

# 注射式微流控芯片全集成核酸分析系统与精准医疗应用

黄琴, 黄乐阳, 靳翔宇, 毛则尹, 邓安妮, 吕文琦, 钟豪, 王铨弘, 石艺璇, 陈家辉, 黄世光, 黄国亮\*

清华大学医学院生物医学工程系, 北京 100084

**摘要** 核酸检测方法可快速鉴定特异基因指标,但其广泛应用受限于多种仪器设备串行使用以及对操作人员的高专业技术要求。本团队开发了一套注射式微流控芯片全集成核酸分析系统,该系统主要包含两大模块,分别是可以为不同类型临床样本提供多种核酸提取方法的全自动注射式核酸提取模块,以及基于微流控芯片的微纳体系多指标联合并行检测等温扩增核酸检测模块。这两大模块既可以单独发挥各自的功能,也可以组合成全集成注射式微流控芯片核酸分析系统,形成全集成自动化、微纳反应体系、快速、多指标联合并行检测的核酸检测分析平台。采用本团队开发的注射式微流控芯片全集成核酸分析系统,分别对热带念珠菌标准株培养菌液和 64 例外阴阴道念珠菌感染疾病的临床拭子样本进行检测。结果显示:本系统对菌液的最低检测限为  $3.95 \times 10^2$  CFU/mL,而且样品制备更方便快捷,仅需 1 次加样操作,核酸提取时间为 10 min;64 例临床样本检测效果与金标准培养法相比,卡方检验为 1, Kappa 值为 0.950,说明两种方法无显著差异,且一致性很高。本团队开发的注射式微流控芯片全集成核酸分析系统,可以为临床多指标微纳体系核酸快速检测提供一个可靠的平台,为临床医疗应用提供精准快检技术与便捷分析仪器支撑。

**关键词** 医用光学; 注射式; 微流控芯片; 全集成核酸分析系统; 精准医疗应用

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL231461

## 1 引言

核酸检测是指通过对核酸分子进行分析来检测特定基因指标的技术,在临床上常被用于检测体液、组织、分泌物等样品中的病原体或疾病标志物<sup>[1-4]</sup>。在新型冠状病毒大流行期间,核酸检测作为精准诊断新型冠状病毒感染的有效方法<sup>[5-6]</sup>,得到了广泛应用。

标准的核酸检测通常分为 4 个步骤:样品预处理、核酸提取、核酸扩增和产物检测<sup>[7]</sup>。常规核酸分子诊断分析主要使用 EP 管或 96 孔板,需要首先采用步骤复杂的样品制备与核酸分离提纯方法获得核酸分子,然后将其定容到 20~25  $\mu$ L 样品试剂混合反应体系,再通过核酸扩增和产物检测分析,获得核酸检测结果。为了实现上述步骤并避免交叉污染,标准的分子诊断实验室需要设置严格分区的操作空间,并由专业技术人员串行联用多种仪器,才能实现从样品中提取核酸,进行精准生物医学分析鉴定<sup>[8]</sup>。以上这种依赖多种仪器串行联用,并要求较高专业技术人员手工操作才能实现的核酸分析方法,不易普及推广,尤其是在基层医

院进行核酸检测时难度较大。而且,基于 EP 管或 96 孔板的 20~25  $\mu$ L 大容量反应体系,样品试剂消耗较多。此外,目前临床上使用的核酸分子检测试剂盒大部分检测的是单一指标,诊断潜力有限<sup>[9-10]</sup>。因此,非常有必要研究更简便、全自动化的核酸提取和检测分析技术,以提高核酸检测速度,同时最大限度地减少人为干预<sup>[11]</sup>。

微型全分析系统是近几年发展起来的先进的核酸分析方法,其核心是微流控技术<sup>[12]</sup>,以微流控芯片替代传统的 EP 管或 96 孔板,实现核酸分析的全封闭、自动化<sup>[13-19]</sup>。在国际上,已有少数公司推出了全集成式液体活检系统,如美国 Cepheid 公司在 2015—2016 年推出了 GeneXpert 全集成核酸分析仪器<sup>[20-22]</sup>,法国梅里埃公司推出了 BIOFIRE FILMARRAY<sup>®</sup> Pneumonia Panel 微流控芯片检测系统<sup>[23-24]</sup>,美国 Luminex 公司于 2018 年报道了 ARIES 系统等(该系统可以实现自动快速的“样本进-结果出”的核酸检测流程<sup>[25-26]</sup>)。国内代表性的“样本进-结果出”全集成式 PCR 分析系统主要有西安天隆科技有限公司的 Panall 8000 全自动多重

收稿日期: 2023-12-01; 修回日期: 2024-02-21; 录用日期: 2024-02-26; 网络首发日期: 2024-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(61927819, 81827808, 62105177, 62375148)、国家重点研发计划(2018YFA0704000)、四川省科技计划重点项目(2021YFO0060, 2022YFS0637)、北京实验室基金与清华大学自主科研基金(20194180031, 20201080058, 2020108510)、万科公共卫生与健康学科发展专项基金(2022Z82WKJ002)

通信作者: \*tshgl@tsinghua.edu.cn

病原检测分析系统、广州达安基因股份有限公司的 DA7600 实时荧光定量 PCR 仪系列、基蛋生物科技股份有限公司的 Innovita 系列产品等, 这些产品都实现了样本的自动化检测。但以上产品从技术上来说主要采用变温 PCR 核酸扩增技术, 核酸扩增的时间利用率  $\leq 50\%$ <sup>[27]</sup>。从系统复杂度上来看, PCR 变温扩增方法对温度控制精度和升降温速度的要求较高, 直接制约着扩增效率和扩增产物的特异性<sup>[28]</sup>, 同时也提高了相应仪器设备的制造成本。

核酸等温扩增技术在恒温条件下即可实现核酸扩增, 核酸扩增的时间利用率为 100%, 具有高扩增效率的特性。目前常用的核酸等温扩增技术有依赖核酸序列的扩增 (NASBA) 技术<sup>[29]</sup>、滚环扩增 (RCA) 技术<sup>[30-31]</sup>、链置换扩增 (SDA) 技术<sup>[32]</sup>、解旋酶依赖性扩增 (HDA) 技术<sup>[33]</sup>、环介导等温扩增 (LAMP) 技术<sup>[34]</sup>、重组酶聚合酶扩增 (RPA) 技术<sup>[35]</sup>等。北京博奥晶典生物技术有限公司的全集成碟式芯片系统<sup>[36]</sup>和杭州优思达生物技术股份有限公司的全集成核酸分析系统<sup>[37]</sup>, 都是基于核酸等温扩增技术开发的微型全分析系统。但是, 现有的全集成核酸分析系统灵活性不足, 不能满足不同类型临床样本的样品预处理和核酸提取流程要求<sup>[38]</sup>。

