

智能手机成像的晶片上基于逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP) 技术的全血中 HIV-1 检测

Gregory L. Damhorst^{1,2}, Carlos Duarte-Guevara^{2,3}, Weili Chen^{2,3}, Tanmay Ghonge^{1,2}, Brian T. Cunningham^{1,2,3}, Rashid Bashir^{1,2,3*}

摘要: 病毒载量测量对于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 阳性患者长期临床护理来说是一个必不可少的工具。然而, 考虑到病毒载量测量所需的仪器体积、成本和操作的复杂性, 在医疗基础设施较差的偏远地区 (尤其是在被 HIV 感染人群比例较高的地区) 普及标准的病毒载量测量仪器是较为困难的。为提高该检测方法的普及性, 人们已经开始开发可以进行即时检测的病毒载量检测平台, 然而尚没有解决办法能够同时满足低成本、便携、易于操作等多种实际要求。本文通过运用微流体和微型硅晶片平台, 对经过最低程度处理的含有 HIV 的全血样本进行了逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP), 并利用智能手机进行了荧光检测。集成实验检测结果表明, 一滴约 60 nL 的反应液滴中仅有的 3 个病毒依然可以通过 RT-LAMP 技术被检测到, 这相当于每微升全血样品中只有 670 个病毒。该技术在数字化 RT-LAMP 方法上具有重要意义, 扩展该技术能够实现对 HIV 阳性患者在临床护理中采集指血进行病毒载量检测。研究结果显示, 病毒载量检测过程所需的各个步骤, 从血滴的准备到 RT-LAMP 反应的成像, 都可以集成为晶片实验并且可以和移动设备兼容。

关键词: 人类免疫缺陷病毒 (HIV), 病毒载量, 环介导等温扩增, 智能手机, 即时检测

1 引言

在全球范围内, 人类免疫缺陷病毒(HIV)的受感染

人数已达到3690万[1]。从HIV大流行的出现到现在的近四十年间, 抗逆转录病毒疗法已经将HIV感染从一个“死刑判决”转变成一种可控的慢性疾病: 若HIV感染能够被有效控制, 则其对患者预期寿命的影响很小[2]。从人口层面来看, 无论是新感染病例数还是母婴传播病例数, 或是与HIV有关的死亡率都在下降[2]。然而, 在HIV常规处理中缺少可普及的、适当的诊断技术来指导治疗仍然是数以百万计的HIV阳性患者, 尤其是在发展较为落后、医疗资源稀缺地区的患者, 在接受标准化治疗中面临的障碍。

CD4+ T淋巴细胞计数和血浆中病毒载量检测是HIV治疗中两个核心诊断方法。这两个指标对每一个感染患者治疗的启动和治疗方案的确立起到非常重要的指导作用[3]。CD4细胞数量通常使用流式细胞仪进行测定。由于便携式流式细胞仪的开发, 该技术在偏远地区得到了越来越多的应用[4-7]。另一方面, 病毒载量检测平台在发展中国家的普及程度远远落后于CD4细胞计数技术。传统的病毒载量仪器基于逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、依赖核酸序列的扩增(NASBA)或分支DNA(bDNA)杂交技术。虽然这些技术能够检测出浓度小于每毫升十个病毒RNA副本的血浆样品, 但是这些仪器的使用要求在实验室的条件下, 并且要经过大量的样品处理和复杂、精密的加工过程[6, 8-10]。

环介导等温扩增(LAMP)技术是一种有望解决上述

¹ Department of Bioengineering, The University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA; ² Micro and Nanotechnology Laboratory, The University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA; ³ Department of Electrical and Computer Engineering, The University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA

* Correspondence author. E-mail: rbashir@illinois.edu

Received 27 July 2015; received in revised form 26 August 2015; accepted 8 September 2015

© The Author(s) 2015. Published by Engineering Sciences Press. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

英文原文: Engineering 2015, 1(3): 324-335

引用本文: Gregory L. Damhorst, Carlos Duarte-Guevara, Weili Chen, Tanmay Ghonge, Brian T. Cunningham, Rashid Bashir. Smartphone-Imaged HIV-1 Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) on a Chip from Whole Blood. *Engineering*, DOI 10.15302/J-ENG-2015072

问题的方法[11]。LAMP作为一种用于核酸检测的聚合酶链式反应(PCR)的替代技术出现在21世纪早期[12]。与PCR技术相比,LAMP技术在即时检测上具有很大的吸引力和较大的发展空间。这是由于LAMP并不需要温度循环(而是等温在60~65 °C),并且与PCR相比,LAMP不易受到扩增抑制物影响。在LAMP的初级概念被提出之后,很快就有研究者提出了利用逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)进行HIV检测的想法[13,14]。自那以后也有一些报告提出了不同的检测方式,其中包括即时检测的临床应用[15-21]。这些报告涉及的基于LAMP技术的新HIV检测方法包括一个用来检验提纯后DNA的电池供电的手持微流体系统[20],一个用于数字化LAMP检测的SlipClip装置[21],以及一个无需电力的加热装置,该装置可用来促进经最低程度处理的全血的RT-LAMP定性检测[17,18]。然而迄今为止,还没有人提出基于一滴全血的、能够与全自动可便携设备兼容的RT-LAMP定量检测方法。

传统上,人们认为核酸扩增需要完全纯化的目标RNA或DNA以适应扩增反应。然而LAMP的稳健性转变了人们的这一思路。Curtis等通过使用无需电力的加热装置,利用LAMP技术对仅经过细胞裂解缓冲液处理的全血样品进行了HIV定性检测[17]。笔者利用RT-LAMP技术对经最低程度处理的裂解的全血样品进行了HIV病毒载量的定量测量。结果显示,在约60 nL的反应滴液中,仅含的3个病毒颗粒被检测出。

笔者利用RT-LAMP检测了一滴全血的HIV病毒载量。本文数据表明,这个方法有潜力发展成为一个不需人工处理的全自动化的移动设备。首先,笔者比较和对比了在标准实验室热循环仪中的两种RT-LAMP反应的表现,一种利用的是在水中纯化的病毒RNA,另一种利用的是只经过细胞裂解缓冲液处理的全血中的完整病毒颗粒。接下来,笔者采用一个简单的微流体混合装置来证明全血裂解过程可以在一个晶片上完成且不会造成分析物损失或干扰检测。然后,笔者将样品移动到一个微晶片的平台,同样对纯化的病毒RNA和经细胞裂解液处理的全血中的病毒RNA进行RT-LAMP反应检测,并且比较和对比了标准荧光显微镜和一个未经过硬件改造的智能手机对图像采集和处理的效果。为了证明该检测方法的稳定性,笔者还对存在丙型肝炎病毒(HCV)的病毒RNA和乙型肝炎病毒(HBV)的病毒DNA时的HIV进行了检测。之后,笔者结合微流体裂解方法、微晶片反应平台和智能手机成像来证明该检测平台具有利用一滴血定量检测HIV载量的能力。最后,讨论了该技术的优点和缺点,以及该技术满足即时病毒载量检测这个需求的潜力。

2 材料和方法

2.1 样本

全血。从HIV阴性供体体内用注射器抽取全静脉血样,并转移至4 mL的BD Vacutainer K2 EDTA收集管中。收集管在用于实验前被置于样品架上,保存于室温。

病毒。实验所用病毒菌株为从Advanced Biotechnologies公司购买的在H9人体T淋巴细胞系中传播的HIV-1 IIIB菌株。病毒母液浓度为 6.7×10^{10} vp·mL⁻¹(vp是病毒粒子的简称),以纯化的形式储存在含有10 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷、150 mmol·L⁻¹氯化钠和1 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸(EDTA)的缓冲液中,缓冲液的pH为7.5。实验所使用的病毒为病毒颗粒形式,被等分悬液所稀释。稀释液为自主配置的缓冲液或是由Fisher科技提供的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)。

病毒核酸。合成的HBV DNA(ATCC® VR-3232SD™)和合成的HCV RNA(ATCC® VR-3233SD™)均购自American Type Cultural Collection(ATCC)。HIV-1 RNA通过使用Life Technologies提供的PureLink®病毒RNA/DNA Mini试剂盒提纯自HIV-1 IIIB全病毒颗粒。为了使用热循环仪刻画有纯化的RNA参与的RT-LAMP反应的特性,笔者采用两种方法稀释HIV-1 RNA。方法一,全病毒颗粒被PBS稀释,每份稀释液分别通过PureLink®试剂盒进行纯化。方法二,将10 μL浓度为 6.7×10^{10} vp·mL⁻¹的试剂加入到190 μL的PBS中以满足试剂盒的使用要求,然后在150 μL无核糖核酸酶活性的水中进行纯化和洗脱,获得最终浓度为 4.47×10^9 vp·mL⁻¹(或者为每毫升含 8.93×10^9 个RNA副本)的试剂。在使用之前,此纯化的RNA被分成等份并储存在-80 °C的环境中。

