

痕量样品高灵敏度快速测量方法与便携式系统研究

黄国亮^{1,2} 田浩² 李志永² 王同舟¹ 罗贤波² 马丽² 王璨² 邓涛¹

(¹ 清华大学医学院生物医学工程系, 北京 100084)
(² 生物芯片北京国家工程研究中心, 北京 102206)

摘要 为了实现高灵敏度、快速、准确鉴定痕量病原菌核酸样品,介绍了一种痕量核酸样品高灵敏度快速测量方法,并发展了一种微流控芯片核酸等温扩增实时分子诊断技术,研制了新型微纳体系生化反应载体芯片。通过表面惰性处理降低芯片表面对生物分子的吸附影响,构建一种大数值孔径、长工作距离的便携式共焦光学检测系统,有效消除背景荧光的影响,提高了检测灵敏度。在微纳升(7 μL ~40 nL)试剂消耗反应体系水平,实现检测灵敏度 5 个 DNA 分子拷贝数,并以呼吸道感染疾病的大肠埃希氏菌检测为例,开展临床应用研究,满足低成本临床医疗应用需要。

关键词 生物光学;微流控芯片;分子诊断;等温扩增;便携式共焦检测系统

中图分类号 Q632 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201232.0217003

Study of High Sensitive and Fast Detection to Trace Sample and Portable System

Huang Guoliang^{1,2} Tian Hao² Li Zhiyong² Wang Tongzhou¹

Luo Xianbo² Ma Li² Wang Can² Deng Tao¹

(¹ Department of Biomedical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)
(² National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206, China)

Abstract In order to carry out the goal of highly sensitive, fast and accurate detection and identification of pathogen, a novel method for highly sensitive and fast detecting trace amount of nucleic acid sample is introduced. A microfluidic chip isothermal DNA amplification for bacteria molecular diagnostics is developed. New micro-nanoliter reaction assay chip is manufactured, and the surface inertia processing technique of chip is advanced to drop the chip surface adsorption to DNA molecules. A portable confocal detector with high numerical aperture and long working distance is built to reduce background fluorescence and improve the sensitivity. The sensitivity of 5 DNA copies in micro-nanoliter reaction assay is obtained. The method and detector was verified by Escherichia coli identification to acute respiratory disease, and can meet the application of low-cost detection of clinic medicine.

Key words biological optics; microfluidic chip; molecular diagnostics; isothermal amplification; portable confocal detector

OCIS codes 170.1790; 170.3890; 120.4640; 120.4820

1 引 言

继 1985 年 Saiki 等^[1]在 *Science* 杂志、1991 年, Compton^[2]在 *Nature* 杂志报道了酶联变温核酸扩增技术(PCR)以来,核酸扩增技术已被广泛认可,并成为现代分子生物学研究与临床分子诊断应用的先

进工具^[1~11]。利用该技术人们可以在 90 min 左右的时间内,将特定序列核酸片段进行 $10^6 \sim 10^9$ 拷贝数的复制,从而实现高灵敏度的分子检测鉴定。理论上只要待测样品中包含有 1 个特定序列的核酸片段,就可以利用核酸扩增技术进行无限的复制放大,

收稿日期: 2011-07-15; **收到修改稿日期**: 2011-08-31

基金项目: 国家 973 计划(2011CB707700)、国家自然科学基金(60978064)、国家支撑计划(2011BAZ03288)和浙江省自然科学基金(2012C31G3210006)资助课题。

作者简介: 黄国亮(1966—),男,博士,副研究员,主要从事生物医学检测技术、生物芯片、分子诊断技术、光学测量和科学仪器开发等方面的研究。E-mail: tshgl@tsinghua.edu.cn

从而达到被检测的目的,但由于受反应载体材料与加工工艺、表面吸附作用、样品与试剂的一致性差异和检测方法等的限制,在实际应用中单分子扩增检测依然只是一种梦想。为了保证实验检测的一致性,在用聚碳酸酯(PC)材料制作的Ep管或96孔板中进行核酸扩增检测,实际应用中流行采用25 μL反应体系,检测限设定为大于等于1000个DNA分子拷贝数/μL。此外,人们也发展了一些直接分析分子特异性相互作用的检测方法(干涉成像、拉曼光谱和荧光共振能量转移测量等)^[12~14],它们解决了特异分子检测识别鉴定的可视化问题,但由于技术本身的局限性,检测灵敏度依然达不到单分子检测水平。微阵列芯片技术与共焦检测技术^[15~17]被广泛用于生物芯片分子诊断,但其操作步骤相对比较烦琐,需要使用包括核酸提取仪、点样仪、PCR扩增仪、杂交仪、洗干仪和扫描仪等多种分离仪器设备,不适合快速在线分析应用。因此,为了实现高灵敏度、快速在线检测分子诊断,发展一种微纳体系病原菌核酸等温扩增分子鉴定方法,采用核酸等温扩增技术和微流控芯片,通过表面化学修饰处理降低材料对核酸扩增产物吸附的影响,并构建便携式共焦荧光实时检测系统,在微纳升试剂消耗反应体系水平实现病原菌核酸扩增分子诊断检测灵敏度达到几个分子拷贝数。