针对上述问题, 本研究团队开发了注射式结构的样品预处理与核酸提取模块, 该模块可根据不同类型的临床样本灵活地调整样品预处理和核酸提取流程; 同时对本团队开发的基于 LAMP 技术的全封闭式 PC 材料多指标联合检测微流控芯片<sup>[39]</sup>和核酸扩增产物检测模块进行优化迭代, 使之可与注射式结构的样品预处理与核酸提取模块适配, 并将这两大模块组合为新型的全集成核酸分析系统。本团队将该全集成核酸分析系统应用于临床妇科多种病原体感染的精准医学检测, 结果显示: 本系统可以实现全集成自动化、微纳反应体系、快速、高灵敏度和高特异性、多指标联合并行检测的核酸检测精准医学分子诊断, 具有很高的临床应用价值。该技术同样适用于遗传性疾病鉴定以及其他核酸相关疾病的体外精准医学分子诊断, 对于重大疾病防治具有重要的社会意义。

## 2 核酸提取注射器结构构建

注射器结构核酸提取系统容量为 1.5 mL, 主要由注射器和储液卡盒组成, 其中注射器下端装有滤膜, 储液卡盒由反应体系池、清洗液池和废液池三部分组成。其结构设计如图 1 所示。

该注射器结构的核酸提取系统可用于实现多种类型临床样本的样品预处理与核酸提取功能。其中, 注射器管筒内存储液体, 注射器推杆、活塞用于实现流体操控。注射器管筒的出口处装有滤膜, 它可在核酸提取过程中使各试剂通过且能避免细胞、病菌等被排出。该滤膜通过管筒和针座间的螺纹结构进行固定, 同时

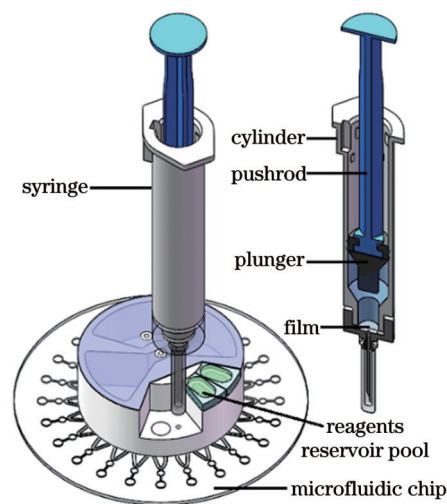


图 1 注射式核酸提取与微流控芯片检测系统原理结构图示和剖面图

Fig. 1 Structure and sectional view of the nucleic acid extraction syringe and microfluidic chip detection system

通过滤膜底部的密封垫圈实现密封。

本研究以一种真菌热带念珠菌为例来说明该注射器结构核酸提取系统的使用方法。核酸提取的具体操作流程如图 2 所示。

对于真菌, 本核酸提取系统目前主要采用微珠研磨的方法提取核酸。以热带念珠菌为例, 向注射器内的样本中加入二氧化硅微珠, 并对注射器进行加热振荡, 通过微珠在振荡中的碰撞、剪切等运动来破坏病原菌的结构, 从而释放出核酸。使用注射器结构的核酸提取系统提取热带念珠菌的核酸, 试剂主要包括溶菌酶溶液和超纯水, 其中溶菌酶溶液的试剂成分为 20 mg/mL 溶菌酶、0.33 U/ $\mu$ L 溶壁酶、1 mol/L 山梨醇、100 mmol/L EDTA、14 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH: 7.2~7.4)。主要使用的耗材包括粒径为 100  $\mu$ m 的二氧化硅微珠、孔径为 450 nm 的聚四氟乙烯滤膜和注射器及相关配件。具体操作步骤为:

1) 向注射器装填样品。取下注射器的推杆及活塞, 向注射器管筒中加入 100 mg 二氧化硅微珠; 取 1 mL 菌液, 在 7500 r/min 转速下离心 10 min 并去上清液, 加入 600  $\mu$ L 溶菌酶溶液混匀, 将该样本加入注射器, 然后将推杆及活塞推入注射器管筒。

2) 孵育。将装好样本的注射器放置在注射器-微流控芯片全集成核酸分析系统上, 在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 30 min, 最后通过仪器控制注射器的推杆, 推出注射器中的孵育废液。

3) 清洗。控制注射器的推杆, 使注射器吸取 600  $\mu$ L 的超纯水, 最后推出注射器中的清洗废液。

4) 加热振荡裂解。注射器吸取 600  $\mu$ L 超纯水, 在 99  $^{\circ}$ C 加热, 同时以 4000 r/min 的转速振荡 10 min, 进行裂解, 最后得到核酸溶液。

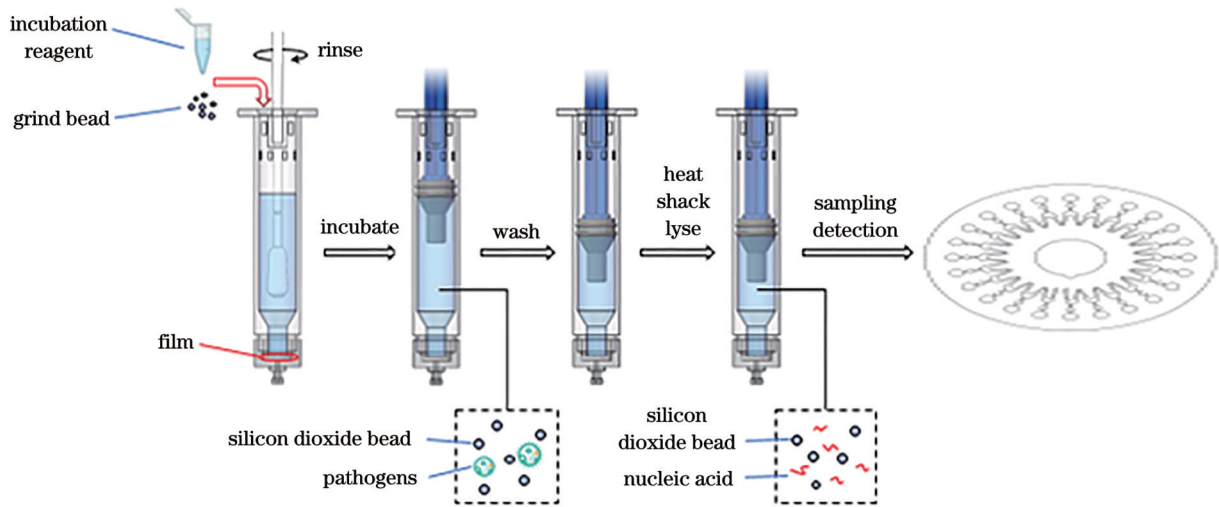


图 2 注射器结构核酸提取系统进行核酸提取的流程示意图

Fig. 2 Schematic diagram of nucleic acid extraction process by a syringe structure nucleic acid extraction system