微晶片RT-LAMP实验采用纯化的病毒RNA进行,而集成实验例外。实验采用水中纯化的RNA是因为纯化的RNA是逆转录核酸扩增分析的标准分析物,并且在实验中可以作为参照与裂解的全血样品进行比较。全病毒颗粒是全血中的理想分析物,然而在技术开发阶段考虑到生物安全性等原因,最初的微晶片实验是以全血中浸入病毒RNA为样本实现的。考虑到需要与生物安全措施兼容,在热循环仪中(并不在微晶片上)进行的以全血为样本的最初“宏观”扩增实验确实包括了全病毒颗粒。为了实现最终的、完整的集成晶片实验,笔者将一个装置嵌入生物安全柜中来实现利用全病毒颗粒进行微晶片实验。

血细胞裂解。笔者采用的全血裂解缓冲液是根据Curtis等的工作配置而成的[17],包含2.5 mmol·L⁻¹的KHCO₃、37.5 mmol·L⁻¹的NH₄Cl和0.025 mmol·L⁻¹的EDTA。所有的细胞溶血实验都是以1:4的比例将血液与裂解缓冲液

混合。在初步实验中,用手动移液器分别计量血液和裂解缓冲液并混合,然而最终的集成实验和初步微流体混合实验采用微流体通道内的晶片上裂解。微流体的混合是利用两个注射泵将不同的成分以1:4的体积比进行混合。

2.2 RT-LAMP

反应组分。RT-LAMP分析方法采纳Curtis等的研究成果[17]。反应缓冲液浓度为 $1\times$ 等温扩充缓冲液, $1.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的脱氧核苷三磷酸腺苷(dNTP),来自新英格兰生物实验室(New England Biolabs)的 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MgSO_4 ,以及来自Sigma-Aldrich的 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三甲基甘氨酸。在某些情况下,若有所提及,三甲基甘氨酸的浓度应为 $0.8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在实验期间,事先以适当的比例配制大量上述反应缓冲液并将其储存在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 的环境下。酶和染色DNA分别加入到缓冲液中混合以保证每一次实验都备有完全混合好的新鲜试剂。RT-LAMP反应所用的酶是新英格兰生物实验室提供的 $0.64\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的*Bst* 2.0 DNA聚合酶和 $0.08\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的AMV逆转录酶。Biotium公司提供的 $1\times$ EvaGreen和一条经染色处理的双链DNA(dsDNA)被应用于检测反应产物的反应中。

引物。基于Curtis等研究的六个LAMP引物[17]包括: $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的F3引物(5'-AGTTCCCTTAGATAAAGACTT-3')和B3引物(5'-CCTACATACAAATCATCCATGT-3'), $1.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的正向内引物(FIP)(5'-GTGGAA GCACATTGTA CTGATATCTTTTTGGAAGTATACTGCAT-TTACCAT-3')和背向内引物(BIP)(5'-GGAAAGGATCACCAGCAATATTCCTCTGGATTTTGTTTTCTAAAAGGC-3'),和 $0.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的正向环引物(5'-GGTGTCTCATTGTTATACTA-3')和反向环引物(5'-GCATGACA-AAAATCTTAGA-3')。

对照实验。所有扩增实验,无论是在热循环仪上还是在微晶片上,都包括按照被检测的阳性样本的特性而设计的阴性对照。阴性对照是由不含RNA的水或者不含病毒RNA的经裂解的血液组成。阴性对照样本在反应时间内的扩增被认为是污染检测的指标。尽管每一个实验中都包含了阴性对照,但是阴性对照的荧光变化曲线没有在本文呈现。

反应平台。在本研究中,RT-LAMP反应在研究的不同阶段是在两个不同的平台上进行的。为了比较和对比水中纯化的RNA和裂解全血细胞中的病毒颗粒,利用Eppendorf Mastercycler[®]公司提供的ep realplex Real-Time PCR系统,在 0.2 mL 容量的反应管中进行标准的 $25\text{ }\mu\text{L}$ 反应。为了减少由微晶片系统带来的可能的噪音,热循环仪也被应用在微流体混合模式的RT-LAMP反应中。

为了发展微晶片扩增技术,笔者做了若干微晶片实验。实验起始于水中RNA和被RNA侵蚀的裂解全血(上文已经解释了前期实验采用RNA的生物安全性的原因)。每一滴在微晶片上反应的单独的悬液约为 60 nL ,整个晶片被放置在一个铜碗上,如下所述,并在INTEC STC200加热平台上加热。为了采用标准的成像方法,由尼康Eclipse FN1荧光显微镜进行最初成像。之后,笔者使用的是三星Galaxy Note 4智能手机。为了比较智能手机和标准化实验成像设备在成像能力上的差别,笔者分别使用了荧光显微镜和智能手机观察反应。反应最初在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 的商业热循环仪中进行,之后在 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 的晶片上进行。每隔 60 s 用热循环仪和荧光显微镜进行一次荧光检测,在智能手机平台上检测的频率增加到每 30 s 一次。

本文展示了显微镜下水中纯化的RNA在微晶片上反应的图像和用智能手机观察的RNA在裂解全血中的成像。补充材料中提供了中间实验的结果(即显微镜下嵌入了RNA的裂解全血细胞在微晶片上反应的图像)。

2.3 微流体溶解模块

制造。微流体溶解模块创建的基础为先前已经报道过的设计[22]。聚二甲基硅氧烷(PDMS)玻璃微流通道是利用标准化光刻技术从一个SU-8母模制造而来的。未被硫化的PDMS被倒在SU-8母模上,经过干燥器脱气,在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 的热板上被硫化。在利用Diener PICO等离子体系统对PDMS和玻璃载玻片进行溶剂脱脂和等离子体表面激活之前,需要先用 1.5 mm 的活检钻孔机在PDMS中打孔以用于管道连接。经表面活化后,PDMS和玻璃的活化表面相互接触并在 $60\sim 70\text{ }^\circ\text{C}$ 的热平台上加热,从而在PDMS和玻璃之间形成共价键。

流体装置。包含全HIV颗粒的微流体溶解实验是在一个流体装置中完成的。该流体装置是由注射器泵和高效液相色谱(HPLC)阀门组成的,整个装置搭建在一个生物安全柜中,通过与PDMS微流体晶片表面接触进行反应。整个过程依照二级以上生物安全防护水平方案进行。

2.4 晶片上的 RT-LAMP

晶片制造。微晶片RT-LAMP实验采用微加工硅基板[23]。简单地说,硅晶片被加热氧化后能够形成厚约 150 nm 的氧化硅层。然后,该氧化物通过光刻法和氢氟酸蚀刻等处理后暴露出下层的硅。之后,将晶片置于加热的四甲基氢氧化铵(TMAH)中浸泡 18 h ,以各向异性地蚀刻硅,从而形成能够用作反应井的倒正方棱锥。倒正方棱锥的大概尺寸可参见本文的补充材料。

晶片准备。所有应用于RT-LAMP微晶片实验的晶片

都按下述方式准备：首先，将微晶片用1:3的30%过氧化氢和硫酸的溶液清洗10 min，再用去离子水漂洗；之后，每个晶片再用丙酮、甲醇和异丙醇脱脂，并吹入氮气使其干燥；为了产生疏水性表面以促进悬液的稳定性，利用Sigma-cote[®]提供的Sigma-Aldrich对晶片表面进行反复移液、漂洗；最后，用异丙醇对晶片进行简单漂洗，吹入氮气使其干燥，并放置在铜碗中。

显微注射。笔者使用Narishige IM-300微量注射器与Eppendorf VacuTip显微注射毛细管(内径为15 μm，外径为100 μm)放置引物和反应悬液。使用一个20 ms的喷射脉冲，产生约60 nL的液滴悬液。在晶片清理和准备后开始显微注射，过程如下：用水将LAMP DNA引物和Tris-EDTA(TE)缓冲液稀释至最终的反应浓度；利用显微注射系统和来自World Precision Systems的三维显微操纵器(MCL-D331)将液滴悬液注射到微晶片序列的全部36个井中。该过程是在通过Leica MZFLIII显微镜进行观察下完成的。含有引物的液滴被完全干燥，在反应井中留下脱水的DNA LAMP引物。通过目视确认所有液滴都已被脱水后，将晶片浸入重矿物油(Fisher)中并放置在干燥器中以除去气泡。矿物油的主要功能是防止反应液滴在65 °C的加热过程中被蒸发。

在脱气期间，将缺乏引物的RT-LAMP反应准备好并转移到微量注射毛细管中。然后，将反应液滴放置在每一个反应井中使其轻轻地与反应井底部接触，在每个反应井的底部注入约60 nL的液滴，然后将毛细管提出油外。包含所有36个浸没在油中的液滴的晶片被装在铜碗中，然后转移到加热平台和成像装置中(荧光显微镜或智能手机装置)。

