

微流控芯片核酸分析系统及其精准医学应用

黄世光^{1,2,3}, 靳翔宇¹, 林荣赞¹, 林雪¹, 薛宁¹, 范云倩¹, 祖国¹, 马丽⁴, 罗贤波⁴, 黄国亮^{1,4}

¹清华大学医学院, 北京 100084;

²北京航空航天大学北京学院, 北京 100191;

³首都医科大学生物医学工程学院, 北京 100069;

⁴生物芯片北京国家工程研究中心, 北京 102206

摘要 目前临床病原菌检测主要依赖细菌培养的方法,该方法周期长、准确性低,且容易产生交叉污染和人体感染等问题。提出微流控芯片核酸恒温扩增分子诊断技术,开发离心进样空气隔离微流控芯片和共焦面成像光学检测系统,采用旋转扫描信号采集方法和薄层空气浴流动加热比例-积分-微分温控方法对呼吸道病原菌进行实验和分析。研制恒温扩增微流控芯片核酸分析系统,将系统检测灵敏度提高至 10 copies,降低样品试剂消耗量至 0.94 μL ,在 45 min 内能够同时进行多种病原菌指标的并行分析鉴定。通过 100 例临床样品实验测试,得到所提系统与传统聚合酶链反应所得结果的总符合率大于 98%,可满足医院、社区医疗、乡镇卫生诊所等低成本精准医疗应用的需要。

关键词 医用光学; 生物医学光子学; 核酸分析; 分子诊断; 精准医学; 微流控芯片; 恒温扩增; 共焦面成像

中图分类号 TH776

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0307002

Microfluidic Chip Based Nucleic Acid Analyzer and Its Application in Precision Medicine

Huang Shiguang^{1,2,3}, Jin Xiangyu¹, Lin Rongzan¹, Lin Xue¹, Xue Ning¹,
Fan Yunqian¹, Zu Guo¹, Ma Li⁴, Luo Xianbo⁴, Huang Guoliang^{1,4}

¹School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²School of Beijing, Beihang University, Beijing 100191, China;

³School of Biomedical Engineering, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

⁴National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206, China

Abstract In view of the current clinical practice, the detection of pathogenic bacteria mainly depends on bacterial culture methods. The methods have disadvantages of long cycle and low accuracy, and are prone to cross contamination and human infection. We propose the microfluidic chip based isothermal nucleic acid amplification for molecular diagnostics. An air-insulated microfluidic chip is designed for the automatic centrifugal distribution of samples to test cells. The confocal optical imaging, rotation scanning signal acquisition, thin layer air bath heating proportion-integral-derivative temperature control, etc. are developed. A microfluidic chip based nucleic acid analyzer is also developed. We detect the pathogens of respiratory tract using the proposed system, whose sensitivity can reach 10 copies. The sample reagent consumption is reduced to 0.94 μL , and the results can be obtained in 45 min. In a blinded experiment of 100 clinical patient sputum samples, the total coincidence rate of results of our system and the traditional polymerase chain reaction is over 98%. This novel nucleic acid analyzer is suitable for low cost and accurate medical applications in hospital, community care and township health clinic, etc.

收稿日期: 2017-07-31; 收到修改稿日期: 2017-10-26

基金项目: 国家自然科学基金(81327005,61361160418,61575100)、国家 863 计划(2012AA020102,2013AA041201)、国家重大科学仪器研究基金(2013YQ190467)、北京市自然科学基金(4142025)、北京实验室基金和清华大学自主科研基金(2014Z01001)

作者简介: 黄世光(1997—),男,本科生,主要从事微流控芯片分子诊断方面的研究。E-mail: glhuang@capitalbio.com

导师简介: 黄国亮(1966—),男,博士,教授,主要从事生物医学检测技术创新与仪器方面的研究。

E-mail: tshgl@tsinghua.edu.cn(通信联系人)

Key words medical optics; biomedical photonics; nucleic acid analyzer; molecular diagnostics; precision medicine; microfluidic chip; isothermal amplification; confocal imaging

OCIS codes 170.3890; 120.3890; 120.4640; 120.482

1 引 言

2013 年我国累计仪器仪表产品进口金额为 422.9 亿美元^[1], 相比 2012 年增长 3.8%; 2016 年前三季度, 我国医疗仪器及器械进口金额为 65.3 亿美元^[2], 同比增长 9%。同时, 看病难、看病贵的社会问题日渐突出。这些问题的解决无不依赖检测技术的创新和国产新型科学仪器和医疗仪器的研发。从临床上看, 病原菌感染是许多疾病的根源, 据卫生检疫部门保守统计, 我国每年临床发病人次高达数十亿, 其中绝大多数为细菌性感染。在细菌性感染疾病的治疗方面, 不同菌种致病在患者身上的症状常常大同小异, 但不同菌种对药物的敏感性却存在很大的差异, 如呼吸道感染常见的病原菌——金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌。患者感染后都会有鼻塞、头疼和发烧的症状, 第一代头孢菌素药物对金黄色葡萄球菌非常有效, 但对铜绿假单胞菌是无效的。治疗铜绿假单胞菌感染需要用第三代头孢菌素药物, 而第三代头孢菌素药物对金黄色葡萄球菌的治疗效果不明显。由此可见, 准确鉴定所感染的病原菌并对症用药是保证疗效的关键。临床常规的生化指标分析无法对患者所感染病原菌种属做出准确鉴定, 大多数临床治疗仍处于经验抗菌素应用阶段。国家药品管理部门统计的数据显示 46% 左右的国内疾病治疗都采用抗菌素, 在高级抗生素使用方面存在较大的盲目性。因此, 在临床上迫切需要发展高通量、快速、准确鉴定病原菌的先进检测技术和分析仪器, 这对于应对类似 SARS、甲型 H1N1 流感等突发事件非常重要。对疑似感染人群进行高通量、快速、准确地筛查和对确诊病人及时使用疗效显著的药物进行救治显得格外重要, 也是生物医学前沿研究的热点^[3-4]。

