

# 液相芯片技术在传染病快速诊断中的应用

闫俊平 曹东林

**【摘要】** 目前传染病仍是危害人类健康、导致死亡的重要原因。建立高通量、快速、可靠、经济的病原微生物诊断技术平台可为传染病病原体的诊断提供技术储备。笔者详细介绍了液相芯片技术的原理、优点,并对该技术在传染病病原体筛查方面的应用进展作一综述,表明其可用作传染病病原体的高通量检测平台。

**【关键词】** 液相芯片; 传染病; 诊断

中图分类号: R446.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-332X.2017.12.020

## The Application of Liquichip Detection Technology in Rapid Diagnosis of Infectious Diseases

YAN Junping\*, CAO Donglin

**【Abstract】** At present, infectious diseases are still harmful to human health and important causes of death. The establishment of a high-throughput, fast, reliable and economical pathogenic microbiological diagnostic technology platform provides a technical reserve for pathogen diagnosis of infectious diseases. In this paper, the principle and advantages of liquichip technology are introduced in detail, and the application of this technology in the screening of infectious disease pathogens is reviewed, which shows that it can be used as a high-throughput detection platform for infectious disease pathogens.

**【Key words】** Liquichip; Infectious Diseases; Diagnosis

**【Author's address】** \* Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China

传染病是指由病原微生物感染人体后产生的有传染性、在一定条件下可造成流行的疾病。本世纪以来多次发生严重的新发传染病或多年未发生又死灰复燃,其中许多传染病能使人在短期内罹患疾病,造成大规模的死亡。因此,如何有效控制传染病仍是医学研究领域的重点,而快速检出病原微生物则是关键,否则就有可能在人群中爆发、扩散。因此,建立高通量、可靠的病原微生物诊断技术平台,才是有效控制传染病发生的关键措施。

液相芯片技术是一种使用悬浮在液体中的编码微球作为反应和检测载体的新型分子生物检测技术,它是激光技术、流式细胞仪、数字信号处理和传统化学技术的整合<sup>[1]</sup>。该技术操作简单、杂交动力学快、微球应用灵活,可对不同指标进行同时检测,为高通量分子诊断提供良好的平台,因此具有巨大的运用前景。迄今为止,全球已有数百套液相芯片技术用于蛋白质、核酸等检测<sup>[2]</sup>,该技术已成为蛋白质组学和基因组学的一种新的研究工具。

### 1 液相芯片技术的原理

液相芯片由许多固定有不同探针分子的圆形聚苯乙烯微球构成,且每一种微球都有一个独特的荧光编码,将这些微球悬浮于液相中即构成一个液相

芯片体系。该系统可以对同一样本中的不同分子进行同时检测。在液相系统中,为了区分不同的探针,每一种固定有探针的微球都有一个独特的荧光编码。在微球制造过程中通过加入 3 种不同的荧光素,根据荧光素比例不同可将微球分为 500 种,形成一个含有 500 种不同微球的阵列。不同颜色微球在分类激光激发下产生的荧光互不相同,这种分类荧光是识别不同微球的唯一途径。利用这 500 种微球,可以分别标记上 500 种不同的探针分子。荧光微球表面可带有不同的基团(如羧基、亲合素和组氨酸等),共价结合不同类型的探针。羟基基团可以共价结合任何含有氨基的探针分子,因此可对聚苯乙烯微球的表面进行不同的化学结构修饰,使不同的微球可以识别不同的探针分子。检测时依次加入标本和报告分子与标记的微球进行反应,标本中的目的分子(待检测的抗原或抗体、生物素标记的靶核酸片段、酶等)能与探针以及报告分子特异性结合,使微球携带上报告分子藻红蛋白,然后利用液相芯片仪对微球进行检测和结果分析<sup>[1]</sup>。在检测过程中,结合流式细胞技术和激光技术使微球单列快速通过检测通道,检测系统内置有激光发射器用于发射两束不同波长的激光,使用红色激光对微球上的分类荧光进行检测,可将微球分类,鉴定出不同的反应类型;使用绿色激光检测报告分子上的报告荧光,可确定微球上结合的报告分子数量,即目的分子的数量。通过同时检测红绿双色激光即可完成对

基金项目:广东省级财政技术研究开发与推广应用专项资金项目(编号:粤财工[2013]401号)

闫俊平 曹东林:广东省第二人民医院 广东广州 510317

反应的定性、定量分析。

## 2 液相芯片技术的优点

液相芯片技术的优点<sup>[3]</sup>: ①高通量,通过 3 种染料不同比例的混合使同一反应可以同时检测 500 种不同的待测指标; ②检测所需试剂及标本量少,仅需 5~50  $\mu\text{L}$  的样本即可同时检测多个指标,试剂用量少,减少人力消耗; ③液相体系有利于抗原抗体反应,检测系统中的两种激光只检测和记录与微球上的红色荧光同时出现的绿色荧光信号,使结果的特异性更高、反应更稳定; ④不同微球分别用寡核酸或蛋白质(抗原或抗体)标记后混合,在临床使用时,可根据不同需求,选择特殊组合的探针,实现个体化检测(核酸或蛋白质检测); ⑤该技术是对微球荧光信号进行检测后,用相应软件进行分析,使结果更精确、可靠; ⑥反应速度快,液相条件接近于核酸所处环境,有利于分子相互作用,孵育时间短,且无需洗脱即可进行检测分析。进行免疫学分析时,若使用高亲和力抗体 2~3 h 内即完成检测,而核酸杂交分析在 PCR 扩增后 1 h 内可得到结果; ⑦检测系统多样化,Luminex 200 系统是临床广泛运用的检测系统,然后 FLEXMAP 3D™ 超高通量检测系统进一步在性能上加强,目前 Luminex 公司已推出了磁珠专用的多重检测系统 MagPix,小巧便携的 MagPix,非常适用于爆发恐怖事件或大范围传染病等紧急情况下的快速以及野外现场的检测。