2 病原菌核酸等温扩增分子诊断在线检测技术原理

核酸扩增技术目前主要有变温扩增与等温扩增

两大类型。变温扩增方法(即RT-PCR)是最早发展的核酸扩增技术,相对比较成熟,目前大多数核酸分析和分子诊断应用均采用该技术。变温核酸扩增技术采用正反两条特异引物完全匹配启动核酸扩增反应,以扩增周期为单位进行循环,每一个扩增周期大约90 s,分三个阶段(变性阶段,94 ℃高温变性,15 s→退火阶段,60 ℃低温退火,30 s→延伸阶段,在温度72 ℃通过酶的作用以引物为核酸合成起点沿模板方向延伸,45 s),整个扩增过程就是由几十个(或更多)这样的扩增周期不断循环完成。通常在变温扩增周期内只有在延伸阶段才进行核酸合成复制,变性阶段和退火阶段只是在为核酸扩增做准备,保证扩增的特异性。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%。与变温扩增方法不同,等温扩增方法^[5,10~11]全程保持在一个固定的温度65 ℃左右(这个温度根据所使用的酶不同会有所差异),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,可以在较短的时间内(如40 min左右)将靶核酸扩增到10⁹~10¹⁰个拷贝。同样从时间上计算,等温扩增方法全部时间均在进行核酸扩增,时间利用率达到100%,具有更高的核酸扩增效率。目前,文献报道的等温扩增方法,主要是在25 μL反应体系的Ep管和96孔板中进行,样品与试剂消耗依然比较多。

研究发展微流控芯片核酸等温扩增技术,在微纳升体系范围进行病原菌核酸等温扩增分子诊断,其工作原理如图1所示,包括启动和循环两个阶段。

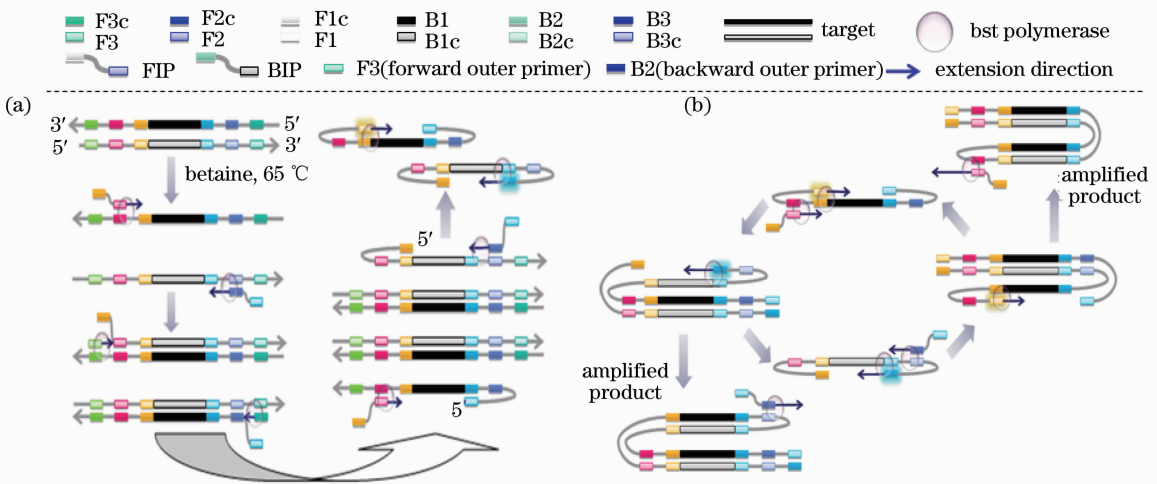


图1 病原菌核酸等温扩增分子诊断技术工作原理图示。(a)分子结合复制启动阶段;(b)分子结合循环扩增阶段
Fig.1 Illustration of isothermal amplification process for pathogen acid molecular diagnostics. (a) Copy starting stage of molecule combination; (b) cycling amplification stage of molecule combination