核酸扩增技术基于 DNA 双螺旋结构, 具有快速高效的核酸片段分子复制放大能力和特异标志物核酸序列互补匹配识别功能, 可很好地满足临床病原菌分子诊断鉴定的快速、准确的检测要求。常见的核酸扩增技术主要有变温扩增^[5-6]和恒温扩增^[7-11]两种。不论是变温扩增还是恒温扩增, 目前主要以离心(EP)管、96 孔板或 384 孔板为载体, 且需要多种仪器串联分步实施才能完成, 单项指标检测需要消耗 20~25 μL 的样品试剂混合体系, 比较

可靠的检测限通常为 1000 个核酸拷贝。由此可见, 在实际应用中要实现高灵敏度(几个或单分子)、低成本的分子检测与快速诊断, 在核酸扩增技术、反应载体、检测仪器等方面还有大量研究工作要做。

微型全分析系统中的样品制备、核酸扩增与生化反应、结果检测等方面的功能模块不断成熟, 为该技术在病原学分子诊断方面的应用提供了基础。美国 Cepheid 公司推出 GeneXpert 核酸分析卡盒系统并将其用于检测金黄色葡萄球菌, 在 2007 年获得美国食品及药物管理局批准并进入临床使用。Lee 等^[12]在 2008 年用聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)制作微流体芯片, 实现乙型肝炎病毒 DNA 的环介导恒温扩增反应检测。Suárez 等^[13]在 2009 年设计制作了微流体芯片, 在实验室中实现了牛奶中抗菌素的残留检测。Martinez 等^[14]在 2010 年设计制作了滤纸微流体芯片, 该芯片可用于低成本疾病诊断。Shi 等^[15]在 2011 年用聚二甲基硅氧烷(PDMS)制作了微流体芯片, 实现了细胞 DNA 的实时定量变温扩增检测。Govindarajan 等^[16]在 2012 年设计制作了一种微流体芯片, 该芯片可直接用于猪唾液中细菌 DNA 成分分析。Wang 等^[17]于 2012 年在微流体芯片上实现肺癌特异基因的早期诊断。Zhou 等^[18]于 2014 年在微流体芯片上实现了 10 种病原菌分析。Lin 等^[19]于 2016 年在微流体芯片上实现了 Ebola 病毒分析。目前, 微型全分析系统尽管未得到广泛应用, 但依然具有很好的发展潜力^[20-26]。

本文介绍了一种微流控芯片核酸分析系统及其精准医学应用, 通过设计病原菌分子诊断特异标志物、共焦面成像微纳体系核酸恒温扩增荧光检测系统、离心进样空气隔离多指标并行检测微流控芯片, 并开发微流控芯片试剂盒和微纳体系病原菌分子诊断核酸分析仪器, 45 min 内完成了单指标样品试剂消耗小于 1.0 μL (常规 EP 管式 PCR 方法需要 25 μL)、灵敏度优于 10 copies 的精准医学分子诊断。进行了 100 例临床样本应用实验, 总符合率大于 98%。采用测序方法对 2 例不一致测试结果的样品进行测量, 结果与恒温扩增微流控芯片核酸分析方法所得结果吻合。

2 基本原理

在核酸扩增生生化反应检测中, 实时荧光信号强

度 I 和核酸扩增效率 η 可表示为

$$I = I_{os} + I_a + I_b - I_s - I_u - I_p, \quad (1)$$

$$\eta = (I - I_0) / I_0, \quad (2)$$

式中 I_a 为扩增过程新增核酸扩增产物产生的信号强度, I_b 为环境背景噪声强度, I_s 为表面吸附的荧光信号强度, I_u 为升温导致双链 DNA 解链降低的荧光信号强度, I_p 为光漂白降低的荧光信号强度, I_{os} 为初始混合样品产生的荧光信号强度, $I_0 = I_{os} + I_b$ 。

从(1)式和(2)式可以看出, η 主要与 I_a 呈正相关, 而与 I_{os}, I_b, I_s, I_u 和 I_p 呈负相关。本研究中, 通过采取试剂、样品质控和微流控芯片等措施使 I_{os} 较小且控制在一个稳定常数; 采取核酸恒温扩增技术和亚毫米薄层加热比例-积分-微分(PID)控温, 使扩增信号的产生达到高效, 并使由升温导致的双链 DNA 解链降低的信号最小。采取光学共焦检测技术降低环境背景噪声, 实现微纳体系核酸扩增的高灵敏度检测。采用表面化学处理技术减小表面吸附的荧光信号的影响, 采用旋转扫描检测减小光漂白降低的荧光信号的影响^[22-24]。通过以上措施把上述负相关因素控制在一个常数附近或接近零的值, 从而可使 η 简化为

