10): 3778—3780
- 51 Zhang HT, Kacharmina JE, Miyashiro K, et al. Protein quantification from complex protein mixtures using a proteomics methodology with single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(10): 5497—5502
- 52 McKie A, Samuel D, Cohen B, et al. A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. *J Immunol Methods*, 2002, 270: 135—141
- 53 Barletta JM, Edelman DC, Constantine NT. Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *Am J Clin Pathol*, 2004, 122: 20—27