集成实验中引物的点样和反应液滴的放置采用同样的方式，但是需要在安装有能够向个人计算机(PC)提供实时视频反馈摄像头的莱卡EZ4D显微镜下进行，并且该显微镜要放置在生物安全柜中。

2.5 荧光显微镜

荧光显微镜成像通过一个具有2倍物镜的尼康Eclipse FN1荧光显微镜和一个尼康96311 B-2E/C FITC荧光滤光片完成。笔者使用NIS元素软件来捕捉水中纯化RNA参与的RT-LAMP反应的荧光影像，影像生成需要6.3倍的显微镜和1 s的曝光时间。对显微成像的嵌入了病毒RNA的裂解全血进行的额外测量(显示在补充材料中)需要8倍的显微镜和2 s的曝光时间，以弥补整体荧光强度的下降。

2.6 智能手机成像

设备。笔者购置了一部三星Galaxy Note4智能手机用

为微晶片基底上的RT-LAMP反应拍照。智能手机的硬件在原厂的基础上没有任何改动。为了分隔荧光团发射波长，在相机和晶片间设置了一个Thorlabs 530 nm高通彩色玻璃滤镜。笔者设计了由3D打印制作的支架(图1)来水平放置智能手机，使照相机位于微晶片的正上方。笔者还3D打印了逐渐增大的圆柱筒来安置光电二极管高输出蓝色LED光源和Thorlabs可过滤500 nm波长的低通滤镜，这个装置安置在上述支架上，并以一定角度给微晶片提供光源。LED由Agilent E364xA DC电源提供的3 V电能来供电，该电源配有由MATLAB脚本控制的自动开关功能。虽然蓝色LED可以用标准的3 V锂电池提供电能，但是为了能够进行电脑控制，因此选用DC电源。

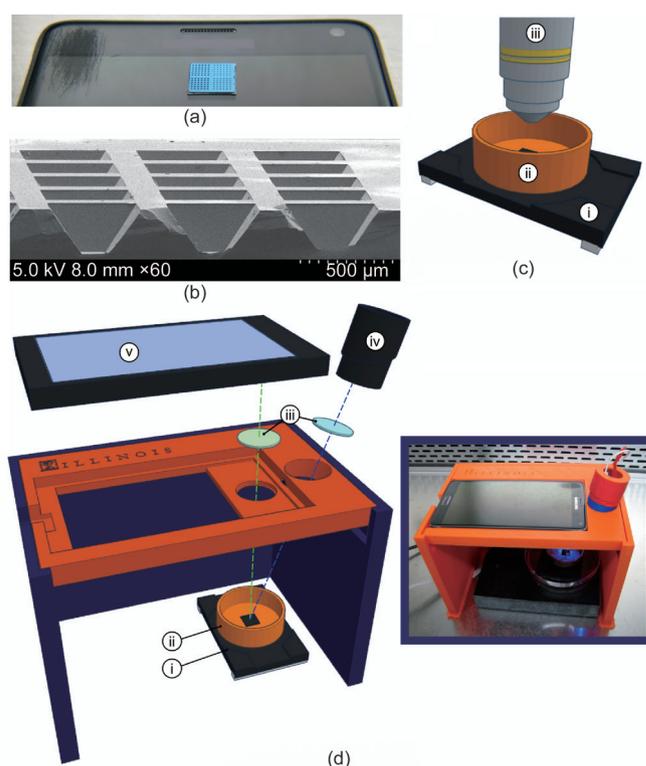


图1. RT-LAMP 基底和智能手机设备。(a) 置于三星智能手机上1 cm × 1 cm 硅晶片基底的图像。(b) 扫描电镜下160 μm 深的反应井横截面。(c) 荧光显微镜设备里微晶片和加热台的原理示意图，包括：(i) 加热台，(ii) 含矿物油的铜质基底，(iii) 荧光显微镜物镜。(d) 智能手机 LAMP 设备的扩展图，包括：(i) 加热台，(ii) 含矿物油的铜质基底，(iii) 置于LED和智能手机相机前的波长滤镜，(iv) 蓝色LED光源，(v) 智能手机。(d-插图) 生物安全柜里组装的设备的图像。

软件。出于生物安全性考虑，在集成实验过程中，整个智能手机拍摄设备都置于生物安全柜中。基于这个原因，通过遥控进行拍照是必需的。因此，笔者从Google Play下载了安卓应用IP Webcam [24]软件并安装到智能手机上。这个应用软件能通过网络实时传送图像，并且被传送的图像可通过网页浏览器实时查看。浏览器的界面允许研究人员控制智能手机相机的焦点、曝光度和增益。笔者通过网页浏览器按以下数值设定了拍照参数，

并以此来进行RT-LAMP反应的拍摄：放大倍率为8，串流品质为99%，曝光补偿为4，以及10倍增益和曝光度为10的夜间模式。

笔者编写了MATLAB脚本来自动控制图像捕捉过程。脚本与加热阶段的激活同时启动。MATLAB脚本按以下顺序拍摄反应影像：打开蓝色LED，延迟3 s；通过IP Webcam网页浏览器界面获取图像，延迟2 s；最后关闭蓝色LED。当拍摄每个反应时，每30 s重复一次该过程。

2.7 数据分析

图像分析。由荧光显微镜或智能手机拍摄设备拍摄的图片被分别保存为TIFF(显微镜)或JPEG(智能手机)格式，并且分析了拍摄时的荧光强度。在这个分析中，每个微滴在MATLAB脚本里的物理位置是人工确定的：通过在MATLAB图片中导入并显示影像，调整方盒的位置以勾勒出微滴的位置。灰度TIFF图像以16 bit无符号整数(范围为0~65 535)矩阵的形式导入，代表图像中的每个像素。灰度JPEG图像以8 bit无符号整数(范围为0~255)阵列的形式导入，代表图像中的每个像素。

在人工确认微滴位置以后，MATLAB脚本通过获取所有由方盒轮廓勾勒出的各微滴的平均像素值来分析各微滴。绝对值是整数值(8 bit或16 bit)范围的函数，同时也是曝光时间、相机增益、实验室灯光亮度和其他因素的函数。因此，需要根据每次测量设立基准，具体描述如下。本文中的荧光强度的量度以任意单位(a. u.)来表示。

阈值时间分析。阈值时间由所有平台上的原始荧光数据决定。首先，通过从所有后续计量值里减去原始的荧光计量值来移除基准线。对于使用水中纯化RNA的热循环仪检测和显微镜检测来说，这是第一个荧光值或记录的图像。对于智能手机检测而言，观测发现在室温下全血样品的自发荧光值在刚开始加热晶片时会快速下降。因此基准线被定义为开始加热后90 s时的测量值，或是智能手机拍摄的第三张照片。

每个反应的阈值时间均通过确定测量值 n 的减去基准线的荧光曲线来估算，在该测量值 n 下，信号超过整个测量过程中最大荧光值的20%。确定 n 以后，通过函数 $I(x) = mx + b$ 得出的荧光值 I_n 和 I_{n-1} 来决定线性拟合，并决定阈值时间 $T_t = (0.2 \times I_{\max} - b)/m$ 。

3 结果

3.1 台式热循环仪中 RT-LAMP 反应的特性描述

水中纯化的病毒RNA。第一个试验，如图2(a)和(b)

所示，是为了描述纯化分析物在标准热循环仪里的RT-LAMP反应特性。HIV-1 IIIB RNA通过第2.1节中描述的两种不同方法进行纯化。第一种方法的RT-LAMP荧光曲线如图2(a)所示，计算得到的阈值时间与相对应的每个反应的平均病毒数如图2(b)所示。阈值时间与对应的病毒数量对数的关系的线性拟合在斜率上的差别小于1.3%，但是在y轴截距上有超过4 min的垂直偏移。

与裂解全血的比较。下一个实验比较了阈值时间与RT-LAMP反应的荧光强度。溶解血中包含的9380个HIV-1 IIIB全病毒颗粒与等量的在水中纯化的HIV-1 RNA参与RT-LAMP反应，作为RT-LAMP反应在裂解全血中可行性的初步测试。图2(c)显示荧光强度测量值，图2(d)通过柱状图比较了两种条件下的阈值时间和最大荧光值。两种条件下的实验都各自重复进行六次，裂解全血的平均阈值时间与水中纯化的RNA相比变化小于2.3%，并且其标准的双样品 t 测试结果显示 P 值为0.0755。最大的总体荧光强度(利用消减基准线通过原始荧光测量得出)显示：裂解全血与水中纯化的RNA相比，荧光信号降低了88.93%。