### 3 微流控芯片核酸扩增检测系统的构建

微流控芯片核酸扩增检测系统主要由核酸扩增平台和核酸检测平台两部分构成,其中核酸扩增平台包含作为核酸扩增载体的微流控芯片和控制核酸扩增的温控系统,核酸检测平台包含对核酸扩增进

行荧光实时检测的荧光检测系统、运动控制操作系统及结果判读软件系统。下面将对各个平台进行详细介绍。

#### 3.1 微流控芯片核酸扩增平台

本研究采用碟式微流控芯片作为核酸等温扩增的载体,该微流控芯片的设计图、实物图和工作原理如图 3 所示。

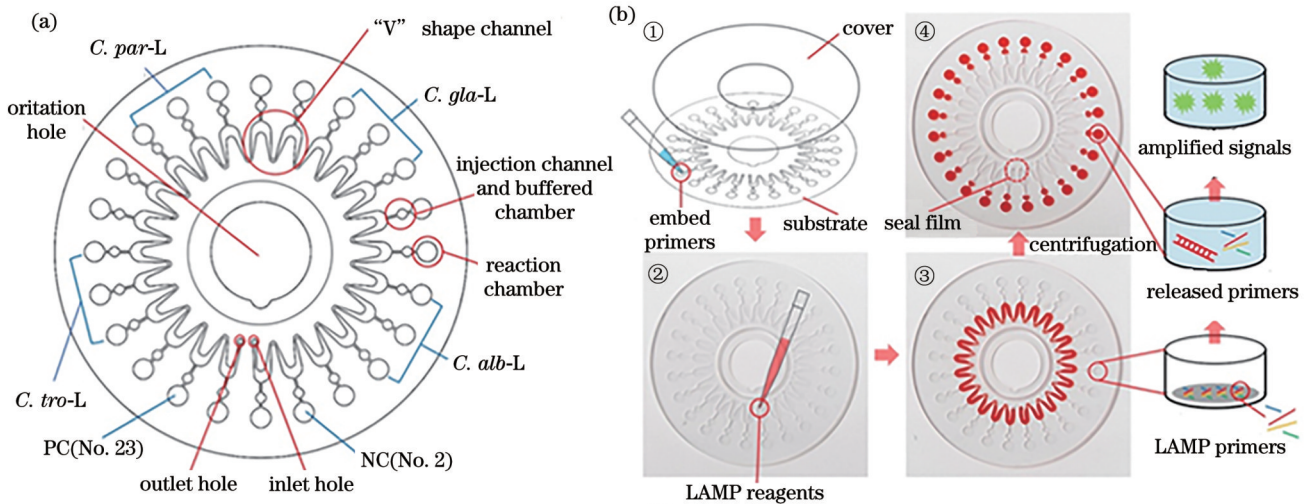


图 3 微流控芯片的设计图、实物图和工作原理。(a) 基片的设计图和引物的预埋顺序;(b) 微流控芯片的实物图和工作原理。*C. alb-L*、*C. gla-L*、*C. par-L* 和 *C. tro-L* 表示预埋到反应腔室中的引物类型。LAMP 反应体系在实际使用时为透明色,此处在此体系中加入红色素用于显示扩增试剂在芯片中所处的位置。PC, 阳性对照;NC, 阴性对照;No., 编号

Fig. 3 Design, physical pictures and working principle of the microfluidic chip. (a) Design of the substrate and primer embedding sequence; (b) physical picture of the microfluidic chip and its working principle. *C. alb-L*, *C. gla-L*, *C. par-L*, and *C. tro-L* represent the types of primers embedded in the reaction chamber. LAMP reaction reagent is transparent in real, and red pigment is added here to indicate the location of the amplification reagent on the chip. PC, positive control; NC, negative control; No., serial number

碟式微流控芯片由聚碳酸酯(PC)注塑加工而成,包括刻有微流控管道的基片和粘贴有双面胶的盖片两部分。芯片直径为 60 mm,厚度为 0.6 mm。每张芯片设计有 24 个反应腔室,反应腔室均匀分布

在芯片表面半径为 25 mm 的圆周上,反应腔室的直径为 3 mm,深度为 0.2 mm,容积约为 1.41  $\mu\text{L}$ ,每两个反应腔室之间的夹角为 15°。反应腔室之间由 V 形微流控管道相连,管道起始于进样孔,终止于出样

孔,管道在靠近反应腔室端较粗,远离反应腔室端较细,每个 V 形管道的容积约为  $2\ \mu\text{L}$ 。微流控管道和反应腔室之间由截面为  $0.2\ \text{mm}\times 0.2\ \text{mm}$  的进样管道相连,进样管道中间设置有一个直径为  $1\ \text{mm}$ 、深度为  $0.2\ \text{mm}$  的缓冲腔。芯片中间为定位孔,用于固定和定位芯片。

微流控芯片经三步处理后可以用于后续 LAMP 检测和分析。第一步为芯片清洗,依次使用无水乙醇和超纯水浸泡基片并进行超声处理,之后甩干或用氮气吹干,即得清洗洁净的基片。第二步为引物预埋,将含有  $756\ \text{mg/L}$  低熔点琼脂的 LAMP 引物组,按顺序点样到反应腔室中,待点样体系干燥后,即得预埋了引物的基片。第三步为芯片封装,将基片和盖片贴合,使用气动冲床使基片与盖片紧密结合,之后将贴合好的芯片真空密封,即得到了可用于 LAMP 检测和分析的微流控芯片。芯片可置于  $4\ ^\circ\text{C}$  或  $-20\ ^\circ\text{C}$  环境中保存备用。

在使用微流控芯片时,首先配制  $50\ \mu\text{L}$  的 LAMP 反应体系,体系中原有的引物组用无酶无菌水替代;然

后使用上面的注射器吸入 LAMP 反应体系,将 LAMP 反应体系与注射器内部提取的核酸进行振荡混匀,接着经由加样孔将混匀后的 LAMP 反应体系加入微流控管道,之后使用封口膜将进样孔和出样孔封闭。最后将芯片置于仪器中,仪器通过  $30\ \text{s}$ 、 $5000\ \text{r/min}$  的离心处理将 LAMP 反应体系等分并转移到各反应腔体中,之后便执行加热和荧光采集程序,获得 LAMP 反应体系的实时荧光曲线。在反应期间,由于芯片被加热至  $65\ ^\circ\text{C}$ ,高于低熔点琼脂的熔胶温度,预埋的 LAMP 引物被释放到 LAMP 体系中,参与反应并产生扩增产物。荧光染料与扩增产物结合后,即可在激发光下产生荧光信号。

### 3.2 核酸扩增温控系统

核酸扩增温控系统主要由加热膜、金属导热盖盘、PT100 热电阻传感器、过热保护器、保温层以及与外部连接的 PID 控制器组成,其结构图和实物图如图 4 所示。温度控制模块分为上下两半部分,两部分都包含加热膜、金属导热盖盘、PT100 热电阻传感器、过热保护器和保温层 5 部分,如图 4(a)所示。