$$\eta = I_a / I_0. \quad (3)$$

下面重点介绍核酸恒温扩增技术原理、微流控芯片创新结构、光学共焦检测系统设计与仪器开发等核心技术。

2.1 核酸恒温扩增精准医学分子诊断原理

核酸恒温扩增技术的基本原理如图 1 所示, 其特异引物由 6 段特异序列组成, 包括 F1、F2、F3、B1、B2 和 B3, 它们对应的互补序列依次为 F1c、F2c、F3c、B1c、B2c 和 B3c。由这 6 段特异序列和它们对应的互补序列组成 4 条特异基因引物探针, 包括由 F2 和 F1c 构成的序列(FIP)、由 B2 和 B1c 构成序列(BIP)、F3 和 B3, 其中 F3 又称为前置引物, B3 又称为后置引物。核酸恒温扩增分为启动和循环两个阶段。启动阶段如图 1(a) 所示, 通过 4 条特异基因引物探针的全部 6 段特异序列识别目标核酸, 只有全部 6 段特异序列完全匹配, 启动才能进行。循环阶段如图 1(b) 所示, 通过 4 段特异序列(F1, F2, B1, B2 或它们的互补序列)来识别目标核酸, 只要这 4 段特异序列完全匹配, 循环扩增就可以进行。整个扩增过程均在 65 °C 等温环境下进行, 并通过链置换 DNA 聚合酶来实现。核酸恒温扩增的具体过程为: 1) 从启动阶段开始, 核酸双链在 65 °C 环境下变为单链; 2) 在 DNA 聚合酶和 FIP(或 BIP) 的共同作用下, 单链变成双链; 3) 双链中包含 FIP(或 BIP) 的特殊结构, 在进一步的扩增中 F3c(或 B3c) 处产生新的子链, 这种新的子链随着扩增的进行脱落下来成为单链, 由于 FIP(或 BIP) 的特殊结构, 其在成为单链后可以自动弯曲成发卡状结构; 4) 进入循环阶段, 有弯曲发卡状结构的单链开始产生新的子链, 同时自延伸成双链; 5) 新的子链脱落

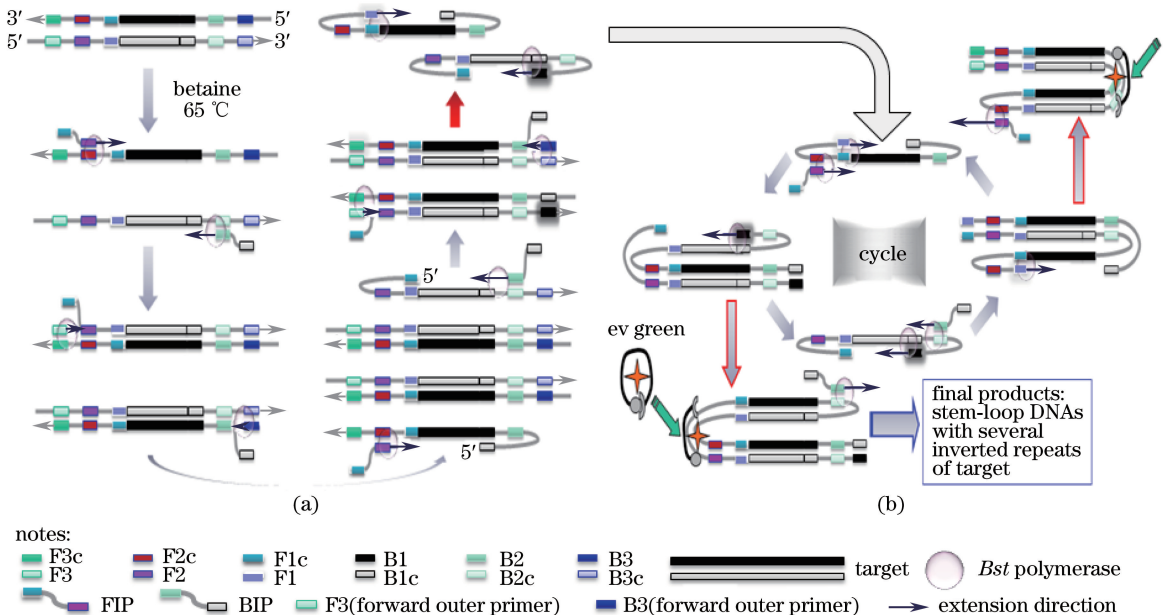


图 1 核酸恒温扩增原理示意图。(a) 启动阶段; (b) 循环阶段

Fig. 1 Principle diagram of isothermal nucleic acid amplification. (a) Initialization phase; (b) circulatory phase

下来,成为单链并自动弯曲成发卡状结构,然后重复步骤 4),如此不断循环。

为了进行实时扩增检测,把一种荧光染料 EvaGreen 加入扩增试剂中。EvaGreen 在游离情况下处于包裹聚灭状态,这时是不发光的,如图 1(b)所示,当遇到双链 DNA(或类似双链 DNA 的核酸发卡状结构)后,EvaGreen 会自动插入到双链 DNA 中,在插入过程中包裹被打开并处于荧光状态,在外部激发光照射下产生荧光信号。随着恒温扩增反应的进行,扩增的双链 DNA(或类似双链 DNA 的核酸发卡状结构)会越来越多,则插入到双链 DNA 中的 EvaGreen 也会随之增多,从而产生越来越强的

荧光信号。通过检测荧光信号便可获得核酸恒温扩增过程的实时检测曲线。根据临床应用需要来确定病原菌检测指标,然后访问国际公开的 Nucleotide 库或检索发表的科技文献获得病原菌的全部基因序列(检索不到的病原菌则采用基因测序方法获取全部基因序列)。按照恒温扩增方法和病原菌种属区分要求对全基因序列进行筛选,以获得特异基因序列,采用 PrimerExplorer V4 等软件来设计每项病原菌检测指标的 6 段特异碱基序列。通过优化设计与实验验证,完成病原菌检测指标对应的分子诊断特异标志物设计^[26],获得 F3、B3、FIP 和 BIP,表 1 是肺炎支原体(Mpn)的恒温扩增特异碱基序列筛选结果。

表 1 病原菌的特异基因探针设计举例

Table 1 Example for gene-specific probes of pathogenic bacteria

Testing index	Probe code	Base sequence of probe
Mycoplasma pneumoniae	F3	CTCACCGTAGTGGGACA
	B3	GCCCCGGGATTTTCACC
	FIP	CGTCAGGGCGGGTGTAGCTCTTACAAAGTACCACCACGAC
	BIP	TGCGCCACACCAATGCCATGGGAGGGAGGAAAAGCT
	LF	ATTGCTGGCGCTTGAGC
	LB	CGCGCTTAACCCCGTGA