裂解全血样品的标准曲线。为了验证在理想平台上经最低程度处理的样品的RT-LAMP反应特性，利用一定浓度范围内的全病毒颗粒进行了实验。图2(e)(荧光强度曲线)和(f)(阈值时间对反应中的病毒数量)表明，即使整体荧光强度减小到原来的十分之一，仍能观察到扩增曲线并分析阈值时间。对阈值时间与病毒数量对数的关系进行线性拟合的斜率与纯化的RNA曲线相当(与图2(b)中的方法一相差10.3%，与方法二相差9.1%)。由于所有副本的扩增幅度不一致， $9.4 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ 的样本并未包含在阈值曲线中。进一步验证裂解全血RT-LAMP反应特性的实验测定了血液样本与裂解缓冲液的比例变化，这部分实验结果请参见本文的补充材料。

3.2 微流体血溶解模块

为了确定自动化样本处理的潜力并描绘微流体混合液对整个方法的影响，笔者单独描述了微流体通道内的晶片上溶解特性，如图3(a)所示。加入了三种不同浓度HIV-1 IIIB的全血样本在聚二甲基硅氧烷(PDMS)混合晶片上分别与裂解缓冲液混合，这个过程如第2.3节所述，是在生物安全柜中应用流体学设备来操作进行的。每个样本对应的微流体晶片的产物分别独立收集三份，并用热循环仪中的RT-LAMP进行分析。每个样本的三份产物各自进行一式三份的RT-LAMP反应，也就是说在检测的每个病毒浓度下共进行九组RT-LAMP反应。相同标记的血液样本被添加至裂解缓冲液中作为实验对照，以移液管混合，并同样使用一式三份的RT-LAMP进行分析(即

每个病毒浓度共三个对照反应)。结果表示在图3(b)中。各组的平均阈值时间与手动移液的对照组分别相差0.85 %、3.88 %和0.21 %，对应的裂解后的病毒浓度分别为 $1349 \text{ vp} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $135 \text{ vp} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $13 \text{ vp} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

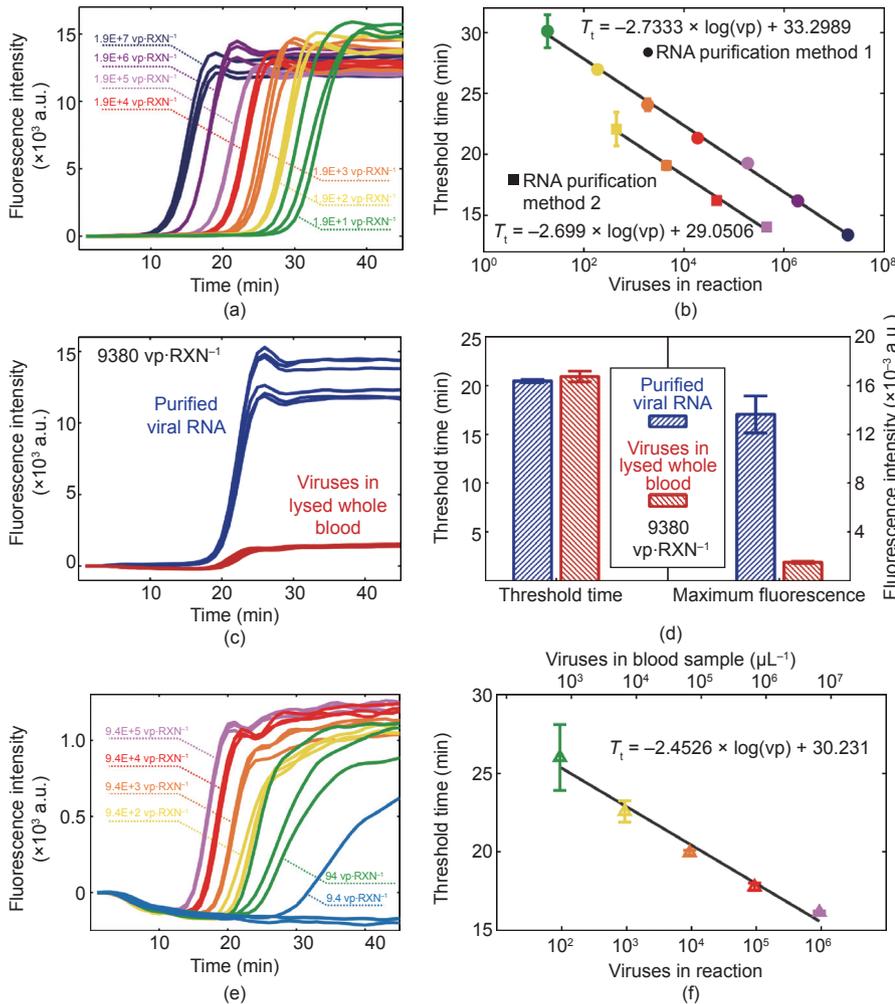


图2. 标准台式热循环仪中的 RT-LAMP。(a) 完整 HIV-1 IIIB 病毒颗粒稀液中稀释纯化的病毒 RNA 的 RT-LAMP 反应荧光数据 (RNA 纯化方法一)。(b) 通过计算荧光曲线超出其最大值 20 % 时的时间得出的阈值时间曲线。数据适用于用两种方法制备的纯化的病毒 RNA。(c) 每种条件重复六次时加入病毒的全血与纯化的 RNA 参与 RT-LAMP 反应的对比荧光曲线。所有反应都包含等量的 9380 个病毒颗粒。(d) 两种状态下时间阈值和整体荧光强度的对比。标记在全血中的 HIV-1 IIIB 完整病毒 RT-LAMP 反应的 (e) 荧光曲线和 (f) 标准曲线。由于所有副本的扩增幅度不一致, (f) 中不包含 $9.4 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ 的样本。RXN 是反应 (reaction) 的缩写。

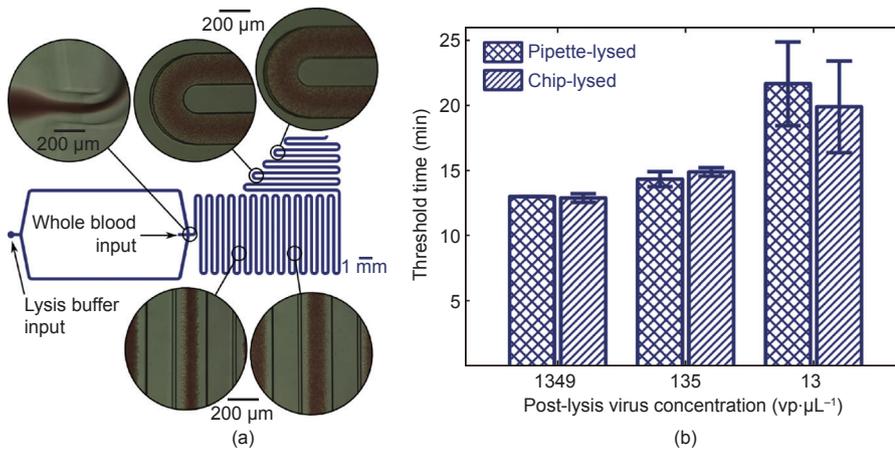


图3. 全血样本的微流体溶解。(a) 明视野显微镜在通道中不同节点近似位置上所对应的微流体设备的示意图。(b) 包含完整病毒颗粒的晶片溶解和移液管溶解样品的阈值时间三个病毒浓度下的比较。这些数据证实了微流体溶解方法与手动方法相比在信号上并没有显著不同。

毒浓度分别为 $1349 \text{ vp} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $135 \text{ vp} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $13 \text{ vp} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

3.3 晶片上 RT-LAMP

接下来在微晶片上论证 RT-LAMP 反应。这个步骤包括在使用智能手机之前, 利用荧光显微镜对水中纯化的 RNA (如图4(a)和(b)所示) 和裂解全血里的 RNA (参见补充材料) 的实验进行成像, 如图4(c)和(d)所示。这个后续实验的目的是建立比较的基础和限制实验进程中每个步骤引入的新变量和干扰源。所有晶片上 RT-LAMP 的测量均按照第2.4节的描述进行准备, 在浸油、排气和反应微滴替换前, 在晶片上进行 DNA LAMP 引物的提前检查和脱水。

实验首先在晶片上描述了水中纯化的 RNA 的特性。图4(a)显示了由荧光显微镜测量出的荧光曲线, 而图4(b)显示了阈值时间的分析。在此次检测中, 由于抑制剂的污染或实验者的误差导致的无关表现, 有两个微滴的数据被移除。被移除的数据包括 $75 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ 和 $7.5 \times 10^2 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ 两个样本各自六个反应中的一个。浓度为 $7.5 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ 的样本的六个反应中只有两个扩增, 因此该样本的阈值时间从图4(b)所示的曲线中被略去。如图4(c)~(f)所示, 依照第2.6节所述用智能手机设备对加入病毒 RNA 的裂解全血样本进行成像。在该检测中没有利用完整的病毒颗粒, 这是因为整套装置未作任何改动, 从而不能在生物安全柜中进行实验。图4(c)展示了由智能手机成像获得的荧光曲线, 图4(d)为阈值时间分析, 图4(e)显示了实验中第7~11分钟内每分钟的智能手机荧光成像实例。由于前30 min 的扩增不充分, 样本 $11 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ (绿色曲线) 和 $1.1 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ (蓝色曲线) 的数据已经从阈值时间曲线中被删除。