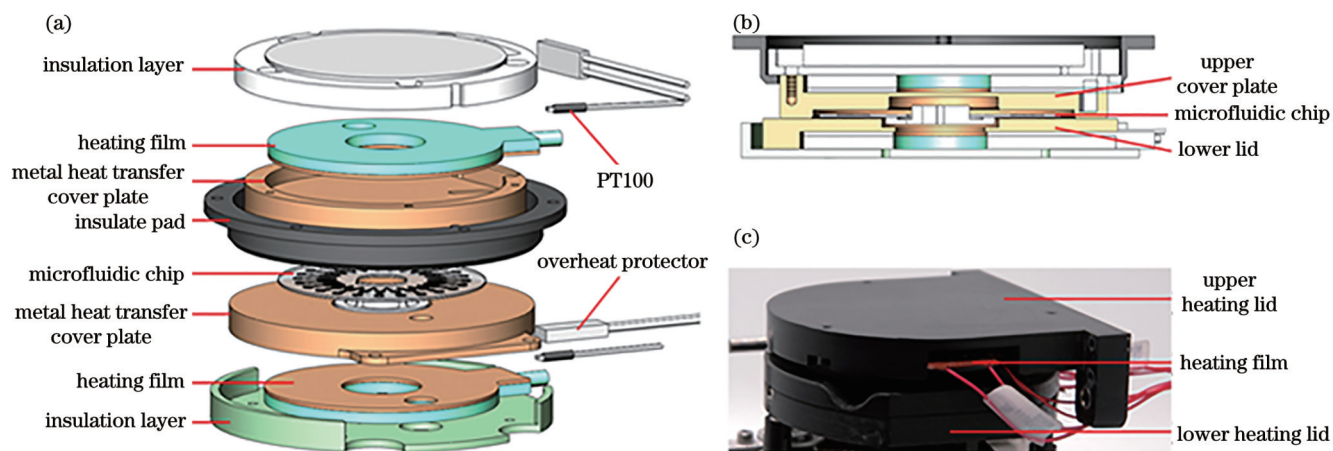


图 4 温度控制模块结构图和实物图。(a)温度控制模块分层结构图;(b)温度控制模块组装结构图;(c)温度控制模块实物图  
Fig. 4 Structural diagram and physical picture of the temperature control module. (a) Hierarchical diagram of the temperature control module; (b) structural diagram of the temperature control module; (c) physical picture of the temperature control module

加热膜是直径为  $70\ \text{mm}$  的 PI 膜,其中心有直径为  $24\ \text{mm}$  的圆形镂空。此外,下半部分加热膜在半径  $25\ \text{mm}$  处还有一个直径为  $10\ \text{mm}$  的圆形镂空,用于使荧光检测模块的光线通过。加热膜的工作电压为  $24\ \text{V}$ ,加热温度范围为  $37\sim 90\ ^\circ\text{C}$ 。金属导热盖盘为铝制机械件,厚度为  $3\ \text{mm}$ ,具有良好的导热性,与加热膜紧密贴合,可以实现热量的快速传导,保证升温 and 降温效率。PT100 热电阻传感器与加热膜、金属导热盖盘紧密贴合,可实现  $-50\sim 150\ ^\circ\text{C}$  温度范围的测温,测温精度可达  $\pm 0.15\ ^\circ\text{C}$ ,与 PID 控制器联用实现对加热膜和金属导热盖盘的控温。此外,过热保护器(KSD9700)在 PID 控制器失能时可以起到保护平台的作用,当温度达到  $105\ ^\circ\text{C}$  时会自动切断供电。保温层为硅橡胶制件,其将金属盖盘的非微流控芯片加热

区域覆盖,可以减小模块温度受环境影响产生的波动。

微流控芯片恰好被芯片夹具固定在上下两半部分中间,芯片上表面距上层盖盘下表面的距离为  $0.3\sim 0.5\ \text{mm}$ ,芯片下表面距下层盖盘上表面的距离也为  $0.3\sim 0.5\ \text{mm}$ ,如图 4(b)所示。这一距离既保证了温度控制模块对芯片的加热效率,也不会因为直接接触产生的摩擦力干扰运动控制模块工作。此外,温度控制模块周围装有 2 个散热风扇,可以在降温期间辅助散热,提高降温效率。

### 3.3 核酸扩增荧光检测系统

核酸扩增荧光检测系统模块由 LED、透镜组、滤色片组、二向色镜和光电倍增管(PMT)探测器组成,其结构图和实物图如图 5 所示。

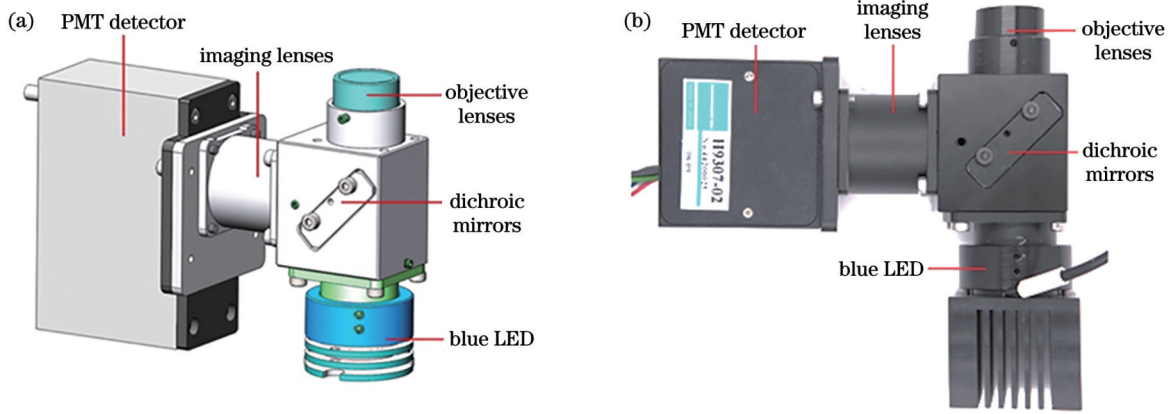


图 5 荧光检测模块的结构图和实物图。(a)结构图;(b)实物图

Fig. 5 Structural diagram and physical picture of the fluorescence detection module. (a) Structural diagram; (b) physical picture

荧光检测模块的光源为蓝光 LED (MR-B0040-20S, 恒流源驱动, 50~200 mA, 发出中心波长为 470 nm 的蓝光), 该光源发出的蓝光依次穿过聚光镜、激发滤色片 (透过中心波长为 470 nm 的蓝光) 和二向色镜后到达物镜, 被物镜聚焦到微流控芯片的反应腔室位置。在芯片的反应腔室内, 荧光染料与反应体系混合, 并且可以结合在双链 DNA 螺旋的小沟区域。在这种状态下, 荧光染料会因为外部激发光的激发而产生荧光。一般来说, 双链 DNA 含量越高, 激发产生的荧光就越强烈。聚焦在反应腔室位置的蓝光激发了结合了扩增产物的荧光染料使之发出荧光信号。以 5-FAM 染料和 SYBR Green I 染料为例, 其激发波长的有效范围分别为 465~494 nm 和 465~497 nm, 发射中心波长分别为 522 nm 和 520 nm。反应腔室发出的荧光信号再次通