根据病原菌不同种属的特异基因设计四条特异引物 (由六段序列 F3, B3, FIP, BIP, LF 和 LB 构成, 全部

引物序列设计举例说明如图 2 所示), 通过链置换 DNA 聚合酶的作用在 65 °C 进行核酸等温扩增。

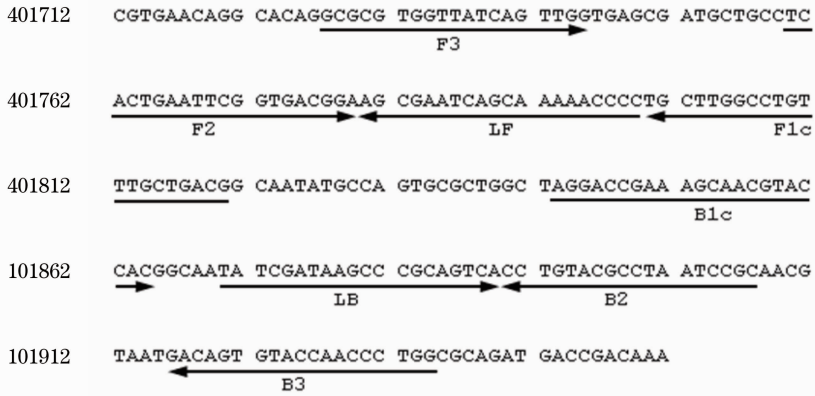


图 2 大肠埃希氏菌的 6 个特异基因引物序列设计

Fig. 2 Sequences of six specific oligonucleotide primers of *Escherichia coli*

在图 1 中, 靶基因 F1c 与 F1 互补, 靶基因 F2c 与 F2 互补, 靶基因 F3c 与 F3 互补, 靶基因 B3c 与 B3 互补, 靶基因 B2c 与 B2 互补, 靶基因 B1c 与 B1 互补。FIP 由 F2 和 F1c 组成, BIP 由 B1c 和 B2 组成; LF 为正向环引物 (Loop primer forward), 可与 F1 和 F2 之间的环结构结合, 加快反应速度; LB 为反向环引物 (Loop primer backward), 可与 B1 和 B2 之间的环结构结合, 加快反应速度。启动阶段时间很短, 分子结合复制过程如图 1(a) 所示, 核酸等温扩增通过四条特异引物的全部六段特异序列来识别靶 DNA, 只有这六段特异序列完全匹配才能启动正常的核酸扩增。循环阶段占全面扩增时间的 95% 以上, 分子结合复

制过程如图 1(b) 所示, 通过四段特异序列 (FIP, BIP, LF 和 LB) 来识别靶 DNA, 只有这四段特异序列完全匹配才能进行不断循环扩增, 这样就保证了核酸等温扩增的特异性与准确性, 每完成一个循环, 扩增产物就增加 1 倍, 随着扩增循环的不断进行, 扩增产物呈 2 的指数次幂增加。

为了对核酸等温扩增过程进行实时在线检测, 动态了解其反应过程信息, 研究采用荧光染料 EvaGreen 插入双链 DNA 发光方法来产生实时荧光信号。具体实现过程是在扩增体系混合物中, 掺入一定数量特殊处理的游离荧光染料 EvaGreen, 这种特殊处理的荧光染料 EvaGreen 在游离情况下处

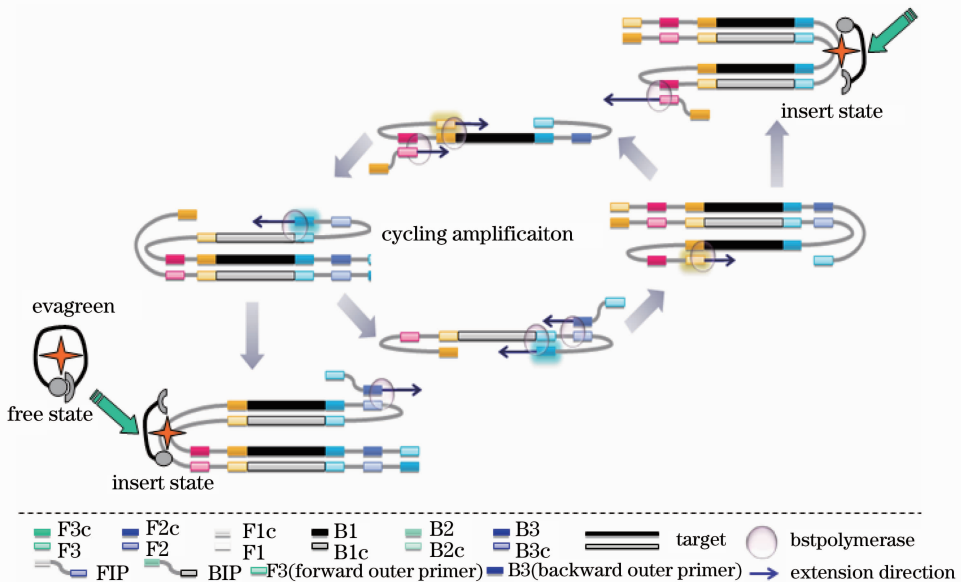


图 3 等温扩增实时荧光信号在线检测原理图

Fig. 3 Illustration of real-time fluorescent-signal detection of isothermal amplification on-site

于淬灭状态,是不发光的,但当它遇到双链 DNA 后会自动插入到双链 DNA 中,在插入过程中淬灭状态被自动解除而发出荧光,如图 3 所示。随着核酸等温扩增反应的持续进行,双链 DNA 被大量扩增, EvaGreen 插入到双链 DNA 中的数量越来越多,发出的荧光信号越来越强,对实验过程进行实时荧光信号检测,就可以获得随时间变化越来越强的核酸等温扩增实时荧光检测信号,即核酸扩增实时荧光信号曲线。如果被测样品中没有包含与扩增引物相同的碱基序列,因不能进行正确的碱基互补配对而无法启动核酸扩增,不会产生新的双链 DNA,因此也就没有 EvaGreen 插入到新增双链 DNA 中的过程,对实验过程进行实时荧光信号检测,所获得的荧光信号强度基本不变,看不到指数级增加的核酸扩增信号。这种对核酸等温扩增过程的实时在线检测方法只需将荧光染料 EvaGreen 按照一定的比例混合进入扩增反应体系即可,具有实际操作实施方便等特点。