图4(f)展示了30 min 实时检测终止后得到的终点测量结果。在利用

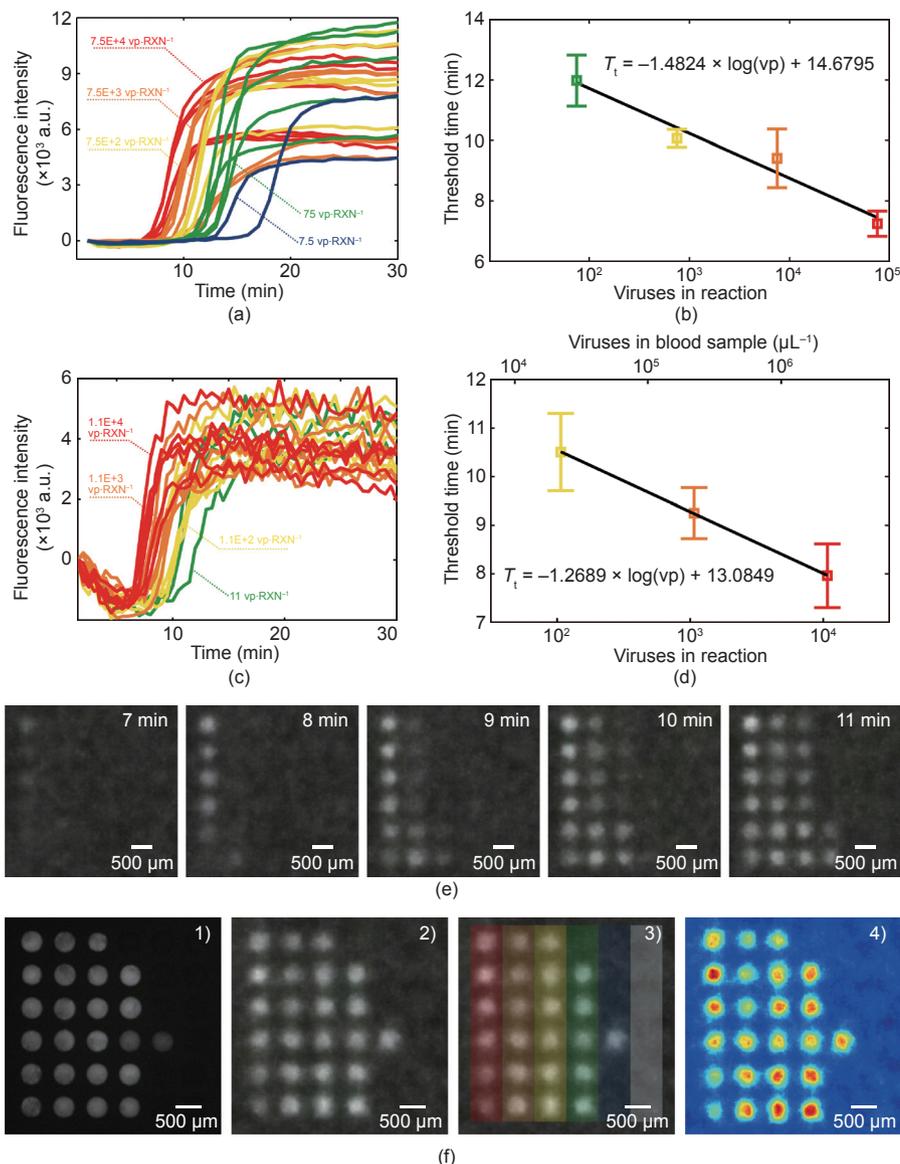


图 4. HIV-1 IIIB 晶片上 RT-LAMP。(a) 减去基线的荧光强度和 (b) 用荧光显微镜成像的微孔基质上水中纯化的 RNA 的阈值时间与病毒浓度关系。(c) 减去基线的荧光强度和 (d) 用智能手机拍摄的微孔基质上加入 RNA 的裂解全血的阈值时间与病毒浓度关系。(e) 用智能手机拍摄的展示四种 RNA 浓度扩增的荧光图像。(f) 在 (c)~(e) 中同一个晶片的终点测量显示了: 1) 荧光显微镜成像, 2) 智能手机图像, 3) 色彩重合显示病毒浓度 (灰色条指示了阴性对照组), 以及 4) 在量化图像中荧光强度的过程中, 由 MATLAB 创建的荧光强度色图。

荧光显微镜拍摄图 4(f)-1) 之前, 阵列中四滴额外的液滴 (三滴 $11 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ 样本, 一滴 $1.1 \text{ vp} \cdot \text{RXN}^{-1}$ 样本) 已经开始了反应。图 4(f)-2) 为紧接着显微镜成像后用智能手机拍摄的图像。图 4(f)-3) 与图 4(f)-2) 一样, 仅增加了一层与本文使用的颜色梯度准则一致的颜色编码图层。最右边第六排是包括一份血液样本和没有病毒 RNA 的反应混合液的阴性对照。

最后, 图 4(f)-4) 作为图像分析过程示例是由 MATLAB 创建的图 4(f)-2) 的色图。

3.4 与其他病毒核酸的兼容性

由于 HIV 和病毒性肝炎 (HBV 和/或 HCV) 经常同时感染, 笔者希望证明晶片上 RT-LAMP 化验方法能够兼容处理这种情况。因为笔者无法获得完整的肝炎病毒颗粒, 所以利用由 HBV 的 DNA 和 HCV 的 RNA 合成的病毒基因组

进行测试。由于笔者所能获得的合成病毒基因组的数量有限, 所以实验仅在水中而不在裂解全血里进行, 以避免由加入病毒核酸的裂解血导致核酸被稀释 10 倍, 并确保实验能在最高浓度的病毒核酸条件下进行。

图 5(a) 显示了由荧光显微镜测量系统获得的三个样本的晶片上 RT-LAMP 荧光数据: 含肝炎病毒核酸的 HIV, 不含肝炎病毒核酸的 HIV 和不含 HIV 的肝炎病毒核酸。不管是否存在其他核酸, 所有包含 HIV RNA 的 24 个微滴都成功扩增 (12 个含肝炎病毒核酸, 12 个不含)。而所有含肝炎病毒核酸且 HIV 呈阴性的微滴都没有扩增。

图 5(b) 比较了两种包含 HIV RNA 条件下的阈值时间。含有肝炎病毒核酸的 HIV 阳性微滴的平均阈值时间与不含的相差不超过 8.9%。两者的标准 t 检验 P 值为 1.8718×10^{-6} 。

3.5 集成实验

笔者设计了集成实验以论证这个 HIV 病毒载量定量方法的快速便捷性。图 6(a) 描述了该操作的整个流程。这些实验与本文中的其他检测有所不同, 在这些实验中全血样本中被注入能够覆盖一定浓度范围的完整 HIV-1 IIIB 病毒颗粒 (不是病毒 RNA), 并且各个样本分别在单独的晶片上进行分析。在微晶片上排列的 36 个反应井中有 6 个被用于阴性对照, 剩下的 30 个被用于检测样本。

实验测试了 5 个样本 (命名为 A~E), 各自在每次反应中分别包含约 32 000 个、3200 个、320 个、32 个和 3.2 个完整病毒颗粒。由于每个反应微滴包含大约 4.8 nL 全血, 相当于每毫升血液含 $6.7 \times 10^5 \sim 6.7 \times 10^9$ 个病毒, 或每毫升血浆含 $1.3 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^{10}$ 个 RNA 副本 (假设血细胞比容为 45%) 的病毒血症。

出于生物安全性考虑, 整个操作

过程都按照之前的描述进行调整, 以在生物安全柜里进行。这个调整带来的挑战是需要小型台式显微镜提供的视频指导下以操作杆控制电动显微操纵器来放置微滴。控制力会随着微滴的放置下降, 从而导致微滴放置的成功率下降。因此, 每次检测中并不是所有放置了阳性病毒反应微滴的30个反应井都被使用。样本A至E成功放置