过物镜到达二向色镜, 被二向色镜反射后穿过发射滤色片 (透过中心波长为 520 nm 的绿光), 再经过成像镜头聚焦到小孔光阑 (孔径为 1 mm) 处。荧光信号透过针孔光阑后被 PMT 探测器 (H9307-02) 接收, PMT 探测器将荧光信号转化成电信号, 电信号经过主控电路模块的信号放大和滤波处理后传输给计算机。

### 3.4 注射式微流控芯片全集成核酸提取与检测系统整体设计

注射式微流控芯片全集成核酸提取与检测系统由注射式结构核酸提取模块和微流控芯片核酸扩增与检测模块集成组装而成, 其中微流控芯片核酸扩增与检测系统整体上由微流控芯片核酸扩增平台、核酸扩增温控系统和核酸扩增荧光检测系统三大功能模块构成, 其整体设计图如图 6 所示。

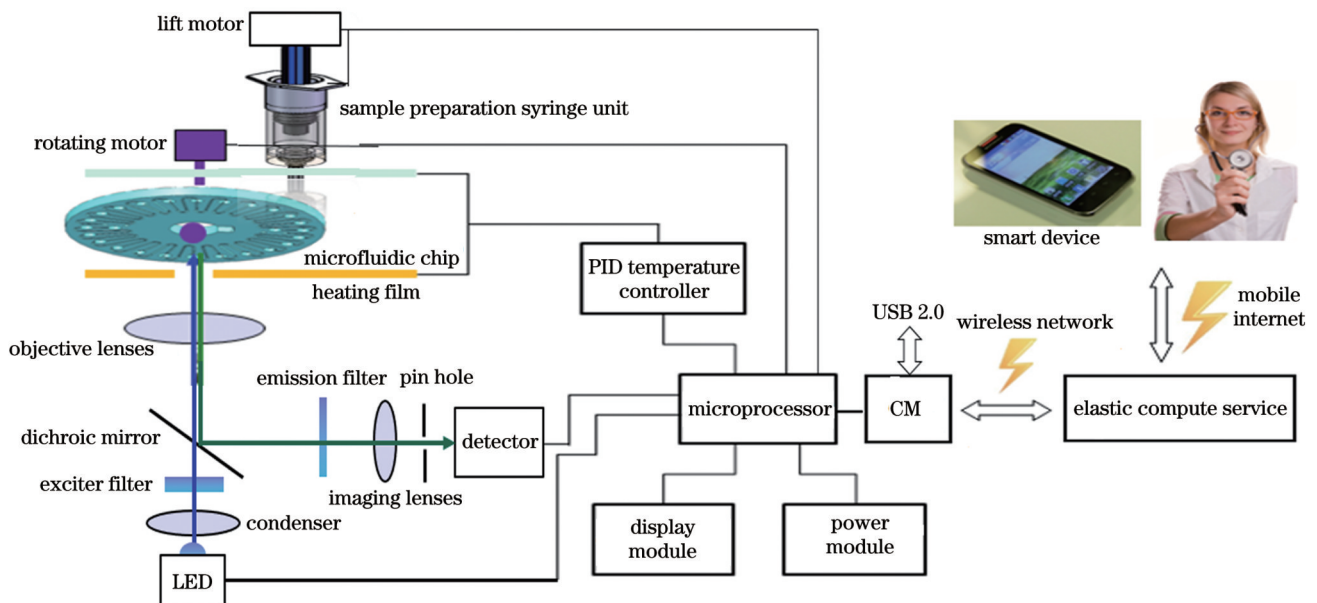


图 6 微流控芯片核酸扩增与检测系统示意图

Fig. 6 Diagram of microfluidic chip nucleic acid amplification and detection system

注射式结构核酸提取模块 (参见图 7 中 heat and shack module) 具备 95 °C 高温裂解、高速振荡机械研磨

和试剂自身化学裂解等复合样品处理制备功能。将待测样本装填进核酸提取腔内后, 根据具体临床样本的

类型,通过编程控制采取适宜的核酸提取方法自动提取核酸,并在完成核酸提取后将待测核酸注入到下方的微流控芯片中,进入下一步基于微流控芯片的核酸扩增与检测步骤。

在微流控芯片核酸扩增与检测模块中,作为核酸等温扩增和检测载体的微流控芯片,通过芯片夹具固定。温度控制模块分布在微流控芯片的上方和下方,根据软件设定值实现升温、恒温和降温操作,为核酸等温扩增提供反应条件。微流控芯片在反应期间产生的荧光信号由荧光检测模块进行检测。荧光检测模块记录检测到的荧光信号,并经由交换机和路由器将其传输到计算机中。计算机内安装着与荧光检测平台配套的软件,可以完成对荧光检测信号的实时记录与分析。该软件还可以对各模块的参数进行设置和调整,提高了荧光检测平台使用的灵活性。此外,该荧光检测平台还可以拓展,可以通过交换机将多个荧光检测平台构成的子模块并联,由同一台计算机进行控制,从硬件层面提高了荧光检测平台的检测通量和使用灵活性。本工作中使用的平台共有 8 个子模块。微流控芯片核酸扩增与检测系统的整体结构实物图如图 7 所示。

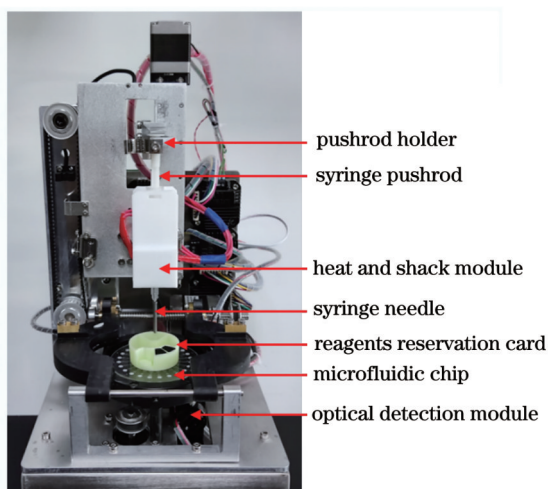


图 7 注射式微流控芯片全集成核酸提取与检测系统实物图  
Fig. 7 Physical picture of syringe-microfluidic chip based nucleic acid extraction and detection system

## 4 结果与分析

### 4.1 注射式微流控芯片全集成核酸分析系统的标准菌株检测

为了验证本团队开发的注射式微流控芯片全集成核酸分析系统的性能,用其对培养的标准热带念珠菌菌液进行检测。将新鲜菌液梯度稀释后,每份菌液平均分成两份。其中一份使用本团队开发的注射器结构核酸提取模块进行核酸提取,然后在微流控芯片核酸扩增与检测平台上进行 LAMP 核酸扩增与检测。另外一份使用商用试剂盒(QIAGEN, Cat