2.2 微流控芯片离心进样空气隔离多指标并行检测原理与试剂

在核酸分析反应载体材料选择与加工工艺研究方面,人们通常采用注塑、浇铸和微加工等工艺技术,使用聚碳酸酯(PC)、PMMA、PDMS、玻璃和硅片等材料制作各种形状大小的核酸分析反应载体,其中 PC 精密注塑反应载体(如 Ep 管、96 孔板等)最为流行。但是,在 10 μ L 以下体系的核酸扩增反应中,均存在稳定性差与扩增响应时间滞后等问题,这成为微纳反应体系生化分析的技术瓶颈。使用 PC 材料开发了一种微纳体系多通道并行检测的微流控芯片,如图 2 所示,该芯片由直径为 60 mm、厚度为 1.5 mm 的 PC 芯片底座和厚度为 0.5 mm 的透明 PC 盖片紧密黏合封装而成,微型生物反应腔体和流路管道加工在芯片底座上,进/出样孔加工在 PC 盖片上。在图 2 左上角的子图中,外圈 24 个微反应测试腔体的直径为 2 mm、深度为 0.3 mm,对应反应体系的体积为 0.94 μ L,中间进样流路通道尺寸为 200 μ m \times 200 μ m,微反应腔体与中间流路通道之间通过一条 100 μ m \times 100 μ m 的高阻微管道连接,分子诊断的特异引物探针被用低熔点琼脂糖凝胶(CL-4)包埋在微反应测试腔体底部。每个微反应测试腔体的作用相当于 1 个 EP 管,可独立进行核酸扩增反应。在高阻微管道中间有一个直径为

1.0 mm、深度为 0.2 mm 的缓冲池。该缓冲池用于调节加工误差引起的液体体积变化,确保离心进样后 24 个微反应测试腔体充满反应液体,而中间进样流路通道没有反应液体残留,形成空气隔离带,防止交叉污染,如图 2 右下角子图所示。

在图 2 中,微流控芯片上共有 24 个独立微反应测试腔体,可完成 22 种不同指标的分子诊断检测,另外 2 个微反应测试腔体用于设置阳性和阴性参考质控。从进样孔加入待分析核酸样品和恒温扩增反应试剂的混合溶液,并用薄膜密封进/出加样孔,然后将其放入仪器中进行高速离心,将样品试剂自动均匀分配到 24 个微反应测试腔体中,如图 2 右下角子图所示。随着仪器加热升温到 65 $^{\circ}$ C,微反应测试腔体中的特异引物探针被释放出来,与加入的待分析核酸样品和恒温扩增反应试剂一起进行核酸恒温扩增反应。在恒温扩增反应试剂中,同步加入的 EvaGreen 荧光指示剂能够自动实时插入到新增核酸双链(或核酸单链形成的发卡结构)中。随着核酸的大量扩增,插入的 EvaGreen 增多,在蓝色激发光诱导下产生的绿色荧光信号增强。每隔一定时间进行一次荧光信号检测,可获得核酸恒温扩增在线检测的实时荧光信号曲线。如果被测样品中没有包含与扩增引物相同的碱基序列,则因不能进行正确的碱基互补配对而无法启动核酸扩增,不会产生新的

核酸双链(或核酸单链形成的发卡结构),因此也就没有新的 EvaGreen 插入,在这种情况下进行实时荧光信号检测获得的信号强度将很低,且不会随时

间发生变化。这种 EvaGreen 荧光染料耐高温,对核酸恒温扩增产物无毒性,所发出的荧光信号强且稳定。

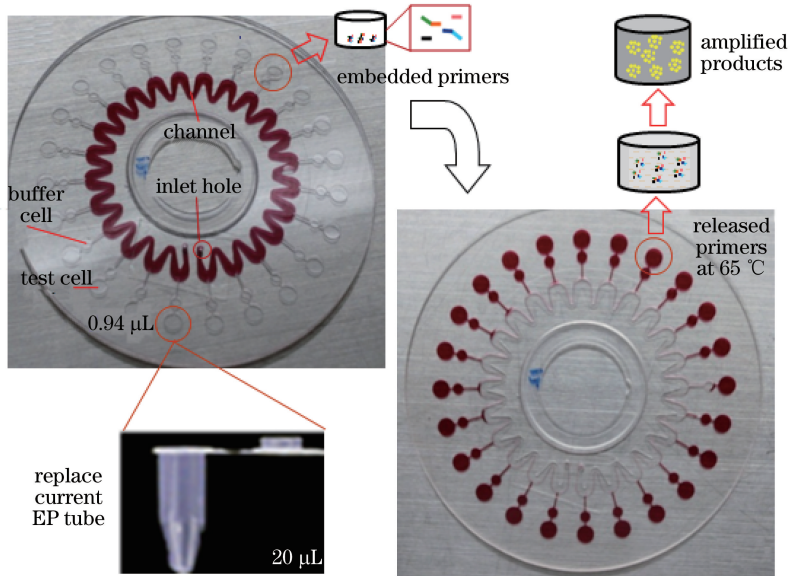


图 2 24 通道微流控芯片设计结构示意图

Fig. 2 Structural diagram of microfluidic chip with 24 channels

以 10 μL 体系为例,微流控芯片恒温扩增核酸分析反应试剂及用量为: F3 和 B3, 用量为 0.2 μmol ; FIP 和 BIP, 用量为 1.6 μmol ; LF 和 LB, 用量为 0.4 μmol ; Bst DNA 聚合酶, 用量为 8 U (1 U = 200 mL); dUTP (New England Biolabs Ltd., Beverly, USA), 用量为 0.1 mmol; dNTPs, 用量为 0.4 mmol; 牛血清白蛋白 (BSA) (Fluka Sigma-Aldrich Inc., Missouri, USA), 用量为 0.5 g/L; EvaGreen (Biotium Inc., California, USA), 用量为 0.6 \times ; 甜菜碱 (betaine) (Fluka Sigma-Aldrich Inc., Missouri, USA), 用量为 0.8 mol; 硫酸镁, 用量为 6 mmol; Uracil-DNA 转葡萄糖基酶 (Fermentas Inc., Burlington, Canada), 用量为 0.1 U/mL; 硫酸铵, 用量为 10 mmol; 三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris-HCl), 用量为 20 mmol (25 $^{\circ}\text{C}$, pH=8.8), 氯化钾, 用量为 10 mmol; 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100), 用量为 0.1%; 模板 DNA, 用量为 2 μL 。除给出的厂家外,其余试剂均可按照生物试剂标准要求购买。