3 实验材料与检测系统

3.1 核酸等温扩增分子诊断检测的实验材料

核酸等温扩增分子诊断检测的主要实验材料包括:扩增引物(F3, B3, FIP, BIP, LF 和 LB), dNTPs, EvaGreen(荧光染料), 0.1M DTT, Betaine(甜菜碱), Bst DNA polymerase(DNA 聚合酶), Thermo Buffer(反应缓冲液), Tris-HCl, MgCl₂, 牛血清白蛋白 BSA, 尿嘧啶糖基化酶 UNG, 脱氧尿苷三磷酸 dUTP, MgSO₄, 纯化水等,均按照生化试剂标准购买。一种等温扩增分子诊断 25 μL 反应体系的配制方法举例说明如表 1 所示。

3.2 微流控芯片设计与表面惰性处理

通常,采用注塑、浇铸和微加工等工艺技术使用 PC、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧烷橡胶(PDMS)、玻璃和硅片等材料制作各种不同形状大小的反应载体,实现核酸扩增反应,不过,即使是用目前常用的精密注塑工艺,用 PC 材料制作的 Ep 管(或 96 孔板),在其中进行 10 μL 以下体系的核酸扩增反应,依然存在稳定性差与扩增响应时间滞后等问题,常常需要较大的反应体积(大于 25 μL)和很高的分子数浓度(大于 10³ 分子/微升)才能得到较好的实验结果。考虑到金属材料的制作工艺更加成熟,材料品种的选择范围广,机械加工性能优于 PC、PMMA、PDMS、玻璃和硅片等材料,样品制作的成本低,且容易实现,尝试用金属材料铝(Al)制作具有 24

表 1 等温扩增分子诊断反应体系(25 μL)配制
Table 1 Preparation of reactive system for diag of isothermal amplified molecules in 25 μL

Reactant composition	Concentration
Bst DNA polymerase U/ μL	0.32
Thermo buffer	1
MgSO ₄ /mmol/L	4
Betaine /(mol/L)	0.8
dNTPs /(mmol/L)	0.4
EvaGreen	0.6
BSA /(mg/mL)	0.5
dUTP /(mmol/L)	0.1
UNG U/ μL	0.0001
F3 /($\mu\text{mol/L}$)	0.2
B3 /($\mu\text{mol/L}$)	0.2
FIP /($\mu\text{mol/L}$)	1.6
BIP /($\mu\text{mol/L}$)	1.6
FL /($\mu\text{mol/L}$)	0.4
BL /($\mu\text{mol/L}$)	0.4
Purified Water	Deionized

个并行检测通道的微纳体系(7 μL ~40 nL)反应载体芯片。虽然金属材料在湿实验反应中不如 PC、PMMA、PDMS、玻璃和硅片等材料稳定和抗腐蚀,但核酸扩增反应是一种 pH 值趋于中性的生化实验,在湿实验条件下具备抗氧化能力的金属材料(如 Al、Cu、Pt 和金属合金材料等,其中 Al 的性价比最高)都可以满足核酸扩增反应的实验载体材料要求。与 PC、PMMA、PDMS 和硅片等材料相对比较少的表面处理工艺形成鲜明的对比,金属材料的表面处理工艺比较多(如阳极氧化、电镀和喷涂等),通过对金属材料的表面进行抗氧化、防腐蚀处理,可以大大增强其作为湿实验载体使用的性能,在后续表面化学修饰处理方面有很大的发展空间。同时,金属材料导热性良好,有利于提高传热速度,保持温度均匀性,以提高核酸扩增的温控性能。此外,金属材料通过高温熔炼可以回收利用,弥补了目前 PC、PMMA、PDMS 和硅片等不可回收材料制作生化反应载体带来白色污染的缺点。

采用 Solidwork2006 机械设计软件设计微流控芯片的结构,获得的 24 通道微流控芯片结构如图 4(a)所示,其中将 24 通道分为 2 组(可以同时检测 2 份样品),每组通道可以对同一份样品进行多指标并行检测。微流控芯片上的生物反应单元被制成不同容量大小(直径 0.5~3.0 mm,深度 0.2~1.0 mm)以满足微升至纳升范围的微量样品检测使用要求。芯片流路管道被设计成不同尺寸(宽度和深度大小变化范

围为 0.5~1.0 mm),以减少流路中试剂和样品的消耗。缓冲单元直径为 3.0 mm,深度为 0.5 mm,用于收集在样品注入过程中产生的气泡。流路管道靠近中心孔的弯曲区域为热压隔离带,用于阻断各反应单元在反应过程中的连接,防止反应产物从一个单元扩散到其他单元。完成设计后,用数控机床对微流控芯片进行精密加工,然后对芯片进行阳极氧化表面惰性处理,使其表面光滑并且具有抗生物分子亲和结合的惰性,从而可以有效减少芯片表面对生物分子的吸附,满足微纳体系痕量样品高灵敏度检测的使用要求。芯片表面惰性处理前后的结构变化如图 4(b) 所示,在扫描电镜 2000 倍放大下,可以看出芯片原始表面相对比较粗糙,通过表面惰性处理后,芯片表面覆盖有一层均匀致密的保护膜,表面结构平整光滑。最后,清洗干净芯片表面,用 ABI 公司的 PC 薄膜,紧密包覆在芯片表面,形成密封腔体与管道,以备实验使用。