No. 69504) 进行核酸提取,然后将提取的核酸在 ABI7500 仪器上使用 EP 管进行 LAMP 核酸扩增与检测。由于注射器结构核酸提取模块提取的核酸样品还含有其他成分,无法通过直接测量核酸浓度的方式表征该方法的性能。同时,进一步考虑到这些多余成分可能会对后续核酸扩增和检测结果产生影响,本团队针对核酸提取和核酸扩增与检测进行全流程考虑,选用相同低浓度的原始菌液样品进行检测,重复 3 次,通过最终检测结果来表征两种方法的性能。检测结果如表 1 所示。

表 1 全集成核酸分析系统和试剂盒法的检测结果分析  
Table 1 Detection analysis of the fully integrated nucleic acid analysis system versus kit method

Detection parameter	Content	
	Fully integrated system	Kit method
Manual steps	1	10+3
Time consuming /min	10	~60
Average Ct value /min	20.9	24.4
Standard deviation (SD) /min	1.3	1.5
Coefficient of variation (CV) value /%	6.22	6.14

实验结果显示,注射式微流控芯片全集成核酸分析系统和常规试剂盒在商用 PCR 扩增仪上均能够对相同低菌落数( $3.95 \times 10^2$  CFU/mL)的热带念珠菌完成核酸扩增检测。从操作复杂度来看,注射式微流控芯片全集成核酸分析系统仅需要将菌液加入到注射式核酸提取模块中这一个加样步骤,便可以全自动完成核酸提取和检测的全部流程;而采用试剂盒提取核酸则需要经过多次离心、加液和晾干等 10 步手工操作步骤才能完成,获得核酸后还需要经过反应试剂配制、核酸加样混匀、上机扩增检测这 3 个步骤才能获得最终检测结果。采用注射式核酸提取模块进行核酸提取仅需 10 min,而采用试剂盒提取核酸则耗时约 60 min。对于两份相同的最低检测浓度菌液样本,采用全集成核酸分析系统进行核酸检测的扩增时间为 20.9 min,而在 ABI7500 PCR 扩增仪上检测的核酸扩增时间则为 24.4 min,比在微流控芯片上的出峰时间晚 3.5 min。两种方法核酸检测 Ct 值的标准差(SD)分别为 1.3 min 和 1.5 min,变异系数(CV)值分别为 6.22% 和 6.14%,两种方法检测的重复性和准确性接近。因此,从需要手工操作步骤数、核酸提取耗时和最低检测限扩增时间来看,注射式微流控芯片全集成核酸分析系统的性能优于常规的先用试剂盒提取核酸再在 PCR 扩增仪上扩增核酸的检测方法。接下来本研究将按照处理培养菌液的核酸提取和检测方法,验证注射式微流控芯片全集成核酸分析系统处理同样 4 种真

菌临床样本的效果。

#### 4.2 注射式微流控芯片全集成核酸分析系统的临床应用

为了验证本团队开发的注射式微流控芯片全集成核酸分析系统的性能,将与外阴阴道念珠菌病(VVC)相关的念珠菌作为临床检测对象,共收集了64例样本,其中25例样本含白色念珠菌,8例样本含光滑念珠菌,1例样本含近平滑念珠菌,4例样本含热带念珠菌,26例样本不含念珠菌。所有临床样品均由清华大学附属北京清华长庚医院采集和提供,临床诊断结果根

据培养基培养(金标准)结合测序鉴定结果确定。本临床验证工作已通过北京清华长庚医院医学伦理委员会审查(19204-0-03)。

先使用注射器结构核酸提取模块提取临床样本中的核酸,然后将核酸与扩增试剂混合,并注入到微流控芯片中,在微流控芯片扩增与检测平台上进行后续核酸扩增与检测。使用配对 $\chi^2$ 检验和Kappa一致性检验来检验基于全集成核酸分析系统的方法(全集成法)与临床金标准法(培养法)的一致性。相关检验结果如表2所示。

表2 4种真菌的全集成法和培养法的临床检验结果比较

Table 2 Comparison of clinical test results of fully integrated method and culture method for four fungi

Test Method	Pathogen	Culture method					Total	$P(\chi^2)$	Kappa value
		<i>C. alb</i>	<i>C. gla</i>	<i>C. par</i>	<i>C. tro</i>	Negative			
Fully integrated method	<i>C. alb</i>	23	0	0	0	0	23	1	0.950
	<i>C. gla</i>	0	8	0	0	0	8		
	<i>C. par</i>	0	0	1	0	0	1		
	<i>C. tro</i>	0	0	0	4	0	4		
	Negative	2	0	0	0	26	28		
	Total	25	8	1	4	26	64		

Notes: *C. alb* means *Candida albicans*, *C. gla* means *Candida glabrata*, *C. par* means *Candida parapsilosis*, and *C. tro* means *Candida tropicalis*.

从检测结果来看, $P(\chi^2)=1>0.05$ ,说明全集成法与培养法没有显著差异,且Kappa值为0.950( $>0.81$ ),说明全集成法与培养法的相关程度为几乎完全一致性。在具体的念珠菌鉴定过程中,有2例含白色念珠菌的样品在全集成法检测中表现为假阴性,这可能是由于反应体系的减少(全集成法中每反应体系仅为1.41  $\mu\text{L}$ )导致模板数量减少,进而导致个别检测反应的模板浓度低于LAMP引物组的检测灵敏度。针对这一现象,未来可以通过优化引物序列、优化用于微流控芯片的反应体系等方法加以解决。综上所述,全集成法的表现与培养法一致性强,基于微流控芯片和荧光检测系统的检测方法在念珠菌鉴定方面有很好的性能,能够为VVC的临床诊断提供准确、有效的检测数据。

另外,全集成法中用到的微流控芯片一共有24个反应腔室,理论上至多可同时检测22个指标(除去1个阳性对照和1个阴性对照)。因此,还可以通过设计更多的检测指标,如其他与VVC相关的念珠菌种、耐药性念珠菌携带的耐药基因等,来进一步完善全集成法的检测范围,从而为临床精准诊断和个性化治疗提供更大帮助。

## 5 结 论

本研究团队开发了集注射式结构的核酸提取与微流控芯片核酸扩增检测于一体的全集成核酸分析系

统。注射式结构核酸提取模块可根据不同类型的临床样本采用适宜的核酸提取方法,核酸提取主要有装填样品、孵育、清洗和加热振荡裂解四大步骤。核酸扩增检测平台基于微流控技术开发,包含作为核酸等温扩增载体的碟式微流控芯片、保证核酸精确等温扩增的温控平台、对核酸扩增进行实时检测的荧光检测平台以及对整个系统进行控制与结果分析的软件分析平台。注射式结构核酸提取模块与微流控芯片核酸扩增与检测模块既可以独立使用,又可以组装成全自动核酸提取与核酸检测于一体的全集成核酸分析平台。