2.3 微纳体系共焦面成像光学检测原理

为了解决微纳体系中少数几个或单分子扩增检测的科学技术难题,设计了一种共焦面成像光学滤波检测系统结构,实现微流控芯片上微纳体系核酸恒温扩增分子诊断,如图 3 所示。物镜 L2 和成像

透镜 L3 各由 3 个镜片组成,微流控芯片处于物镜 L2 的焦平面上,小孔光阑 PH 处于成像透镜 L3 的焦平面上。该共焦面成像光学滤波检测系统可有效降低背景噪声,提高检测灵敏度,获得微反应腔体中低拷贝痕量样品的核酸扩增实时荧光信号^[27]。

图 3 为激发光路图,功率为 1 W 的蓝光 LED 发出的波长为 470 nm 的光经过非球面镜 L1 准直后,透过二向色分束镜 DM 并被反射镜 M1 反射,最后被物镜 L2 聚焦在微流控芯片上。激发光功率为 7 mW,用于激发微反应腔体中核酸扩增产物发出荧光。在图 3 的荧光接收光路中,微反应腔体中核酸扩增产物发出的荧光被物镜 L2 接收并准直成平行光。准直后的平行光被反射镜 M1 反射,后被 DM 反射,并经过滤色片 F2 的过滤,最后被成像透镜 L3 会聚在小孔光阑 PH 上。经过空间滤波后的光被探测器 PMT 接收,通过数字信号处理器处理后存储,并实时显示在液晶屏 LS 上,同时可绘制可视化的核酸扩增实时荧光信号曲线。旋转电机用于带动微流控芯片旋转,通过控制旋转扫描周期,每隔 30 s,对微流控芯片上的每个检测孔照射一次,采样时间为 10 ms,有效降低光漂白,实现对 24 个微反应腔体的有序检测,满足多指标并行检测要求。锂电池电源 ES 用于给系统供电,温度控制器 PID 用于控制加热膜,给微流控芯片加热,保证微反应腔体

温度为 65 °C,且恒定不变。严格控制微流控芯片与加热薄膜之间的距离为 (0.15 ± 0.05) mm,提高传热速度,通过旋转微流控芯片保证各微反应通道的温度均匀性。通信模块 TX 可与外界进行有线和无线通信并传递数据,满足不同环境应用和远程医疗使用需要。在图 2 中,微流控芯片的每个反应腔体是直

径为 2 mm、深度为 300 μm 的圆柱体。将微流控芯片的初始检测位置定位在圆柱体中心 150 μm 处,保证即使出现 ± 0.05 mm 的转动离焦,依然在每个反应腔体 (150 ± 50) μm 的有效范围。微流控芯片的每个反应腔体内样品的分布均匀,避免转动离焦间距变化对共焦面成像荧光检测信号的影响。

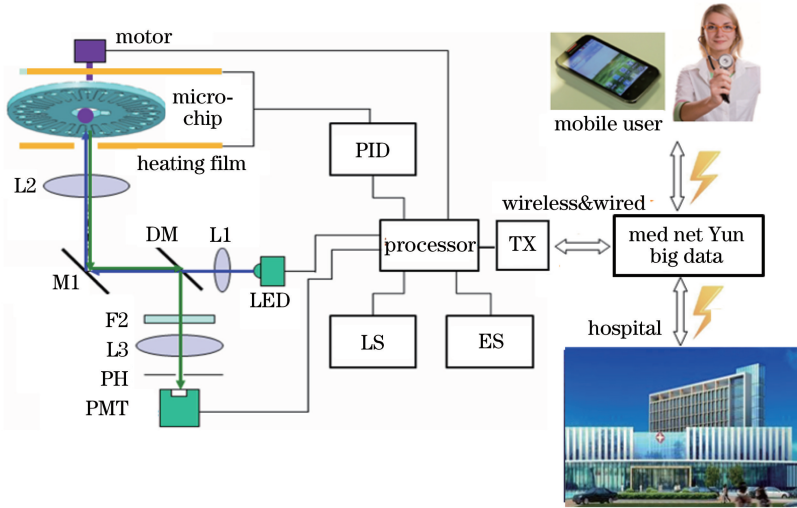


图 3 核酸分析仪原理结构

Fig. 3 Schematic diagram of nucleic acid analyzer

3 实验结果

3.1 微流控芯片病原菌核酸恒温扩增精准医学分析系统

基于图 3 所示的共焦成像检测系统原理结构,通过多学科交叉系统集成,研制出新型恒温扩增微流控芯片核酸分析仪(RTisochip™-A 和 RTisochip™-P),如图 4(a)所示,二者分别满足室内和户外 2 种不同实验条件和应用场景的实际需要。仪器中采用超高速/超低速并存的一体化消隙传动结构,用一个步进电机同时实现高速(≥ 8000 r/min)旋转离心进样与