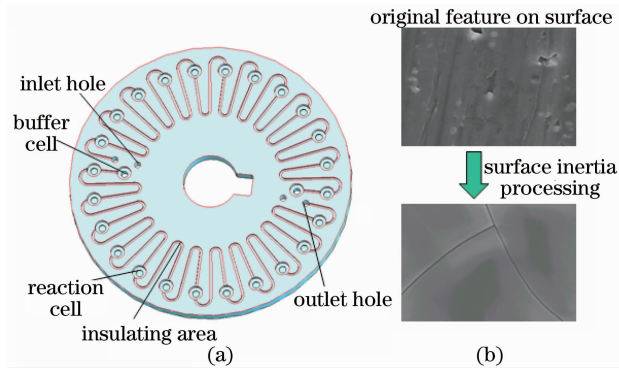


图 4 微流控芯片制作。(a) 芯片的三维结构;
(b) 处理前后的表面特征

Fig. 4 Fabrication of the microfluidic chip. (a) 3-D structure of the microfluidic chip; (b) surface feature before/after processing

3.3 便携式病原菌分子诊断检测系统

常规显微物镜的设计随着数值孔径变大工作距离将会变小,如当显微物镜的数值孔径 $NA > 0.6$ 时其工作距离一般小于 1 mm,当数值孔径达到 0.7 时其工作距离一般小于 0.5 mm。在微纳体系核酸扩增实时荧光检测中,为了避开运动控制机构、加热保温结构等的影响,要求荧光检测系统的显微物镜的工作距离大于 3 mm。如果采用普通显微物镜,当工作距离要求大于 3 mm 时,其数值孔径 $NA \leq 0.5$ 。为此设计了一种大数值孔径 $NA > 0.7$ 、长工作距离(大于 3 mm)的光学检测系统结构^[18],以提高核酸扩增的荧光收集效率有效增进核酸扩增实时荧光信号检测响应速度与灵敏度。

共焦滤波方法是一种降低背景噪声的先进光学测量技术,通过选择合适的针孔滤波器,可以将测量范围定位在半径为一微米至几十微米的球型测量区域内,而将球型区域外的背景杂散光强度影响降到 1% 以下,非常适合用于降低核酸扩增背景噪声的影响。将共焦滤波方法与大数值孔径、长工作距离的光学检测系统结构结合在一起,不仅提高了核酸扩增实时荧光检测信号强度,而且降低了背景噪声的影响,模拟计算如图 5 所示。从图 5 中可以看出,在焦平面内荧光收集效率达到 92%,而对于半径 30 μm 球型区域以外的发光信号,其收集效率小于 1%。在微纳升反应体系测量中,反应体系测量范围为 7 μL ~40 nL,其反应腔体半径均大于等于 50 μm (半径 50 μm 对应等效球体容积为 0.52 nL),只要将荧光检测聚焦在微纳升反应体系腔体的中心位置,使反应载体表面处于远离检测中心 50 μm 以外的位置,致使反应载体表面杂散背景光的影响将被衰减到 0.1% 以下,而处在焦平面中心的发光分子则可以获得大于 92% 的荧光收集效率,信噪比显著提高,满足微纳升反应体系核酸等温扩增的高灵敏度实时荧光信号检测的使用要求。

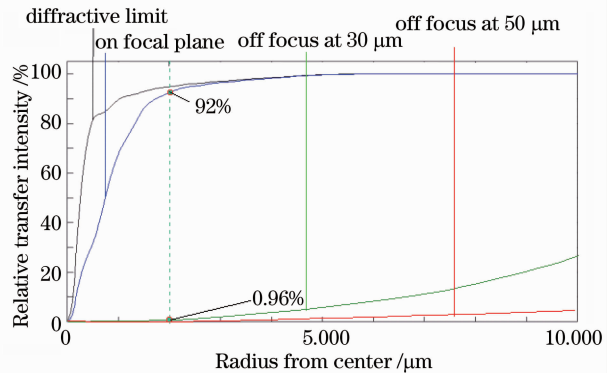


图 5 共焦荧光检测系统的荧光收集效率与背景噪声抑制模拟计算

Fig. 5 Simulation of fluorescence collection efficiency and background noise suppression of confocal fluorescence detection system on the focal plane to off-focus positions

基于已介绍的微纳体系载体芯片、核酸等温扩增方法、共焦荧光检测系统结构,便携式病原菌分子诊断分析仪器的系统结构设计如图 6 所示,其由共焦光学检测部分、微流控芯片、PID 温控部分、旋转扫描运动控制部分、数据采集与处理部分组成。通过光、机、电、软件综合设计与系统集成工作,完成便携式微流控芯片病原菌分子诊断分析仪器原形系统构建。