本团队在该全集成核酸检测平台上分别测试了热带念珠菌标准真菌菌液和64例VVC临床拭子样本。真菌培养菌液检测结果显示:全自动、快速、多指标检测注射式微流控芯片全集成核酸分析系统的检测结果与常规的先用试剂盒提取核酸、再在商用PCR扩增仪上进行扩增的核酸检测方法相当,但前者只需1步操作,耗时10 min,省时省力,更加简便快捷。VVC临床样本的检测结果表明,全集成法与临床微生物培养的金标准方法相比,Kappa值为0.950,相关性良好。尽管有2例含白色念珠菌的样品在全集成核酸检测中为假阴性,但该假阴性结果可以通过优化等温扩增引物序列和反应体系等方法来解决。由此可知,全集成核酸检测平台可以为临床微生物病原体感染的诊断以及快速而精准的多指标检测提供仪器支撑。

全集成自动化的核酸检测分析平台可以最大限度地减少核酸检测方法对专业技术人员的依赖,也可以在资源有限地区实现即时检测(POCT),为核酸检测方法在基层医疗机构的普及应用提供技术支撑,如感染性疾病的基层筛查与卫生防疫应用。微纳体系样品试剂消耗的微流控芯片载体可以为需要对珍稀样本进行体外精准医学分子诊断的临床医疗应用场景提供多指标联合并行检测,如进行遗传性疾病鉴定、肿瘤分子标志物联合检测等。本团队开发的注射式微流控芯片全集成核酸分析系统可为生物医学前沿基础科研、食品安全、卫生防疫和临床医疗应用等,提供精准快检与便捷分析仪器支撑。

### 参 考 文 献

- [1] Kevadiya B D, Machhi J, Herskovitz J, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections[J]. *Nature Materials*, 2021, 20(5): 593-605.
- [2] Zhao Y X, Chen F, Li Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(22): 12491-12545.
- [3] Wang C, Liu M, Wang Z F, et al. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: from methods to devices[J]. *Nano Today*, 2021, 37: 101092.
- [4] 武杰, 黄嘉玲, 王越, 等. 基于单分子检测原理的 MicroRNA 超灵敏检测研究[J]. *光学学报*, 2023, 43(13): 1317001.  
Wu J, Huang J L, Wang Y, et al. Ultrasensitive detection of microRNA based on single molecule detection principle[J]. *Acta Optica Sinica*, 2023, 43(13): 1317001.
- [5] Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski H N, et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 3822-3835.
- [6] 胡飞, 刘艳飞, 李希晨, 等. 基于 CRISPR/Cas12a 的核酸便捷化检测方法和现场快速便携式检测装置[J]. *中国激光*, 2022, 49(15): 1507402.  
Hu F, Liu Y F, Li X C, et al. Convenient nucleic acid detection method and point-of-care detection device based on CRISPR/Cas12a molecular diagnosis[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(15): 1507402.
- [7] 李楠, 徐友春, 程京. 便携式全集成核酸分析系统技术综述[J]. *中国生物医学工程学报*, 2022, 41(5): 602-613.  
Li N, Xu Y C, Cheng J. Review of the portable fully integrated nucleic acid analysis system[J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2022, 41(5): 602-613.
- [8] Yan L, Zhou J, Zheng Y, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA[J]. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(5): 970-1003.
- [9] 席婧媛, 于广鑫, 钱相君, 等. 新型冠状病毒实验室诊断技术发展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(3): 265-269.  
Xi J Y, Yu G X, Qian X J, et al. Advances in the laboratory diagnosis for COVID-19 virus[J]. *Journal of Molecular Diagnostics and Therapy*, 2020, 12(3): 265-269.
- [10] 谢春梅, 武海萍, 马雪萍, 等. 用于临床新型冠状病毒核酸检测的分子诊断新技术[J]. *遗传*, 2020, 42(9): 870-881.  
Xie C M, Wu H P, Ma X P, et al. New molecular diagnostic technologies for clinical detection of SARS-CoV-2[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2020, 42(9): 870-881.
- [11] Reyes D R, van Heeren H, Guha S, et al. Accelerating innovation and commercialization through standardization of microfluidic-based medical devices[J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(1): 9-21.
- [12] Arora A, Simone G, Salieb-Beugelaar G B, et al. Latest developments in micro total analysis systems[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(12): 4830-4847.
- [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] 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.
- [15] Baek S H, Park C, Jeon J, et al. Three-dimensional paper-based microfluidic analysis device for simultaneous detection of multiple biomarkers with a smartphone[J]. *Biosensors*, 2020, 10(11): 187.
- [16] Nevenzal H, Noach-Hirsh M, Skornik-Bustan O, et al. A high-throughput integrated microfluidics method enables tyrosine autophosphorylation discovery[J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 42.
- [17] Huang G L, Huang Q, Xie L, et al. A rapid, low-cost, and microfluidic chip-based system for parallel identification of multiple pathogens related to clinical pneumonia[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6441.
- [18] Ruiz R A, Gonzalez J L, Vazquez-Alvarado M, et al. Beyond wax printing: fabrication of paper-based microfluidic devices using a thermal transfer printer[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(25): 8833-8837.
- [19] 董彪, 郭丽华, 刘大勇, 等. 基于荧光方法的肿瘤标志物检测研究进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(20): 2007103.  
Dong B, Guo L H, Liu D Y, et al. Progress in tumor biomarker detection based on fluorescence method[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(20): 2007103.
- [20] Pinsky B A, Sahoo M K, Sandlund J, et al. Analytical performance characteristics of the Cepheid GeneXpert Ebola assay for the detection of Ebola virus[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142216.
- [21] Boehme C C, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [22] N'guessan K K, Riccardo A, Dutoziet C C, et al. Genotyping of mutations detected with GeneXpert[J]. *International Journal of Mycobacteriology*, 2016, 5(2): 142-147.
- [23] BioMérieux launches the BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia Panels with FDA clearance and CE Marking [EB/OL]. (2018-11-13) [2023-11-12]. <https://www.biomerieux.com/corp/en/journalists/press-releases/biomerieux-launches-biofirer-filmarray-pneumonia-panels-fda-clearance-and-ce-marking.html>.
- [24] Pulido M R, Moreno-Martinez P, González-Galán V, et al. Application of BioFire FilmArray Blood Culture Identification panel for rapid identification of the causative agents of ventilator-associated pneumonia[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2018, 24(11): 1213.e1-1213.e4.
- [25] Lawson S K, Chung D, Das S, et al. Analytical and workflow evaluation of the ARIES sample-to-result molecular assay for *Clostridium difficile*[J]. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 2018, 48(2): 168-176.
- [26] Sieker J T, Horowitz C, Hu C T K, et al. Analytic sensitivity of 3 nucleic acid detection assays in diagnosis of SARS-CoV-2 infection [J]. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 2021, 6(2): 421-428.
- [27] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction[J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986, 51 Pt 1: 263-273.
- [28] Dong X B, Liu L Y, Tu Y P, et al. Rapid PCR powered by microfluidics: a quick review under the background of COVID-19 pandemic[J]. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 2021, 143: 116377.
- [29] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification[J]. *Nature*, 1991, 350(6313): 91-92.
- [30] Lizardi P M, Huang X, Zhu Z, et al. Mutation detection and



