

生物检测及分子诊断高端装备的研制及应用

彭年才^{1,2}, 李 磊^{1,2}, 李 政^{1,2}, 苗保刚³, 李 明³, 赵 焱^{1,2}, 蒋庄德^{1,2}

(1.西安交通大学机械工程学院,西安 710049;2.西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室,西安 710049;

3.西安天隆科技有限公司,西安 710049)

[摘要] 以生物检测与分子诊断技术发展为背景,总结了团队在医学诊断、疾控、食品安全、检疫检验、生物学医学科学研究等领域的分子诊断高端装备的研制情况,重点介绍了实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)分子诊断仪关键技术的研发及仪器工程化技术、检测性能的验证和在社会发展重点领域中的成功应用,手持式腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)生物发光法细菌快速检测仪的研发与应用,以及后续的全自动核酸定量检测与高分辨分析设备研制。

[关键词] 生物检测;分子诊断;实时荧光定量PCR;ATP荧光检测

[中图分类号] T27 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2013)01-0057-06

1 前言

生物检测是指以现代生命科学应用为需求牵引,以先进制造和仪器科学技术为手段研制检测仪器,结合各种测试技术、分析技术和其他基础学科的科学原理,对生物的个体、器官、组织、细胞和生物大分子的生命活动进行定性、定量的观察,比较,分析和判断。而医学诊断方法几百年来至21世纪已经经历了从常规尿液和血液检测、体液酶分析、放射及酶联反应分析到基于分子生物学进行分子诊断的历程。

在世界范围内,随着经济社会的飞速发展,人们对自身健康的要求需要实现高水平的疾病诊断技术。科学研究证明,基因可以揭示疾病的本质,人类几乎所有的疾病都直接或间接地与基因有关。人类可以从基因的发展水平上去认识和诊断疾病,并最终在基因水平上治疗和预防疾病。在肝炎、流感、新型类严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒病例、肿瘤等重大疾病和新发传染病预警诊断和生物医学科研中,生物检测及分子诊断技术已经

得到了实际应用,并且发展前景广阔。笔者研究团队在生物检测与基因分析设备相关理论研究、关键部件研制和工程化实践方面,同时面向科学研究和市场需求,突破核心瓶颈技术,最终形成具有自主知识产权的高端分子诊断仪器,并通过工程化技术进行产业化生产,形成市场竞争力,并推广应用于社会多个重要领域,降低对国外先进设备的依存度,促进经济社会发展。

2 典型的生物检测系统——实时荧光定量PCR核酸检测仪

2.1 研究背景

聚合酶链式反应(PCR)核酸检测技术泛指以扩增DNA或RNA为手段,从而筛查特定基因的检测技术,主要是针对聚合酶链反应产物的检测技术。与传统的生化检测、免疫学检测等生物检测相比,PCR技术由于其在分子水平上进行检测,是典型的分子诊断技术,而且引入了PCR热循环和基因体外扩增的高灵敏性特征,使得其能对病原体或特定基因进行高效、特异性扩增和检测。免疫学方法要等产生抗体才能

[收稿日期] 2012-10-10

[基金项目] “863”国家高技术研究发展计划资助项目(2007AA042104; 2012AA040504);国家科技支撑计划资助项目(2012BAI19B05);国家自然科学基金资助项目(61227018)

[作者简介] 彭年才(1962—),男,江苏溧阳市人,教授,正高级工程师,主要从事生物医学及科学仪器相关研究;E-mail:pnc@mail.xjtu.edu.cn

检出,相比之下,PCR核酸检测技术大大缩短了检出窗口期,一旦感染便能检出,为疾病诊断赢得了时间,真正实现早诊断、早治疗,降低了病死率^[1]。

实时荧光定量PCR仪器又在传统单一功能的PCR热循环基因扩增仪的基础上进行了理论和技术突破,使PCR热循环基因扩增、多通道生物分子荧光检测和核酸定量分析完全一体化,实现了PCR从定性检测到定量检测的飞跃^[2,3],更重要的是自动化检测过程避免了定性PCR仪后续电泳检测对生物标本开盖暴露引起的生物污染风险。2008年夏季版的*Drug Discovery World*在题为“Emerging real-time PCR applications”的文章中指出:“随着创新元素的加入,实时定量PCR仪器技术正在不断发展,和10年前初入商业市场引起的轰动一样,现今实时PCR的应用脱颖而出,它在科学研究和临床诊断领域已经成为核酸检测主要和核心的技术平台^[4]。”