低速(≤ 2 r/min)旋转扫描检测。采用导数化斜率拟合移动平均时空滤波算法,实现快速数字图像平滑处理,满足了微流控芯片核酸恒温扩增精准医学分子诊断的实际应用需要。图 4(b)是基于图 2 中微流控芯片、恒温扩增反应试剂和病原菌特异基因探针开发的微流控芯片病原菌检测试剂盒。在实际使用中,只需要将待检测核酸样品与试剂盒中反应试剂混合,将其加入微流控芯片中,然后放入微流控芯片核酸分析仪中,启动检测软件即可自动完成全部操作,液晶屏上显示实时检测曲线,并给出精准的医学诊断分析结果。

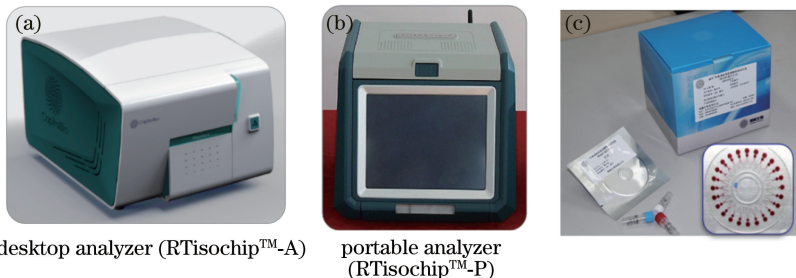


图 4 (a)(b)微流控芯片核酸分析仪的实物照片;(c)微流控芯片试剂盒照片

Fig. 4 (a)(b) Photos of micro-fluidic chip based nucleic acid analyzer; (c) photo of micro-fluidic chip kit

恒温扩增微流控芯片核酸分析仪的主要性能指标为:1)并行检测通道 24 个,检测指标 ≤ 22 项/次;

2)检测灵敏度为 10 copies;3)检测稳定性相对误差(CV)不大于 10%;4)样品消耗量为 0.94 μL ;5)荧

光检测线性因子 $R^2 \geq 0.99$; 6) 完成核酸检测分析的时间 $t \leq 45$ min。

3.2 微流控芯片核酸恒温扩增的灵敏度、线性度与特异性测试验证

为了论证微流控芯片核酸恒温扩增检测技术的可靠性,从检测灵敏度、线性度与特异性三个方面对所设计的分子探针和研制的微流控芯片与恒温扩增核酸分析仪进行联合实验验证,结果如图 5 所示。采用金黄色葡萄球菌(Sau)核酸样品,将其稀释成 $10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1$ copies/ μL 6 个浓度梯度。在微流控芯片上依次进行核酸恒温扩增检测,获得不同浓度下核酸恒温扩增检测的实时荧光信号曲线如图 5(a)所示,对应实时荧光信号曲线的指数级扩增起峰时间(TP)分别为 13.19, 14.73, 16.31, 19.36, 20.94, 23.15 min, 每个浓度重复 5 次的 CV 分别为 2.77%、3.69%、2.51%、1.72%、5.09% 和 8.65%。由于微流控芯片上单个微反应腔体的容积约为 $1 \mu\text{L}$,因此微流控芯片核酸恒温扩增的检测灵敏度

为 10 copies。对上面 6 个浓度梯度样品的核酸恒温扩增 TP 值进行线性拟合分析,结果如图 5(b)所示,线性度因子 $R^2 = 0.99$,说明不同浓度的 TP 值存在良好的线性相关性,借助拟合曲线和测量的 TP 值可计算出核酸样品的相对浓度,并进行半定量测量分析。最后,用低熔点琼脂糖凝胶(CL-4)在微流控芯片的不同微反应腔体底部包埋用于分子诊断的特异引物探针,一种检测指标的 6 段特异引物探针全部包埋在一个微反应腔体底部。采用一个检测指标和一个空白对照交替排列的方式,验证所设计分子诊断引物探针的特异性,实验结果如图 5(c)所示。从图 5(c)可看出,除实验设置的三种病原菌检测指标[Sau, Mpn, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)]和阳性质控 PC 产生了 S 型正常扩增曲线外,空白对照和阴性质控(NC)均没有产生明显的荧光扩增信号。由此说明所设计的分子诊断引物探针具有良好的特异性,微流控芯片也具有很好的防止交叉污染性能。

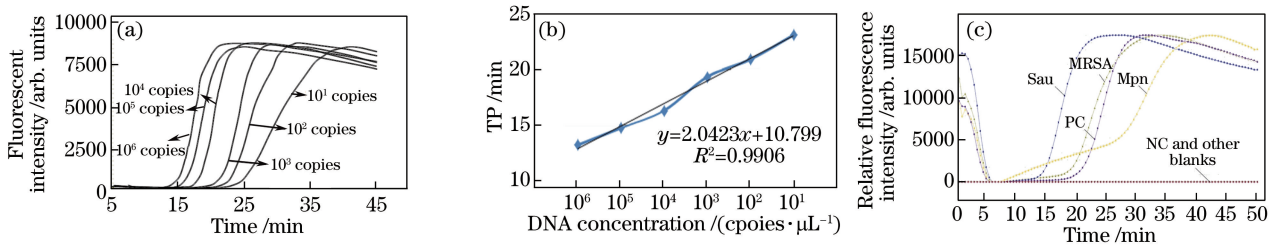


图 5 微流控芯片核酸恒温扩增检测结果。(a)灵敏度测试分析结果;(b)线性度测试结果;(c)特异性测试结果
Fig. 5 Results of microfluidic chip based isothermal nucleic acid amplification. (a) Result of sensitivity test;
(b) result of linearity test; (c) result of specificity test