- single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification[J]. *Nature Genetics*, 1998, 19(3): 225-232.
- [31] Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M. Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation-rolling circle amplification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(3): e19.
- [32] Walker G T, Little M C, Nadeau J G, et al. Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(1): 392-396.
- [33] Vincent M, Xu Y, Kong H M. Helicase-dependent isothermal DNA amplification[J]. *EMBO Reports*, 2004, 5(8): 795-800.
- [34] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [35] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(7): e204.
- [36] Xing W L, Wang J D, Zhao C, et al. A highly automated mobile laboratory for on-site molecular diagnostics in the COVID-19 pandemic[J]. *Clinical Chemistry*, 2021, 67(4): 672-683.
- [37] 尤其敏, 胡林, 齐晨, 等. 一种核酸一体化检测方法 & 检测试剂盒: CN108796038B[P]. 2019-10-18.
- You Q M, Hu L, Qi C, et al. Nucleic acid integrated detection method and detection reagent tube: CN108796038B[P]. 2019-10-18.
- [38] Thatcher S A. DNA/RNA preparation for molecular detection[J]. *Clinical Chemistry*, 2015, 61(1): 89-99.
- [39] Lin X, Bo Z H, Lü W Q, et al. Miniaturized microfluidic-based nucleic acid analyzer to identify new biomarkers of biopsy lung cancer samples for subtyping[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 946157.

## Fully Integrated Nucleic Acid Analysis System Based on Syringe-Microfluidic Chip and Application of Precision Medicine

Huang Qin, Huang Leyang, Jin Xiangyu, Mao Zeyin, Deng Anni, Lü Wenqi, Zhong Hao, Wang Shihong, Shi Yixuan, Chen Jiahui, Huang Shiguang, Huang Guoliang\*

*Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China*

### Abstract

**Objective** Nucleic acid detection methods enable the rapid identification of specific genetic indicators. However, their extensive application is limited by the sequential use of multiple instruments and the high technical requirements for operators. A fully integrated nucleic acid analysis system can automate the sample-to-answer detection process. However, nucleic acid amplification via PCR technology is time-consuming, and stringent requirements are placed on temperature control accuracy and heating/cooling speed, which increases the manufacturing cost of the corresponding instruments. These systems also lack the flexibility to accommodate variations in sample preprocessing methods and nucleic acid extraction protocols for different types of clinical samples. To address these challenges, we present a novel, fully integrated nucleic acid analysis system that contains a syringe-based sample processing and nucleic acid extraction module, a fully enclosed PC-based multiplexed detection microfluidic chip, and a nucleic acid amplification product detection module. We applied this system for the precise medical testing of various pathogenic infections in gynecology. The results indicate that our system can achieve precise medical molecular diagnosis with the fully integrated automation of a micro-nano reaction system, as well as speedy processing, high sensitivity and specificity, and multiplexed parallel detection. The system also shows potential applications in the *in vitro* identification of genetic and other nucleic acid-related diseases, holding significant social and economic value for the prevention and control of major diseases in China.

**Methods** This paper presents a fully integrated nucleic acid analysis system based on a syringe microfluidic chip. The system consists of two modules. The first is an automated syringe nucleic acid extraction module that accommodates multiple nucleic acid extraction techniques based on different clinical sample types. This process involves four primary steps: sample loading, incubation, washing, and lysis by heating and shaking. The second module is an isothermally amplified nucleic acid detection module capable of simultaneous multivariate detection. The nucleic acid amplification and detection platform, based on microfluidic technology, includes a disk-based microfluidic chip that serves as a nucleic acid isothermal amplification carrier, a temperature control platform ensuring precise isothermal amplification of nucleic acids, a fluorescence detection platform for real-time monitoring of nucleic acid amplification, and a software analysis platform for controlling and analyzing the entire system. The two modules perform their respective functions independently and can also be combined into an integrated syringe-microfluidic chip nucleic acid analysis system, forming a fully integrated micro-nano detection platform that rapidly automates both nucleic acid extraction and detection and is capable of detecting multiple indicators in parallel.

**Results and Discussions** The fully integrated system was evaluated using a standard *Candida tropicalis* culture strain and 64 clinical swab samples obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. The results show that the detection concentration threshold of  $3.95 \times 10^2$  CFU/mL was comparable to that of the conventional nucleic acid detection method, which involves extracting

nucleic acid with a reagent kit and amplifying it on a commercial PCR machine. The sample preparation is more convenient and fast, with only one sample loading step, and nucleic acid extraction takes 10 min, resulting in significant time and labor savings (Table 1). A chi-square value of 1 and a Kappa value of 0.950 indicate a strong correlation with the gold standard method of clinical microbial culture (Table 2). Although a false-negative result with two samples containing *Candida albicans* was obtained, optimizing the primer sequences and reaction systems for isothermal amplification can address this problem. Therefore, this comprehensive integrated nucleic acid detection platform provides rapid and accurate multiplexed detection for the diagnosis of clinical microbial pathogen infections and has advanced technological capabilities.

**Conclusions** In this study, a fully integrated nucleic acid analysis system based on a syringe microfluidic chip is developed, which consists of two modules. One is an automatic syringe nucleic acid extraction module, and the other is an isothermally amplified nucleic acid detection module based on a microfluidic chip. The system was tested using a standard *Candida tropicalis* culture strain and 64 clinical swab samples of vulvovaginal candidiasis. The results show that the minimum detection concentration of the bacterial solution in the system is  $3.95 \times 10^2$  CFU/mL, and a more convenient and rapid sample preparation is achieved with only one sample loading step with a nucleic acid extraction duration of 10 min. Compared with the gold standard culture method, a chi-square test and Kappa value of 1 and 0.950, respectively, indicate that there is no significant difference between the two methods, with high consistency. The syringe-microfluidic chip-based, fully integrated nucleic acid analysis system detailed in this study provides a reliable platform for the rapid detection of nucleic acids using multiple indicators in a micro-nano system. The system offers precise detection and convenient analysis and supports applications in clinical medicine, grassroots screening for infectious diseases, health prevention programs, and basic biomedical research. This underscores the significance of this system in molecular diagnostics with *in vitro* precision in clinical settings, such as genetic disease identification and tumor molecular marker co-detection, as well as its potential uses in food safety and preventive healthcare applications.

**Key words** medical optics; syringe; microfluidic chip; fully integrated nucleic acid analysis system; application of precision medicine