由于几乎全部依赖进口,目前实时荧光定量PCR仪的价格昂贵,几乎是普通PCR仪的10倍,并且让我国重大疾病防控陷入被动,因此笔者研究团队开发的具有自主知识产权的国产新型实时荧光定量PCR仪满足了国家急需。

2.2 关键技术研究

研发的实时荧光定量PCR核酸检测仪器实物及系统总体框图如图1所示,包括多路温控热循环、荧光检测和基因分析软件三大模块。创新点和克服的技术难点包括基于光开关的快速多路荧光检测技术和基因定量分析技术。

2.3 基于光开关的快速多路荧光检测

实时荧光定量PCR仪荧光检测系统的任务是实现多通道荧光检测和荧光定量,要求荧光采集既要速度快又要保证极高的灵敏度、信噪比及抗干扰性。进行通道之间信号快速切换和实现多孔不同标本微弱荧光快速激发与检测、分析是实时荧光定量PCR仪的一个难点。现行的实时PCR技术电荷耦合元件(CCD)检测方式灵敏度偏低,而机械扫描+光电倍增管(PMT)检测方式速度慢^[5,6]。这里采用一种基于光开关+PMT的实时PCR荧光检测方案,巧妙克服了这两种缺点。

基于光开关的PCR高通量荧光检测系统框图如图2所示,框图中采用新型器件光开关^[7]与PMT^[8]的组合设计实现快速多通道荧光信号切换,辅以抗干扰、解决光学边缘效应、优化软件补偿等科学措施,提高了荧光检测系统信噪比,有效解决了生物荧光

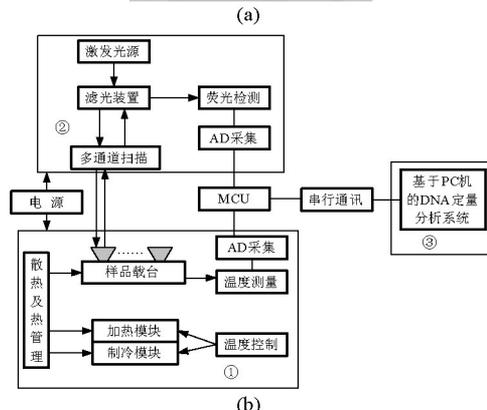


图1 实时荧光定量PCR核酸检测仪实物及系统关键模块组成框图

Fig.1 Physical map and system diagram of real-time fluorescent quantitative PCR instrument

检测系统实现既高灵敏又高速高同步检测的难点。通过电控装置快速变换地址,即可通过入射光开关阵列和出射光开关阵列快速光扫描很快完成多个标本的定量基因检测。由于采用发明专利,保证了多路检测的快速性,能在0.96 s内完成96孔样本扫描,比进口MX3000P用3.5 s进行机械扫描要快得多,与CCD检测方式相比,又保证了PMT检测的高灵敏性以及无机机械动作的可靠性。

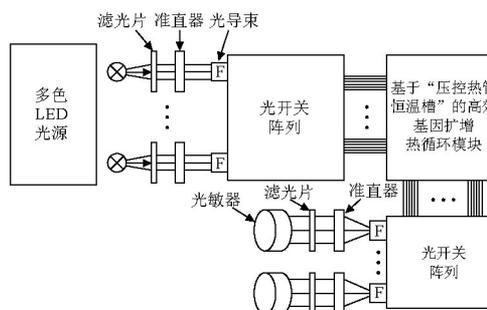


图2 基于光开关的PCR高通量荧光快速检测系统示意图

Fig.2 Block diagram of PCR detection system overall design based on the optical switch

2.4 DNA定量分析算法

实时荧光定量PCR就是通过对PCR扩增反应

中每一个循环产物荧光信号的实时检测,从而实现DNA/RNA起始模板定量及定性的分析。循环扩增过程中实际检测到的扩增反应荧光值曲线不为指数,并且反应曲线跟样品的浓度和效率相关。但在荧光信号指数扩增阶段,PCR产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系,可以选择对这个阶段的实际荧光值进行曲线拟合,然后进行CT值的计算。

通过分析PCR荧光数据特点,设计一种基于改进基因-文化算法的双S曲线拟合算法。通过构建遗传算子,优化算法参数,对原始荧光曲线进行滤波分类识别和标准曲线拟合分析,提高检测结果的可靠性,并在此基础上设计出一套基因扩增定量分析系统,通过基线自动识别和荧光曲线标准化处理,实现PCR扩增结果实时定量。建立基于标准曲线的数据分析模型,准确地拟合PCR扩增实验的扩增曲线,根据扩增曲线分析获得实时定量PCR关键的CT值,并得到准确的病毒、细菌等病原体初始扩增模板DNA含量。实现DNA/RNA高灵敏、宽线性范围的荧光定量数据分析,确诊疾病(见图3)。