3.3 微流控芯片病原菌核酸恒温扩增检测的临床应用

通过与北京大学附属人民医院、首都医科大学附属北京儿童医院等临床单位合作,收集临床上常见的呼吸道感染上呼吸道样品(如痰液、口腔拭子洗脱液等)作为检测对象。选择常见病原菌指标(Sau, Mpn 和 MRSA)进行临床样品微流控芯片核酸恒温扩增精准医学检测分析,验证所设计的分子探针和所研制的微流控芯片与恒温扩增核酸分析仪进行联合实验的可靠性。与流行的 PCR 方法进行盲测对比,选用国外进口仪器 ABI 7500、已经获得批准上市的金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌核酸检测 PCR 试剂盒[注册号:国食药监械(准)字 2011 第 3400251 号]和肺炎支原体核酸检测 PCR 试剂盒[注册号:国食药监械(准)字 2012 第 3400008 号]。实验结果如表 2 所示,临床样品共

100 例,包含 10 岁以下儿童(11 例)、中壮年人(37 例)、70 岁以上老人(52 例)不同年龄阶段人群,其中男性 71 例、女性 29 例。从表 2 可以看出,检测指标金黄色葡萄球菌的阳性符合率为 100%,阴性符合率为 98.7%,总符合率为 99.0%;检测指标肺炎支原体的阳性符合率为 93.3%,阴性符合率为 98.8%,总符合率为 98.0%;检测指标耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的阳性符合率为 100%,阴性符合率为 98.7%,总符合率为 99.0%。将三个指标综合起来进行统计,得到阳性符合率为 98.3%,阴性符合率为 98.8%,总符合率为 98.7%。由此可以说明,将所设计的分子探针和所研制的微流控芯片与恒温扩增核酸分析仪进行联合实验,所得结果具有良好的稳定可靠性,且与流行的 PCR 方法的结果具有高度一致性,总符合率大于 98%。

表 2 的统计分析结果的计算公式如下:

表 2 临床样品检测实验结果
Table 2 Results of clinical sample test

Test index	Result from developed analyzer	Result from ABI 7500			Positive coincidence rate /%	Negative coincidence rate /%	Total coincidence rate /%
		Positive No.	Negative No.	Subtotal No.			
Sau	Positive No.	23	1	24	100	98.7	99.0
	Negative No.	0	76	76			
	Subtotal No.	23	77	100			
MRSA	Positive No.	22	1	23	100	98.7	99.0
	Negative No.	0	77	77			
	Subtotal No.	22	78	100			
Mpn	Positive No.	14	1	15	93.3	98.8	98.0
	Negative No.	1	84	85			
	Subtotal No.	15	85	100			
Total	Positive No.	59	3	62	98.3	98.8	98.7
	Negative No.	1	237	238			
	Subtotal No.	60	240	300			

1) 检测指标的阳性符合率 = 开发仪器检出的阳性数 / (开发仪器检出的阳性数 + 对比仪器检出的阳性数) × 100%。

2) 检测指标的阴性符合率 = 开发仪器检出的阴性数 / (开发仪器检出的阴性数 + 对比仪器检出的阴性数) × 100%。

3) 检测指标检测结果与对比仪器的总符合率 = (开发仪器检出的阳性数 + 开发仪器检出的阴性数) / (开发仪器检出的阳性数 + 对比仪器检出的阴性数 + 对比仪器检出的阳性数 + 开发仪器检出的阴性数) × 100%。

4 分析与讨论

4.1 微流控芯片核酸恒温扩增方法与 PCR 方法的比较

核酸扩增技术主要有 PCR 与恒温扩增两大类。在 PCR 方法中,一个扩增周期只有在延伸阶段才进行核酸合成,从时间上计算,变温扩增方法用于核酸扩增的有效时间仅占全部时间的 50%。与 PCR 方法不同,所采用的恒温扩增方法全程保持在 65 °C 左右(该温度可根据所使用酶的不同进行调节),无需高温变性和低温退火过程,不存在温度变化引起的时间损耗,因此其扩增速度非常快,可在 40 min 左右时间内将靶核酸扩增到 10⁹ copies 以上。同样从时间上计算,恒温扩增方法在全部时间内均进行核酸扩增,时间利用率可达到 100%。

利用恒温扩增方法的优势,结合在光学共焦面成像系统结构、离心进样空气隔离微流控芯片、核酸恒温扩增特异基因探针设计、亚毫米薄层空气浴加热 PID 控温、表面化学处理和高速离心进样与低速旋转扫描检测等方面的一系列创新,最终使所研究的恒温扩增微流控芯片核酸分析系统能够实现样品与试剂消耗少于 1 μL、检测灵敏度提高至 10 copies、检测时间减少至 45 min 的痕量核酸精准快检分析鉴定。该系统所需的样品与试剂消耗比国内外 EP 管式产品减小 5%,检测灵敏度提高 2 个数量级,检测时间比 PCR 方法缩短一半,而仪器价格、操作复杂程度、检测成本等远低于基因测序方法和 PCR 方法。

4.2 病原菌核酸恒温扩增临床应用的不一致样品分析

对 2 例不符合样本进行重复测量,并用分子诊断金标准——基因测序方法进行复核,结果如表 3 所示。两种方法的复核结果与初始盲测结果完全相同,说明两种方法的测量结果是稳定的。通过与分子诊断的金标准进行对比,结果表明所研究的恒温扩增微流控芯片核酸分析方法的测量结果与基因测序方法更加吻合,临床符合性更好。进一步分析原因,发现 2 份样品的核酸含量在 10 copies 水平,由此说明研发恒温扩增微流控芯片核酸分析方法在低丰度核酸含量样品分析中具有更好的稳定可靠性。

表 3 测试结果不一致样品分析
Table 3 Analysis of discrepancy samples of test result

Sample No.	ABI 7500	Developed analyzer	Reanalysis by ABI 7500	Reanalysis by developed analyzer	Sequencing
22	Mpn	Sau	Mpn	Sau	Sau
32	Sau	Sau, MRSA	Sau	Sau, MRSA	Sau, MRSA