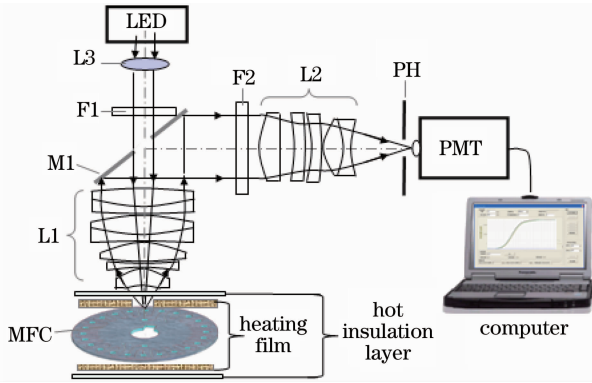


图 6 便携式病原菌分子诊断系统结构图

Fig. 6 Portable pathogen molecular diagnostic system

在图 6 中,光源 LED 发出的光经过非球面镜 L3 聚光,再经过激发滤光片 F1($470 \pm 15 \text{ nm}$) 过滤形成直径 3 mm 的平行激发光,然后穿过中孔反射镜 M1 被物镜 L1 聚焦在微流控芯片 MFC 的反应单元区中心,激发被测样品产生荧光。在荧光接收光路中,微流控芯片 MFC 上生物反应单元发出的荧光,先被物镜 L1 准直成直径 20 mm 的荧光光束,然后被中孔反射镜 M1 反射,再经发射滤光片 F2 ($520 \pm 20 \text{ nm}$) 过滤,会聚镜 L2 将荧光光束聚焦在针孔光阑 PH 上,并被光电倍增管(PMT)接收产生实时荧光检测信号。其中针孔光阑 PH 的作用是遮挡芯片上反应腔体有效检测区域以外所产生的荧光,因此可以通过选择针孔光阑的大小来控制芯片上反应腔体的有效检测区域大小,减少芯片上下表面、腔体周围管壁和环境杂散光的影响,提高信噪比。在便携式微流控芯片病原菌分子诊断系统中,采用大数值孔径光学检测系统与中孔反射镜分光,可以使激发光能量的利用率和发射荧光的传递效率均大于 90%,并具有良好的通用性。对比常规分束镜或棱镜分光方法,最佳分光比例为 50%:50%,激发光与反射回来的荧光均只有 50% 的利用率,因此,采用分光镜方法的荧光检测效率为两个分光比例的乘积,通常小于 25%;对比二向色镜分光,虽然可以提高荧光检测效率,达到 80% 以上,但每种二向色镜的反射光与透射光的使用波长范围是固定的,要求激发光与发射荧光的波长与其相匹配,改变一种荧光标记材料必须同时更换二向色镜,因此,用二向色镜构建的荧光检测系统缺乏通用性。

4 实验研究与结果分析

4.1 微流控芯片实时荧光信号检测实验

在核酸扩增实时荧光信号检测过程中,所获得

的实时荧光信号检测曲线是一个被多种因素共同作用引起双链 DNA 分子数量发生变化后的结果,包括:核酸扩增产生新的双链 DNA、反应载体表面吸附导致反应体系溶液中双链 DNA 数量减少、在扩增温度条件下双链 DNA 会发生解链变成单链 DNA 引起双链 DNA 数量减少、激发光照射下部分荧光分子被光漂白引起荧光分子平均发光量子转换效率降低以及背景杂散光的影响等。在这些因素中,只有核酸扩增产生新的双链 DNA 分子才会使实时荧光检测信号强度增加,可以当作一种正面的因素;而其它因素(包括反应载体表面吸附导致反应体系溶液中双链 DNA 数量减少、在扩增温度条件下部分双链 DNA 发生解链变成单链 DNA、激发光照射下部分荧光分子被光漂白等)均将使实时荧光检测信号强度下降,全是负面因素。在目前常用的 RT-PCR 仪的核酸扩增实时荧光信号检测中,大多忽略了这些负面因素的影响,因此在检测灵敏度、反应体系消耗和检测响应速度等方面均受到较大的限制,需要将核酸扩增的反应体系定容到 $20 \mu\text{L}$ 以上,待测样品中核酸分子数量需要控制在 DNA 分子拷贝数 $10^5/\mu\text{L}$ 以上,其目的是让反应体系在核酸扩增时,能够产生足够多的新增双链 DNA 分子,从而可以忽略上面这些负面因素的影响,保证核酸扩增实时荧光信号检测的准确性和可靠性。

为了降低上面介绍的多种负面因素的影响,提高核酸扩增实时荧光信号检测的灵敏度、一致性,并降低样品与试剂的消耗,本研究采用金属 Al 材料制作的微流控芯片,通过表面处理修饰方法来改善反应载体表面粗糙度与惰性特征,有效降低反应载体表面吸附双链 DNA 分子的影响,同时,采用图 5 中介绍的共焦光学检测系统来降低背景荧光,采用旋转扫描方法控制曝光时间,降低光漂白的影响,有效提高检测灵敏度,实验结果如图 7 所示。图 7(a) 是液滴在芯片表面的接触角变化,表面接触角从 54° (对应芯片加工后的原始表面) 变为 94° (对应阳极氧化惰性处理后的芯片表面),表面惰性显著提高。图 7(b) 是在微流控芯片上,用 $7 \mu\text{L}$ 反应体系,核酸样品模板浓度为每微升 10^5 个 DNA 分子拷贝数,进行核酸等温扩增反应的实时荧光信号检测实验结果,核酸分子开始指数级扩增的平均时间为 14.63 min,5 份相同样品重复实验有很好的一致性,数据偏差变异系数 CV 小于 0.13%。