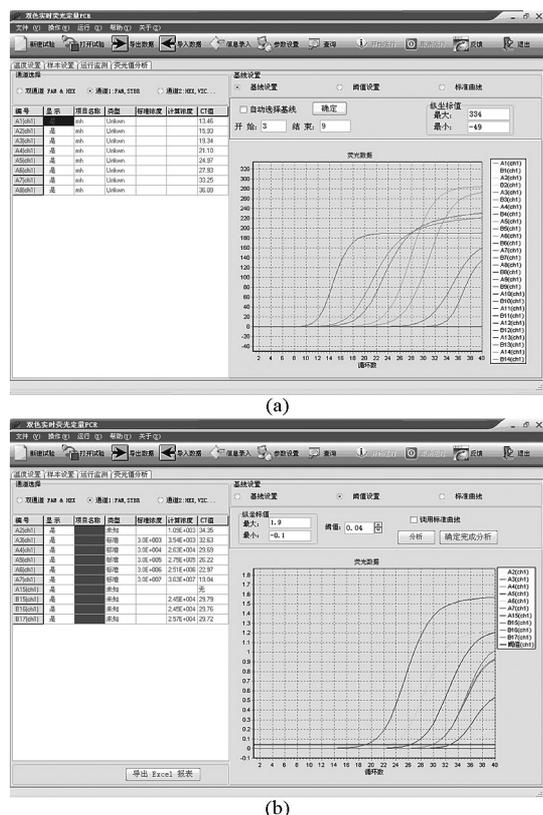


图3 荧光分析实现病毒/细菌DNA/RNA高灵敏、宽线性范围检测和分子诊断从而确诊疾病

Fig.3 Fluorescence analysis to realize virus/bacterial DNA/RNA high sensitivity and wide linear range detection so as to diagnose diseases

2.5 仪器工程化技术、检测性能的验证

走校企结合的自主创新途径,通过制定工程技术方案和质量控制体系对研发的仪器质量和性能进行保障。按照从可行性到产品退役的整个生命周期对产品进行分析,规范研发流程管理,采用集成产品开发(IPD)模式。在仪器开发和应用各环节与整机开发的衔接方面,按照ISO13485质量体系规范相关内容,制定控制体系,建立针对仪器特点行之有效的可靠性和安全性设计、评价及相关控制流程方法的综合体系。

研发的实时荧光定量PCR仪通过产学研用模式已经获得了国家发明专利和医疗器械注册证,实现了批量化生产,该仪器经过了国家食品药品监督管理局天津医疗器械质量监督检测中心的检测,及第四军医大学西京医院和西安交通大学医学院第一附属医院国家药物临床研究机构的临床验证和省级科技鉴定。该仪器可检测96个0.2 mL PCR反应管,温控准确度:0.3 °C,平均升温速度:2.6 °C/s,平均降温速度:2.4 °C/s,控温范围:4~99 °C,DNA/RNA定量精度:CT值的相关系数 $R=0.997$;CT值的重复性误差 $CV=2.1\%$ 。与国外进口的标志性品牌ABI公司的7700型仪器相比,以上指标如平均升、降温速度和控温精度等明显高于进口品牌。而包括一体机多通道、自动化水平、多色检测以及热盖功能等指标与国外产品相当,总体达到了国际先进水平。

2.6 在社会发展重点领域中的应用

多个国际、国家或行业标准将实时定量PCR规定为病原体检测、突发传染病诊断、生物污染和疫情监测的依据^[9],如2009年世界卫生组织、美国疾病控制与预防中心(CDC)以及中国卫生部把实时定量PCR方法确定为检测病毒核酸、确诊甲型H1N1流感的实验室确诊方法。研发的国产实时荧光定量PCR仪能够满足上述需求,已应用到全国多家各级各类医疗及疾控部门,服务于肝炎、流感、艾滋病及优生优育检测,替代进口。在2009年流感爆发期间,装备了近10家国家流感监测网络实验室,在西安市疾病预防控制中心检出了陕西省首例甲型H1N1流感病例^[10],并得到了国家疾病预防控制中心的复核确认,另外在全国流感检测中得到了推广。图4为检出陕西首例甲型H1N1流感时的分子诊断曲线图,完成检测耗时2 h 10 min,阳性对照、阴性对照、内对照、被测未知标本CT值偏差及特异性