5 结 论

针对精准医学临床医疗实际应用需要进行高通量、快速、并行、准确鉴定疾病起因的诊断理论与检测技术创新,研究了一种微流控芯片病原菌核酸恒温扩增实时检测分子诊断技术与系统,实现了微纳升体系($<1 \mu\text{L}$)痕量(10 个拷贝数)核酸扩增精准检测分子诊断。在一张小小的微流控芯片上能够同时完成 20 项以上病原菌检测指标的快速并行检测,通过 100 例临床样品盲测,发现该方法与 PCR 方法的准确性符合率大于 98%。采用基因测序方法对 2 例低丰度不一致样品进行复核,结果表明所用的方法与基因测序方法更加吻合,在低丰度核酸含量样品分析中具有更好的可靠性。该研究可作为一种低成本精准医疗平台技术造福中国,后续工作将集成原始样品处理功能,发展成“原始样本进、结果出”的全集成分析系统,以满足不同环境场合的实际应用需要。

致谢 感谢北京大学附属人民医院、首都医科大学附属北京儿童医院等提供临床样品,参与完成临床验证实验。

参 考 文 献

- [1] 中国行业研究网. 我国仪器仪表产品进出口现状分析[OL]. (2014-04-03) [2017-07-31]. <http://www.chinairn.com/news/20140403/154213536.shtml>.
- [2] 杨帆. 2016 年前三季度我国医疗器械进出口数据分析[OL]. (2016-11-19) [2017-07-31]. <https://bg.qianzhan.com/report/detail/459/161119-272c1a87.html>.
- [3] Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1394-1399.
- [4] Li K S, Guan Y, Wang J, *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia[J]. *Nature*, 2004, 430(6996): 209-213.
- [5] Saiki R K, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. *Science*, 1985, 230(4732): 1350-1354.
- [6] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J]. *Science*, 1988, 239(4839): 487-491.
- [7] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Nature*, 1991, 350(6313): 91-92.
- [8] Walker G T, Fraiser M S, Schram J L, *et al.* Strand displacement amplification - An isothermal, in vitro DNA amplification technique[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(7): 1691-1696.
- [9] Liu D, Daubendiek S L, Zillman M A, *et al.* Rolling circle DNA synthesis: Small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(7): 1587-1594.
- [10] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): e63-e63.
- [11] Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M. Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation-rolling circle amplification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 37(3): e19.
- [12] Lee S Y, Huang J G, Chuang T L, *et al.* Compact optical diagnostic device for isothermal nucleic acids amplification[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 133(2): 493-501.
- [13] Suárez G, Jin Y H, Auerswald J, *et al.* Lab-on-a-chip for multiplexed biosensing of residual antibiotics in milk[J]. *Lab on a Chip*, 2009, 9(11): 1625-1630.
- [14] Martinez A W, Phillips S T, Whitesides G M, *et al.* Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices[J]. *2010*, 82(1): 3-10.
- [15] Shi X, Lin L I, Chen S, *et al.* Real-time PCR of single bacterial cells on an array of adhering droplets [J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(13): 2276-2281.
- [16] Govindarajan A V, Ramachandran S, Vigil G D, *et al.* A low cost point-of-care viscous sample preparation device for molecular diagnosis in the developing world; an example of microfluidic origami [J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(1): 174-181.
- [17] Wang T Z, Zhang Y, Huang G L, *et al.* Detect early stage lung cancer by a LAMP microfluidic chip

- system with a real-time fluorescent filter processor [J]. *Science China Chemistry*, 2012, 55(4): 508-514.
- [18] Zhou Q J, Wang L, Chen J, *et al.* Development and evaluation of a real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification assay integrated on a microfluidic disc chip (on-chip LAMP) for rapid and simultaneous detection of ten pathogenic bacteria in aquatic animals[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 104: 26-35.
- [19] Lin X, Jin X, Fan Y, *et al.* Detection and classification of ebola on microfluidic chips[C]. SPIE, 2016, 10024: 100240B
- [20] Li Q, Fu R, Zhang J, *et al.* Label-free method using a weighted-phase algorithm to quantitate nanoscale interactions between molecules on DNA microarrays [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(6): 3501-3507.
- [21] Zhang J, Fu R, Xie L, *et al.* A smart device for label-free and real-time detection of gene point mutations based on the high dark phase contrast of vapor condensation [J]. *Lab on a Chip*, 2015, 15(19): 3891-3896.
- [22] Wang T, Li Q, Li X, *et al.* Use of hyperspectral imaging for label-free decoding and detection of biomarkers[J]. *Optics letters*, 2013, 38(9): 1524-1526.
- [23] Zhu J, Lu Y, Deng C, *et al.* Assessment of fluorescence resonance energy transfer for two-color DNA microarray platforms[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(12): 5304-5312.
- [24] Han C, Zhang Q, Ma R, *et al.* Integration of single oocyte trapping, in vitro fertilization and embryo culture in a microwell-structured microfluidic device [J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(21): 2848-2854.
- [25] Huang G, Wang C, Ma L, *et al.* Sensitive sequence-specific molecular identification system comprising an aluminum micro-nanofluidic chip and associated real-time confocal detector[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 695(1): 1-10.
- [26] Huang G L, Xia Y J, Gao S K, *et al.* Biomedical detection technology and clinic examination[M]. Beijing: Tsinghua university press, 2014: 249-265. 黄国亮, 夏永静, 高上凯, 等. 生物医学检测技术与临床检验[M]. 北京: 清华大学出版社, 2014: 249-265.
- [27] Huang G L, Tian H, Li Z Y, *et al.* Study of high sensitive and fast detection to trace sample and portable system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(2): 0217003. 黄国亮, 田浩, 李志永, 等. 痕量样品高灵敏度快速测量方法与便携式系统研究 [J]. *光学学报*, 2012, 32(2): 0217003.