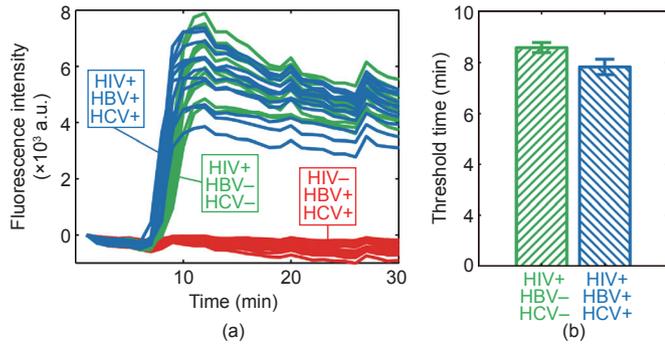


图5. 常见共感染兼容性示意图。在相等浓度(每60 nL反应液中各种病毒数量均为 1.6×10^3 个)的HBV和HCV核酸的存在下, 测试HIV-1晶片上RT-LAMP反应。HIV-1检测的LAMP引物在微晶片阵列的每个反应井中进行脱水处理, 水中纯化的核酸与无引物的RT-LAMP基础混合液进行各种组合。将晶片浸入矿物油中, 并置于 65°C 加热台上的荧光显微镜下。(a)三种组合的荧光显微镜晶片所得的荧光检测结果: HIV+/HBV-/HCV-, HIV+/HBV+/HCV+和HIV-/HBV+/HCV+。(b)比较含肝炎病毒核酸和不含肝炎病毒核酸的HIV RNA阳性样本阈值时间的柱状图。

的微滴数量分别是29个、28个、30个、22个和22个。

图6(b)显示了由智能手机系统描绘的所有在30 min内扩增的微滴的荧光曲线。图6(c)显示了阈值时间与病毒数量的关系。阈值时间与病毒数目关系的拟合直线斜率为 -1.9993 , 与裂解全血样品中晶片上RNA相比在量级上相差57.6%, 与水中的晶片上RNA相比在量级上相差34.9%, 与热循环仪内全血完整病毒颗粒相比在量级上相差18.5%, 与通过热循环仪分析的水中纯化的RNA相比在量级上相差25.9%(第2.1节的方法二)。笔者使用 t 检验来比较阈值时间, P 值小于0.05为显著。

在图6(d)中笔者考虑了一种新的衡量标准——扩增效率, 并观察到病毒数目和扩增微滴片段间的趋势。笔者在本文的补充材料中描述了一个框架用于理解在数字LAMP测量背景下出现这种现象的原因。

4 讨论

4.1 台式热循环仪中RT-LAMP的特性

水中的纯化病毒RNA。在RT-LAMP反应的最初热循环仪特性中, 笔者比较了两种病毒RNA纯化的方法(见第2.1节), 从而为“纯净”反应的信号设定基准线, 并强调指

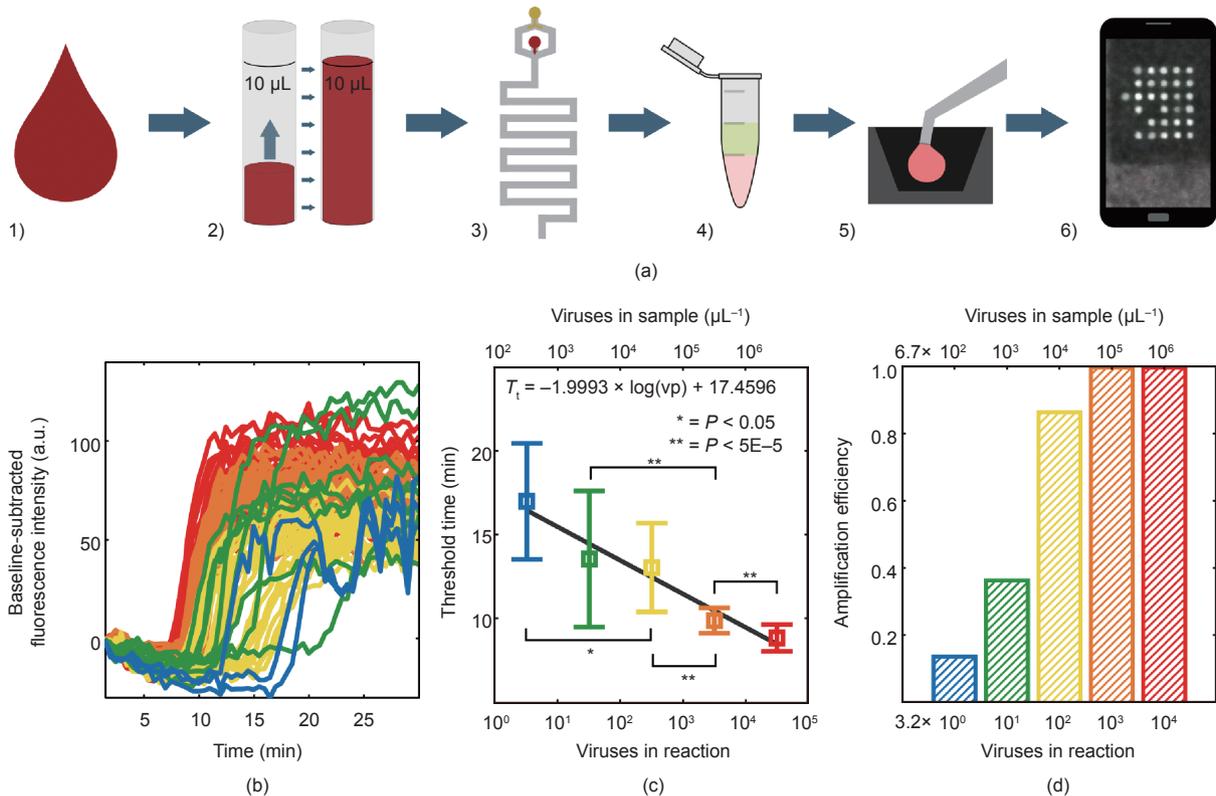


图6. 裂解全血中HIV-1 IIIIB的“采样-反馈”RT-LAMP检测。(a)总体过程的示意图: 1)将加入了HIV-1 IIIIB的全血灌注到微流体设备中; 2)根据储存容积测量 $10\ \mu\text{L}$ 样本; 3)将样本(以 $10\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度)和细胞溶解液(以 $40\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度)倒入微流体混合模块; 4)在没有引物的情况下将混合模块的产物加入RT-LAMP基础混合液中; 5)将混有基础混合液的溶解样本微注射到备有预先准备的脱水引物的微孔基底上; 6)将晶片在带加热台的铜质基底上加热到 65°C , 通过利用智能手机每30 s记录一次荧光图像来监测RT-LAMP反应。(b)利用智能手机成像系统测量实时荧光曲线。(c)阈值时间由减去基准线的荧光强度超过其最大值20%时的时刻决定。(d)扩增效应示意图, 其定义为在每个测试浓度阵列中扩增的微滴片断。

出导致后续分析中RT-LAMP结果发生变化的可能因素。

检测水中纯化的RNA的两个独立实验在稀释物的配制方式上存在不同(方法一是在RNA纯化前,方法二是在RNA纯化后),其中三甲铵乙内酯(甜菜碱)的含量也不同(方法一为 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,方法二为 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在初步测量以后,为了使占反应容量更大的部分保持与样品一致,需要降低三甲铵乙内酯的浓度。一个初始假设为,含有阳离子并能降解DNA二级结构的三甲铵乙内酯能够解释两个标准曲线的不同。但是,在一个精细的对比试验中,不同低浓度的RNA被添加到同种包含 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三甲铵乙内酯的基础混合液中,并且在一半的反应中加入更多的三甲铵乙内酯使其浓度达到 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这个对照实验的结果显示,当RNA浓度低时,阈值时间和扩增效率没有区别(见补充材料)。因此,其他因素可能可以解释热循环仪中的纯化的RNA实验的垂直偏移现象。

笔者猜想这些因素可能包括制备基础混合液时移液过程固有误差导致的酶浓度的不同,与时长有关的酶活性的降低(这两个实验先后相差几周时间,酶活性可能因为试剂的冻融交替而降低),以及周围环境温度变化等。另外, RNA在储存过程中随着时间推移而降解可能会导致方法二中使用的样品的产量降低,并且人工手动移液的变化也可能对从两个独立纯化过程中获得的RNA真实浓度的差别造成影响。

这些都是重要的值得考虑的因素,笔者在现阶段选择承认它们潜在的影响以及降低变化的必要性,并且决定在未来的实验和生产过程中建立严格的控制机制。病毒RNA的稳定性或者RNA纯化过程的产量并不会影响完整病毒颗粒参与的实验的结果。后续分析包括利用第三种、全新的纯化方案(与纯化方法二相同)得到的RNA:纯化的病毒RNA或者裂解全血中的病毒RNA。经过此过程纯化的RNA被均分并在 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境中冷冻储存。为最小化样品的降解,纯化的RNA在实验前才被立即解冻。