4.2 微流控芯片临床分子诊断检测应用

采用经过表面修饰处理后的微流控芯片和便携

式病原菌分子诊断检测系统,以临床常见呼吸道感染疾病的大肠埃希氏菌为对象,进行微流控芯片病原菌核酸分子诊断检测应用实验研究,实验结果如图 8 所示。图 8(a)是在微流控芯片上用相同浓度(拷贝数 $10^5/\mu\text{L}$)、不同反应体系($7\ \mu\text{L}$, $1\ \mu\text{L}$,

392nL , $40\ \text{nL}$)的病原菌核酸样品进行等温扩增实时荧光信号检测的实验结果,图 8(b)是在微流控芯片上用不同分子数量(10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 5 个拷贝数和阴性对照)的病原菌核酸样品进行等温扩增分子鉴定检测的实验结果。

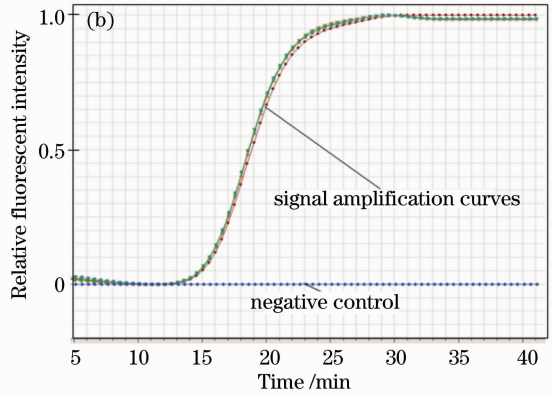
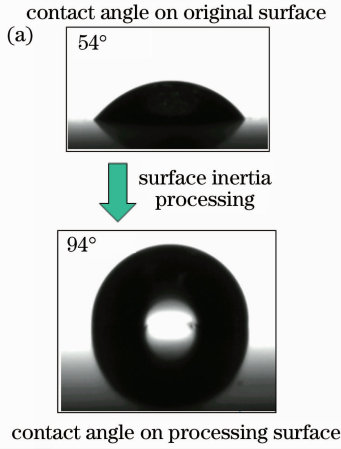


图 7 实验结果。(a)液滴在芯片表面的接触角变化;(b)核酸扩增实时荧光信号检测曲线

Fig. 7 Experimental results. (a) Change of surface contact angle of chip; (b) real time contour plots of nucleic acid amplification

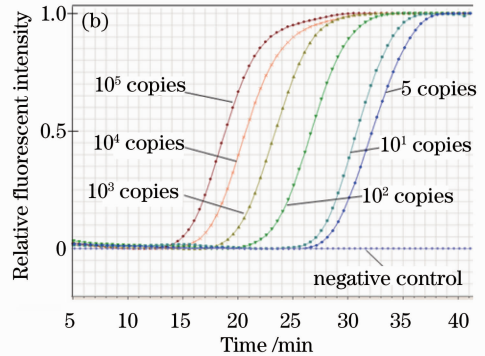
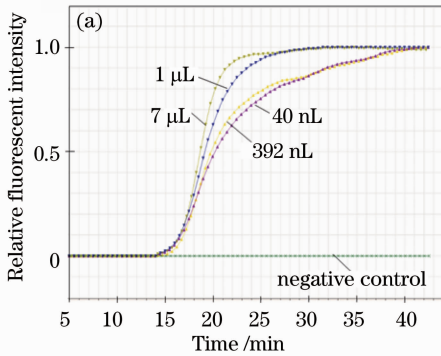


图 8 微纳体系病原菌核酸等温扩增分子诊断检测实验结果。(a)不同反应体系时的等温扩增检测结果;(b)不同 DNA 拷贝数量时的检测结果

Fig. 8 Results of pathogen molecular diagnostics by using isothermal amplification in micro-nanoliter reaction assay.

(a) Detection results by using different reaction volumes; (b) detection results by using different DNA copies

从图 8(a)中可以看出,在微流控芯片上,用相同浓度、 $7\ \mu\text{L}\sim 40\ \text{nL}$ 反应体系的病原菌核酸样品,进行等温扩增实时荧光信号检测,其指数级扩增信号产生的起始时间基本相同,偏差 CV 为 1.61%。由此可以说明,利用本文所研制的微流控芯片和便携式共焦检测系统,可以实现从几微升至几十纳升反应体系的病原菌核酸等温扩增实时荧光信号检测。从图 8(b)中可以看出,在微流控芯片上,用 $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1$ 和 5 个拷贝数的病原菌核酸样品,进行等温扩增实时荧光信号检测,均可以获得有别于阴性对照的标准核酸扩增实时荧光信号检测