和敏感性等指标均达到了甲型H1N1核酸检测试验的要求。

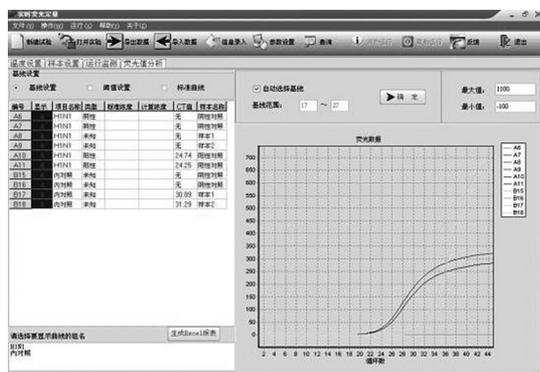
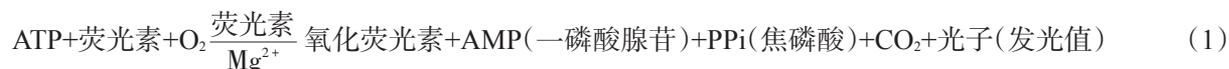


图4 应用实时荧光定量PCR核酸检测仪检测甲型H1N1流感病毒结果

Fig.4 Application of real-time fluorescent quantitative PCR nucleic acid detector testing a H1N1 flu virus

作为科学研究仪器,研发的实时荧光定量PCR仪同样广泛应用于全国各科研院所,服务于多项生物医学前沿研究工作,满足了核酸定量检测及基因分析等科研重大需求。如西安交通大学医学院生理与病理生理学系通过使用核酸提取仪及实时荧光定量PCR仪进行不同样本来源的核酸提取,用于帕金森、冠状动脉硬化和癌症的分子病理学研究;西北农林科技大学生命科学学院利用实时荧光定量PCR仪进行人乳头瘤病毒(HPV)宫颈癌相关基因组学研究。复旦大学使用研发的PCR分子诊断仪进行脑神经系统相关基因研究,在脑病理学权威期刊发表了影响因子为8.654的高水平论文^[11]。

通过实时荧光定量PCR在以上各领域的应用,推动了量大、面广、价高的高端分子诊断装备和生命科学仪器的技术突破和自我装备能力,促进了我国生命科学相关研究的发展,提升了我国科学仪器和先进装备制造的产业化水平和国际竞争力,因此实时荧光定量PCR仪成果被选入“十一五”国家重大科技成就展。



微生物发光有以下特点:微弱、短暂、稳定性差、发光曲线呈类抛物线型及信号易被淹没。笔者研究团队采用一种使用酶促扩大低水平ATP的ATP循环系统^[14],如图6所示。基于微流控芯片的多酶

3 生物检测与分子诊断装备发展

3.1 微型化、便携化方向满足现场快速检测需求

进入21世纪以来,飞速发展的经济社会及日益增长的全球市场对高端生物检测与分子诊断装备提出了更高的要求,针对检测仪器微型化、现场化和即时检测(POCT)的应用需求,笔者研究团队研发了适用于现场快速检测细菌总量的微小型便携化生物检测设备——手持式腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)生物发光法细菌快速检测仪^[12,13]。其仪器及快速检测微反应腔设计示意如图5所示。



1—储液管;2—控制阀;3—ATP提取缓冲液;4—家属提取试剂的棉拭子;5—隔膜;6—固定杆;7—液体控制口;8—检测管;9—螺杆头;10—活动栓;11—活动头;12—密封管;13—枪头针;14—荧光素酶缓冲溶液;15—荧光素酶粉剂

图5 手持式ATP细菌快速检测仪与微反应腔设计示意图

Fig.5 Schematic diagram of hand-held ATP bacteria rapid detector machine and design of micro reaction cavity

ATP又叫三磷酸腺苷,是所有生物包括细菌的细胞中均有的能量分子。测定出样品中细菌细胞的ATP含量,即可得知细菌数。ATP试剂中荧光素-荧光素酶等与被测样本反应能产生光子,如式(1)所示。由于细菌总量与发光值之间存在一定的函数关系,因此通过检测发光值即能得到被测样本所含细菌等微生物总量,该方法具有广普、灵敏度高和速度快的优点。