与裂解全血的比较。据我们所知,在之前的研究文献中并没有讨论仅通过细胞裂解缓冲液处理的全血中HIV浓度的定量RT-LAMP检测。以全血中的全病毒颗粒与细胞裂解缓冲液的混合液为样品的热循环仪检测结果显示了单纯基于反应动力学来量化病毒浓度的可能性。

整体荧光强度的降低表明在裂解全血样本中存在荧光淬灭物质。但是在比较纯化的RNA和全血时,由于阈值时间是相同的,我们可以得出全血不会影响扩增效率的结论。多数医疗诊断面对的主要挑战是在缺乏可控环境、熟练技术人员和实验设备的情况下从复杂的生物样本里分离分析物的过程,这个发现是非常有前途的[25]。

这种情况下,血细胞溶解与文献中提到的其他更复杂的技术相比是一个非常简单的处理过程[6]。

4.2 微流体血溶解模块

本文的一个目标是证明利用全自动RT-LAMP病毒载量测试方法从一滴全血中(如针刺手指产生的血滴)分析出结果的可能性。这种测试需要对全血血滴进行完整的晶片上样品处理过程,而这个过程一直以来都是诊断方法的主要难题。虽然PDMS原型测试在这个领域非常普及,许多微流体和晶片上操作技术依然受到如何将PDMS设备转变成与注射塑模和其他大规模制造技术兼容的商业可行模式的困扰[26]。反之亦然:当一些性能不具可比性时(如表面流体接触角),那些与制造技术兼容的设计可能很难在PDMS中找到原型。在此笔者证明了所发现的阀辅助样本测试和微流体混合方法可用于血样处理的商业级平台。

容积测量始于任意量的一滴血,使用内径为 $203.2 \mu\text{m}$ 的吸持线圈从中准确测量 $10 \mu\text{L}$,谨记该步骤需使用用于容积测量的商用微流体暗盒。可行的方法也被用于商用微流体设计中的流体混合,使我们在PDMS中的简单蛇形通道原型成为一个合理的设计[27]。

图3(b)里的数据证明利用混合血和缓冲液的蛇形通道进行容积测量的简单方法能够与之后的RT-LAMP分析相契合。三个分别收集的结果显示该方法能够得到准确的混合率,并且晶片上混合至少能和手动移液具有一样的持续性。

4.3 晶片上 RT-LAMP

纯化的RNA与荧光显微镜成像。从图2(b)和图4(b)中的阈值时间与病毒数量对数关系的拟合直线的对比中得出什么样的绝对结论还不清楚。晶片上测量中拟合直线的斜率在数量上相对更小,表明可能存在晶片相关的因素导致使用阈值时间分析来测量病毒数量的灵敏度降低。这个发现导致检测频率从在热循环仪和显微镜测量中使用的60 s一次变成在智能手机下使用的30 s一次。

图4(b)中拟合直线与y轴的截距同样也比图2(b)中所示的更小(14.68 min对29.1 min和33.3 min),表明越小的微滴可能会导致越快的RT-LAMP反应,这个现象在其他地方也讨论过[28]。这个结果在接近快速病毒测试最终目标时可能会被放大。

裂解全血的智能手机成像。通过智能手机成像获取的裂解血检测的数据展示了让我们离本文目标更进一步的两个重要步骤。本文创新核心在于使用智能手机替代实验室设备(如热循环荧光检测仪或者荧光显微镜)。首先,

本文表明了裂解血RT-LAMP检测能够通过使用一般人群负担得起的高端智能手机的现有移动技术来实现。此外,当下趋势显示移动通讯技术将持续提高性能并降低成本,这表明荧光和其他基于光学的诊断拥有令人振奋的前景。其次,笔者的平台(包括3D打印平台、LED光源、排放过滤口和小型化加热台)显示,如果平台足够稳健,就可以开发一个外加部件以附件的形式安装在现有智能手机上,从而将整合于诊断平台上的组件的计算和成像负担转移到一个即使在资源有限的情况下依然随处可见的消费商品上[29]。这样的转变能够显著减少这种技术的生产和调度费用。

4.4 与其他病毒核酸的兼容性

因为HIV与其他一种或多种病毒协同感染的概率很高,特别是在注射毒品的人群中,所以对与其他血源病毒协同感染的预期在实际的HIV核酸检测中尤为重要[2, 30]。笔者证明了纯化的高浓度肝炎病毒核酸(等于每60 nL的反应液中每种病毒约含 1.6×10^3 个)在为HIV设计的RT-LAMP化验中并不扩增。

一项更具体的分析显示标准 t 检验得出的 P 值为 1.8718×10^{-6} ,这表明含有三种病毒核酸的样本与只含有HIV RNA的样本相比在阈值时间上有显著下降。这个结果表明在未来的工作中需要对这个现象进行更严格的描述。阈值时间减少的一个原因是乙型肝炎基因组的存在,其基因呈环状,部分为dsDNA,且浓度相对较高(约 $1600 \text{ copies} \cdot \text{RXN}^{-1}$)。这种基因的存在可能导致不能在全血里显现的效果,这是因为成熟红细胞并不含DNA,而笔者模拟的协同感染样本包含来自染色的dsDNA的新信号源。裂解全血样本里的白血球会非常少(每纳升血中只有几个),并且这些来源的基因组DNA可能被包裹并且很难被dsDNA染料标记。因为在HIV阴性和HBV/HCV阳性样本里没有发现扩增,所以笔者认为将HCV RNA或者HBV DNA作为LAMP的非特异性模板并且导致产生不正确的反应产物是不太可能的。

4.5 集成实验

笔者的集成实验表明了基于反应动力学或数字统计方法的定量病毒载量检测的测量能力。阈值时间曲线图中拟合直线的斜率(图6(c))相当于图2所示的原始特性描述,这表明此集成方法可被量化,甚至可能被证明在化学反应、发酵温度和其他因素的优化上有更好的敏感性。误差棒显示不同浓度在统计学上存在显著差异,这表明此集成实验的分辨率在95%的置信水平内。

显然,为了搭建一个完全自动化的平台,还有些因

素有待改善和解决。图6(a)描述的实验流程由多个部分组成,这些部分与以微流体暗盒为基础的体外诊断平台兼容,并且包括 $10 \mu\text{L}$ 全血的容积测量、微流体样本处理、纳升级的反应微滴、硅晶片基底和智能手机荧光成像。但是该步骤包括了手动将裂解血从微流体模块转移,与含少量引物的RT-LAMP基础混合液混合,以及将微滴置于晶片上。

笔者认为需要这些手动操作环节的问题可以由在实验室中不容易被证明的常见工业方法解决,比如将样品分配到纳升级的反应井[31]。向样品中添加反应成分的问题可以通过冷冻干燥法或被样品再水化的冷冻干燥试剂来解决。冷冻干燥的LAMP基础混合液在参考文献里有描述[32, 33]。除此以外,尽管空气干燥反应成分而不是引物对目前的平台来说是个问题,但笔者观察到本文使用的RT-LAMP基础混合液可以置于 0.2 mL 反应管中通过商用冻干机进行冻干处理(见补充材料),并且能够保持扩增能力。然而,我们没有在晶片上尝试这个过程的设备。

4.6 通过阈值时间来量化

本文所述计量方法展现了阈值时间与病毒数量关系的一个趋势,这表明基于时间的、采用一系列微滴来进行反应的动力学测量可能是量化病毒载量的一个合适的方法,虽然这个方法的局限性有待在更先进的平台上进行检测。对于这个方法,其反应灵敏度由阈值时间与病毒数量关系形成的拟合直线斜率决定,可通过调整酶与缓冲液浓度或培养温度等优化反应的方法来提高。为提高反应的检测下限,需要进行更多的优化。

虽然这些改进可以实现,但裂解全血的方法在其自身能力上会因为反应容积和裂解缓冲液稀释因子而受到限制。因此可以考虑对方法进行包括数字式LAMP在内的改进。

4.7 通过数字式 LAMP 来量化

数字式LAMP和PCR方法在参考文献里已有广泛的描述[21, 34–39]。数字式方法的主要优势在于无论反应是否含少量扩增,该方法只依赖终点测量。在这个方法中,浓度可以通过对成千上万的微滴的测量来估算。本文所讨论的方案能够通过自动分配的方法构建大型的微滴阵列以按比例地提高数字式LAMP的水平。

利用数字式方法检测病毒载量的上下限由个体反应微滴的数量和参与检测样本的总量决定。由于反应微滴的病毒分布遵从泊松统计,为了证明临床HIV管理中用于检测指血全血微滴的按比例扩大的平台在理论上是合

理有效的，笔者在本文的补充材料里简略地回顾了这些原则。例如，仅需要9 μL 全血的数字化LAMP方法能检测出的病毒载量低于500 mL^{-1} ，并且在 $10^4\sim 10^6$ mL^{-1} 的范围内有更好的准确性(见补充材料)。尽管这个方法不能与先进系统的技术规格相比(下限 < 10 mL^{-1})，但却有实用价值，比如在药物治疗改变以后用来检测病毒血症的病毒量减少，或者在诊疗的黄金标准难以实施的情形下确认病毒反弹的病例[40]。此平台作为数字式LAMP检测的性能随着样本容量的增大和反应微滴数量的增加而增强。