曲线,随着病原菌核酸分子数的增加(从 5 个拷贝数到 10^5 个拷贝数),其检出速度越来越快(时间从 27.6 min 变为 14.6 min)。由此可以说明,利用本文所研制的微流控芯片和便携式病原菌分子诊断检测系统,可以在 40 min 内(包括 10 min 预热时间),实现 5 个拷贝数(或以上)的高灵敏度病原菌核酸等温扩增快速分子鉴定,检测速度比常规 RT-PCR 方法(平均在 90 min 左右)提高了 1 倍。

5 结 论

围绕临床高灵敏度、快速、准确进行病原菌核酸

分子诊断检测,满足分析仪器小型化、低样品试剂消耗的实际应用需求,本研究工作发展了一种微流控芯片痕量病原菌核酸样品的高灵敏度快速准确测量方法,研究了微流控芯片核酸等温扩增实时分子诊断鉴定技术,研制了新型 24 通道微纳体系生化反应载体芯片,改进了芯片表面抗生物分子吸附的惰性特征,构建了一种大数值孔径($NA=0.7$)、长工作距离(大于 3 mm)的便携式共焦光学病原菌核酸等温扩增实时分子诊断检测系统,有效消除了背景杂散光噪声的影响,提高了检测灵敏度,大幅度降低了样品与试剂的消耗。并以常见呼吸道感染疾病的大肠埃希氏菌检测为例,进行临床应用实验研究,成功将病原菌特异分子等温扩增鉴定与实时荧光信号检测有机地集成在一起,在微纳升($7\ \mu\text{L}\sim 40\ \text{nL}$)试剂消耗反应体系水平,获得 5 个 DNA 分子拷贝数的高灵敏度分子诊断检测实验结果,满足实际需求。

参 考 文 献

- 1 R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona *et al.*. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. *Science*, 1985, **230**(4732): 1350~1354
- 2 J. Compton. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Nature*, 1991, **350**(6313): 91~92
- 3 G. T. Walker, M. S. Fraiser, J. L. Schram *et al.*. Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1992, **20**: 1691~1696
- 4 D. Liu, S. Daubendiek, M. Zillman *et al.*. Rolling circle DNA synthesis: small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**: 1587~1594
- 5 Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi *et al.*. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**(12): e63
- 6 Xiaochuan Zhou, Shiyang Cai, Ailing Hong *et al.*. Micro-nano fluidic picoarray synthesis of oligodeoxynucleotides and simultaneous assembling of multiple DNA sequences[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**: 5409~5417
- 7 A. T. Woolley, D. Hadley, P. Landre *et al.*. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device[J]. *Anal. Chem.*, 1996, **68**: 4081~4086
- 8 Yao Liying, Liu Baoan, Chen Tao *et al.*. Micro flow-through PCR in a PMMA chip fabricated by KrF excimer laser [J]. *Biomedical Microdevices*, 2005, **7**(3): 253~257
- 9 Rajendrani Mukhopadhyay. Hard-soft micro-nano fluidic device bypasses drawbacks of PDMS[J]. *Anal. Chem.*, 2009, **81**(13): 5108
- 10 Taku Murakami, Jun Sumaokal, Makoto Komiyama. Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation-rolling circle amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, **37**(3): e19
- 11 A. Alhassan, Y. Govind, N. T. Tam *et al.*. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis[J]. *Parasitol Res.*, 2007, **100**: 1165~1168
- 12 Li Qiang, Gan Wupeng, Huang Guoliang *et al.*. High-throughput and label-free detection of Immunoglobulin G interactions based on reflectometric interference imaging system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(s1): s100413
李 强, 甘五鹏, 黄国亮 等. 基于光反射干涉成像的免疫球蛋白结合的高通量非标记检测 [J]. *光学学报*, 2010, **30**(s1): s100413
- 13 Chen Xiuli, Wang Guiwen, Yi Xiaolin *et al.*. Single-cell Raman spectral analysis of oxygenated and deoxygenated thalassemia erythrocytes [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(10): 2854~2859
陈秀丽, 王桂文, 伊晓林 等. 单细胞拉曼光谱分析地中海贫血红细胞的氧合态和去氧态 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(10): 2854~2859
- 14 Shan Guangcun, Huang Wei. Theoretical study of single-pair fluorescence resonant energy transfer spectroscopy in microcavity [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(4): 1049~1053
单光存, 黄 维. 微腔中单分子对荧光共振能量转移光谱学的理论研究 [J]. *光学学报*, 2009, **29**(4): 1049~1053
- 15 P. O. Brown, D. Botstein. Exploring the new world of genome with DNA microarrays[J]. *Nature Genet.*, 1999, **21**(suppl. 1): 33~37
- 16 Huang Guoliang, Deng Cheng, Xu Shukuan *et al.*. Novel detection system of microbe chip and its application [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(3): 499~504
黄国亮, 邓 橙, 徐书宽 等. 先进的微生物芯片检测系统及其应用研究 [J]. *光学学报*, 2007, **27**(3): 499~504
- 17 Huang Guoliang, Deng Cheng, Zhu Jiang *et al.*. Digital imaging scanning system and biomedical applications to biochips [J]. *J. Biomedical Optics*, 2008, **3**(3): 034006

栏目编辑: 韩 峰