ATP信号放大技术将微流控芯片设计成一定周期的两种酶交替排放,就能形成一定的放大倍数,这样流道出口放大后的ATP浓度取决于流道入口ATP的初始浓度,只要恰当地控制两种酶的活性、量及

反应时间,则可以在一定程度上维持放大倍数不变,再通过对ATP生物荧光检测确定微生物总量。

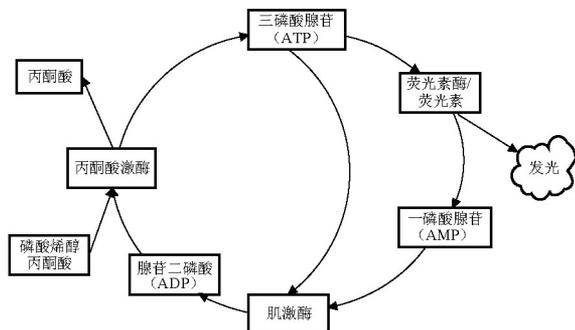


图6 酶促扩大ATP的循环系统示意图

Fig.6 Schematic diagram of enzymatic expanded ATP circulation system

细菌菌落总数是国际上食品卫生标准中判断食品卫生质量的一项重要指标,也叫洁净度指标。在医院感染控制、食品药品生产洁净度及食品安全检测和环保、生物污染评估等应用领域中,传统的实验室细菌培养法/平皿法评估细菌总量需24 h以上,且灵敏度低。笔者研究团队研发的手持式ATP生物发光法细菌快速检测仪仅需十几秒钟,且灵敏度达到食品检测等领域的要求,发明专利“一种手持式三磷酸腺苷荧光检测装置”是国内首个也是目前唯一手持式ATP荧光检测系统相应的发明专利。美国多个专业权威机构研究了1 000个以上的样品,这种只需十几秒就能完成检测的快速检测法所得实验结果90%以上与24~48 h标准细菌培养法/平皿法所得结果一致。加拿大食品监督协会经过比对实验后发现,本产品测定结果与标准培养法的相关性是98%^[15]。本检测仪测定结果与传统细菌培养法所得结果相比,相关性高达92%~98%,而且该仪器为便携式设备,操作简单,携带方便,可就地即时检测样品,整个过程1 min内得出检测结果。

该检测仪器目前已进入批量化生产,并经陕西省产品质量监督检验所检验,其性能达到和超出我国《县级卫生监督机构现场快速检测设备装备标准》及《餐饮服务食品安全现场快速检测设备配备基本标准》的要求,用于食品加工、储存运输、贸易、餐饮服务以及医疗系统物体表面及操作人员手等表面洁净度快速测定,尤其在食品和生物污染突发事件现场快速检测中起到了不可替代的作用,已大规模推广应用到陕西省产品质量监督检验所、山东鲁药集团、天津大学、北京三元食品有限公司、青岛

圣元乳业、甘肃省人民医院、河南省食品药品监督管理局、韩国Teltron、加拿大M & I Instruments等单位,应用单位反馈证明满足检测需求。

3.2 自动化、集成化满足大批量样本处理需求

除了满足微型化、现场化和即时检测这一发展要求,高通量、大型、满足样本全自动检测的需求也是生物检测与分子诊断装备发展的一个重要方向。目前的生物检测设备如实时荧光定量PCR仪还须另外配备样品和试剂等液体的前处理设备,总体检测速度相对较慢,测定周期延长,对大样本的批量处理能力较弱,样本在前处理与后续检测之间存在污染而导致检测结果的准确性降低,因此在生物检测与分子诊断领域迫切需要自动化和集成化的检测仪器。

以自有专利技术为基础,笔者研究团队正在研发中的高通量核酸自动化定量检测与高分辨分析系统,目标实现自动化样本转移和加样,集核酸提取、基因扩增、定量检测和高分辨分析4种功能为一体,开发出重大装备,填补国内空白。为实现核酸提取和PCR反应体系建立的自动化,重点研究自适应运动控制、运行过程监控、智能化生物污染控制技术,基于“压控热管恒温槽”进行创新的热循环模块设计拟采用专利技术的集成温度压力传感器提高温控系统的性能,满足高分辨率溶解曲线(HRM)分析对温度均匀性、升降温速度的要求。在分析软件中,采用无需先验知识的“free-form”特征提取算法进行HRM高分辨溶解曲线分析和“小世界神经网络”的基因分型聚类分析算法,通过对溶解曲线的进一步形态分析及归一化处理可得到更详细、更精确的DNA信息,实现如甲基化或单核苷酸多态性(SNP)分析等突变检测和基因分型科学研究。