5 结论

在进行这些实验以及准备论文稿的过程中发现，开发一个采样-反馈检测HIV病毒载量的定量方法所面临的挑战可以被分割为两个平行的目标：样本处理，传统方法包括将分析物从复杂的基质里分离或强化；分析物的检测。笔者综合地考虑了利用能与微晶片LAMP方法进行整合的多种方法来进行样本处理，这些方法有很多都遵循样本中的细胞材料不能与核酸扩增方法兼容这个指导概念。很多这样的方法会导致分析物被稀释十倍甚至更多，而本文提出的方法在加入LAMP试剂前通过简单且容易实现的处理步骤使得分析物仅稀释五倍，而该处理步骤既不会纯化也不会富集。该方法的关键优势是能够显著降低诊断设备的复杂程度和成本。

本文展示的测量方法表明RT-LAMP量化方法确实能够与经最低程度处理的全血兼容。据我们所知，裂解全血里的RT-LAMP方法仅有一个团队使用过，他们利用该方法在移动加热设备上的反应管里进行了非量化测量[17]。笔者证明量化检测有能力解决浓度在 6.7×10^4 μL^{-1} 以上的10倍变化以及浓度在670 μL^{-1} 以上的100倍变化。笔者观察了每个反应扩增仅有三个病毒的60 nL微滴，其与病毒浓度达670 μL^{-1} 的全血一致。笔者同样讨论了这种方法真正的性能可能更适用于量化的数字式LAMP模式而不是动力学测量。基于微晶片模式的裂解全血智能手机成像病毒检测方法的实现代表了在资源有限的情况下进行病毒载量检测的解决方案有了显著进步。

致谢

笔者感谢Bobby Reddy, Jr.博士，与他的讨论非常有帮助；同时感谢Bruce K. Brown博士和美国国立卫生研究院(NIH)艾滋病试剂项目，感谢他们的支持和有益的讨论，虽然本文中并没有用到该项目的试剂。本研究受

NIH的发现与发展经费(R21)(AI106024)资助。Gregory L. Damhorst受到来自Ruth L. Kirschstein全国研究服务奖对博士研究人员的支持(F30) (AI109825)。

Compliance with ethics guidelines

Gregory L. Damhorst, Carlos Duarte-Guevara, Weili Chen, Tanmay Ghonge, Brian T. Cunningham, and Rashid Bashir declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Supplementary Information

<http://engineering.org.cn/EN/10.15302/J-ENG-2015072>

Materials and Methods

Figures S1 to S6

Eqs. S1 to S4

Refs. [41–44]

References

1. World Health Organization. HIV/AIDS fact sheet. 2014[2015-08-01]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/#>
2. World Health Organization, UNICEF, UNAIDS. *Global Update on HIV Treatment 2013: Results, Impact and Opportunities*. Geneva: WHO Press, 2013
3. J. A. Aberg, J. E. Gallant, K. G. Ghanem, P. Emmanuel, B. S. Zingman, M. A. Horberg; Infectious Diseases Society of America. Primary care guidelines for the management of persons infected with HIV: 2013 update by the HIV medicine association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, 58(1): e1–e34
4. Alere. Alere Pima™ CD4. 2012[2015-05-05]. <http://alerehiv.com/hiv-monitoring/alere-pima-cd4/>
5. Daktari Diagnostics. Products. 2013[2015-05-05]. <http://www.daktaridx.com/products/>
6. G. L. Damhorst, N. N. Watkins, R. Bashir. Micro- and nanotechnology for HIV/AIDS diagnostics in resource-limited settings. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2013, 60(3): 715–726
7. C. F. Rowley. Developments in CD4 and viral load monitoring in resource-limited settings. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, 58(3): 407–412
8. US Food and Drug Administration. Complete list of donor screening assays for infectious agents and HIV diagnostic assays. 2013
9. US Food and Drug Administration. Vaccines, blood & biologics: HIV-1. 2010[2014-03-17]. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/ucm126582.htm>
10. T. Peterson, M. Stuart. HIV Testing Overview. 2011[2014-03-17]. <http://emedicine.medscape.com/article/1983649-overview>
11. X. Zhang, S. B. Lowe, J. J. Gooding. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 61: 491–499
12. T. Notomi, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28(12): e63
13. M. P. de Baar, E. C. Timmermans, M. Bakker, E. de Rooij, B. van Gemen, J. Goudsmit. One-tube real-time isothermal amplification assay to identify and distinguish

- human immunodeficiency virus type 1 subtypes A, B, and C and circulating recombinant forms AE and AG. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39(5): 1895–1902
14. M. P. de Baar, et al. Single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N, and O. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39(4): 1378–1384
 15. K. A. Curtis, D. L. Rudolph, S. M. Owen. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods*, 2008, 151(2): 264–270
 16. C. Liu, et al. An isothermal amplification reactor with an integrated isolation membrane for point-of-care detection of infectious diseases. *Analyst (Lond.)*, 2011, 136(10): 2069–2076
 17. K. A. Curtis, et al. Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of HIV-1. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e31432
 18. K. A. Curtis, P. L. Niedzwiedz, A. S. Youngpairoj, D. L. Rudolph, S. M. Owen. Real-time detection of HIV-2 by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, 52(7): 2674–2676
 19. C. Liu, et al. Membrane-based, sedimentation-assisted plasma separator for point-of-care applications. *Anal. Chem.*, 2013, 85(21): 10463–10470
 20. F. B. Myers, R. H. Henrikson, J. M. Bone, L. P. Lee. A handheld point-of-care genomic diagnostic system. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e70266
 21. B. Sun, F. Shen, S. E. McCalla, J. E. Kreutz, M. A. Karymov, R. F. Ismagilov. Mechanistic evaluation of the pros and cons of digital RT-LAMP for HIV-1 viral load quantification on a microfluidic device and improved efficiency via a two-step digital protocol. *Anal. Chem.*, 2013, 85(3): 1540–1546
 22. N. N. Watkins, et al. Microfluidic CD4+ and CD8+ T lymphocyte counters for point-of-care HIV diagnostics using whole blood. *Sci. Transl. Med.*, 2013, 5(214): 214ra170
 23. C. Duarte, E. Salm, B. Dorvel, B. Reddy Jr., R. Bashir. On-chip parallel detection of foodborne pathogens using loop-mediated isothermal amplification. *Biomed. Microdevices*, 2013, 15(5): 821–830
 24. P. Khlebovich. IP Webcam. 2015
 25. G. L. Damhorst, M. Murtagh, W. R. Rodriguez, R. Bashir. Microfluidics and nanotechnology for detection of global infectious diseases. *P. IEEE*, 2015, 103(2): 150–160
 26. G. Jenkins, C. D. Mansfield. *Microfluidic Diagnostics: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2013
 27. C. D. Chin, V. Linder, S. K. Sia. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip*, 2012, 12(12): 2118–2134
 28. S. Y. Teh, R. Lin, L. H. Hung, A. P. Lee. Droplet microfluidics. *Lab Chip*, 2008, 8(2): 198–220
 29. The World Bank. Mobile phone access reaches three quarters of planet's population. 2012[2015-05-22]. <http://www.worldbank.org/en/news/press-release/2012/07/17/mobile-phone-access-reaches-three-quarters-planets-population>
 30. A. S. F. Lok, B. J. McMahon. Chronic hepatitis B: Update 2009. *Hepatology*, 2009, 50(3): 661–662
 31. M. Baker. Digital PCR hits its stride. *Nat. Methods*, 2012, 9(6): 541–544
 32. Y. Chander, et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front. Microbiol.*, 2014, 5: 395
 33. C. C. Boehme, et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45(6): 1936–1940
 34. A. C. Hatch, et al. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab Chip*, 2011, 11(22): 3838–3845
 35. R. H. Sedlak, K. R. Jerome. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, 75(1): 1–4
 36. K. A. Heyries, et al. Megapixel digital PCR. *Nat. Methods*, 2011, 8(8): 649–651
 37. C. M. Hindson, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods*, 2013, 10(10): 1003–1005
 38. R. A. White III, S. R. Quake, K. Curr. Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *J. Virol. Methods*, 2012, 179(1): 45–50
 39. F. Shen, W. Du, J. E. Kreutz, A. Fok, R. F. Ismagilov. Digital PCR on a SlipChip. *Lab Chip*, 2010, 10(20): 2666–2672
 40. M. Pai, M. Ghiasi, N. P. Pai. Point-of-care diagnostic testing in global health: What is the point? *Microbe*, 2015, 10(3): 103–107