4 结语

随着人类社会发展,医学诊断、疾病控制、生物安全、食品安全、检验检疫、农林牧渔、生物学医学研究等社会各领域都对生物检测与分子诊断高端设备提出了更高的要求。笔者研究团队通过产学研一体化的创新途径,对仪器所涉交叉学科的研究探讨和高端装备研制关键技术的攻关,推动了量大、面广、价高的高端分子诊断仪器装备和生命科学仪器的技术突破和自我装备能力,促进了我国生命科学相关研究的发展,提升了我国科学仪器和先进装备制造的产业化水平和国际竞争力。面对新

的发展需求,要紧跟前沿趋势,融合先进的微纳制造技术与自动化控制技术,实现分子诊断的即时检验和大通量生物样本自动化检测,使生物检测与分子诊断高端设备更好地服务于社会生活。

参考文献

- [1] Mullis K B. The unusual origin of the polymerase chain reaction [J]. *Scientific American*, 1990, 262(4):56-61.
- [2] Wittwer C T, Herman M G, Moss A A, et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification[J]. *Biotechniques*, 1997, 22(3):130-138.
- [3] Mackay I M. Real-time PCR in the microbiology laboratory[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10(3):190-212.
- [4] Kubista M. Emerging real-time PCR applications[J]. *Drug Discovery World*, 2008(summer):57-66.
- [5] Life Technologies. PCR/RT-PCR[EB/OL]. [2005-06]. <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=cat-Navigate2&catID=600961>.
- [6] Agilent Technologies. MX3000pBrochure.pdf[EB/OL]. [2004-08]. www.bio.davidson.edu/courses/bio343/mx3000p_manual.pdf.
- [7] 王刚,明安杰,梁静秋. 光开关研究进展[J]. *微纳电子技术*, 2005,42(4):195-199.
- [8] 李炜,彭年才,张镇西. 光电倍增管(PMT)研究进展及在生命科学领域的新应用[J]. *世界医疗器械*, 2005,11(5):76-79.
- [9] Arlington. The market for real-time PCR reagents & instrumentation[J]. *Bioinformatics*, 2003(11):180.
- [10] 彭年才,张镇西,兰邹然,等. 实时荧光定量PCR在甲型H1N1流感诊断中的作用[J]. *世界医疗器械*, 2009,15(6):56-57.
- [11] Wu Lihui, Zhao Qianlei, Zhu Xuchao, et al. A novel function of microRNA Let-7d in regulation of Galectin-3 expression in attention deficit hyperactivity disorder rat brain[J]. *Brain Pathology*, 2010, 20(6):1042-1054.
- [12] 龚大江,刘家家,李春彬,等. 手持式ATP荧光检测仪的研制[C]//中国生物医学工程进展——2007中国生物医学工程联合学术年会论文集(上册). 西安:西安交通大学出版社,2007:340-343.
- [13] 彭年才,张镇西,刘家家,等. 一种手持式三磷酸腺苷荧光检测装置:中国200710017609.X [P]. 2008-03-12.
- [14] 骆文静,侯悦,胡艳冰,等. 铜银离子协同游离氯灭活水中微生物的实验研究[J]. *解放军预防医学杂志*, 1997(5):326-329.
- [15] Squirrell D J, Price R L, Murphy M J. Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 457(1):109-114.

Research and application on high-end equipment of biological detection and molecular diagnosis

Peng Niancai^{1,2}, Li Lei^{1,2}, Li Zheng^{1,2}, Miao Baogang³,
Li Ming³, Zhao Yao^{1,2}, Jiang Zhuangde^{1,2}

(1. School of Mechanical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; 2. State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;
3. Xi'an Tianlong Technology Co. Ltd., Xi'an 710049, China)

[Abstract] Based on biological detection and molecular diagnostics technology development, the author summarized high-end equipment independent research in medical diagnostics, disease control, food safety, quarantine inspection, biology and medical research field of molecular diagnostics. The paper focused on research and development of key technology and instrumentation engineering technology, detection performance verification and successful application in the field of social development priorities of the real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) nucleic acid detector, diagnosis of high-end equipment, the development and application and subsequent automatic nucleic acid directional monitoring with high-resolution analysis equipment development of handheld adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence rapid detection of bacteria.

[Key words] biological detection; molecular diagnosis; real-time quantitative PCR; ATP luminescence detection