## 3 液相芯片技术在传染病病原体检测中的应用

液相芯片技术可根据不同需求进行相应的构建,可对不同的生物分子进行高通量、快速、准确的检测,在蛋白质、核酸等生物大分子的分析中具有巨大的应用潜力,可用于免疫分析、核酸研究等领域。现将液相芯片技术在传染病病原体检测中的应用综述如下。

### 3.1 病毒性传染病病原体的检测

Leblanc N 等<sup>[4]</sup>运用液相芯片技术对瘟病毒属进行了检测和种的鉴定;之后又运用液相芯片技术对非洲猪瘟病毒的 22 种基因型进行了检测和区分<sup>[5]</sup>,该方法可以同时检测非洲猪瘟病毒进行快速诊断和基因分型。袁静等<sup>[6]</sup>基于液相芯片技术建立了一种同时对 H5N1 和 H7N9 亚型流感病毒进行快速检测的新方法。用已知基因型的样本对该方法进行验证显示它的特异性高。灵敏度分析实验也表明该方法灵敏度高,能够用于流感病毒 H5N1 和 H7N9 亚型的快速检测及鉴定。Laamiri N 等<sup>[7]</sup>证明了 DNA 液相芯片技术在快速诊断主要的禽类呼吸道病毒方面是一种准确、高通量、相对简单的方法。朱

余军等<sup>[8]</sup>用液相芯片技术检测 I 群禽腺病毒,发现所建立的液相芯片技术特异性强;检测的敏感性高;批内批间的变异系数低;检测结果与荧光 PCR 方法 100% 相符。表明建立的液相芯片方法可用于 I 群禽腺病毒的检测。呼吸道病毒是引起婴幼儿呼吸道感染最主要的病原体,为快速准确诊断其感染,王洁等<sup>[9]</sup>建立了一种基于液相芯片系统的检测 A 型流感病毒、B 型流感病毒、呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型 4 种常见呼吸道病毒的方法,该方法具备灵敏、特异、快速等优点,为临床早期、准确判断呼吸道感染的病原体提供实验依据。Akhras MS 等<sup>[10]</sup>设计了一个可以区分与宫颈癌进展相关的 10 种人乳头瘤病毒基因型的模型试验。结果显示与扩增子焦磷酸测序相比,使用测序珠阵列的方法对 20 个宫颈癌肿瘤样本进行基因分型,由于其敏感性更强所以可以检测两个附加的共感染。张莉等<sup>[11]</sup>探究液相基因芯片技术在崇明地区人乳头瘤病毒检测和分型中的应用,发现液相芯片 HPV DNA 检查对大规模筛查和宫颈病变的临床诊断有十分重要的价值。Chen YS<sup>[12]</sup>发现在急性呼吸道感染的患者中液相芯片技术对于细菌检测具有更高的灵敏度,对于病毒和非典型病原体的检测也不次于实时 PCR。Hindson 等<sup>[13]</sup>采用液相芯片技术检测引发手足口病的一系列病毒,获得良好结果。刘毓刚等<sup>[14]</sup>基于液相芯片技术建立了一种对水痘-带状疱疹病毒(VZV)进行快速高通量检测分型的新方法。利用该系统检测 19 例临床水痘及 25 例带状疱疹患者疱疹液标本的 VZV 分型。结果显示利用液相芯片技术建立的 VZV 检测分型系统具有快速、高通量、高灵敏度和特异性的特点,可以用于临床 VZV 感染的诊断及流行病学调查。周有良等<sup>[15]</sup>建立的基于液相芯片技术的丙型肝炎病毒分型检测方法能对八种亚型进行检测和分型,具有较高的特异性和敏感性。对临床样本的检测结果表明,该方法具有高通量、快速、敏感、特异的特点,可以实现对丙型肝炎病毒八种亚型的同时快速检测,是丙型肝炎病毒分型检测的一种新方法。纪方晓等<sup>[16]</sup>用液相蛋白芯片技术检测 HEV 血清抗体。对 102 份临床血清样本检测结果显示,该方法与商品化 ELISA 试剂盒符合率为 93.1%,关联性卡方检验显示两方法具有一致性。本试验为临床的检测提供了一种特异、灵敏的新型快速检测技术,为建立猪病多重检测方法提供了基础。石莹、李云峰等<sup>[17-18]</sup>建立的虫媒病毒的液相芯片检测方法,为虫媒病毒的筛查检测提供一种新方法。该方法具有高通量、快速、敏感、特异等特点,适用于国境口岸对虫媒病毒进行筛查检测,能提高检

测的效率,满足口岸检疫中快速检验的要求。尹伟力等<sup>[19]</sup>初步建立了检测病毒性出血性败血症病毒(VHSV)的液相芯片技术,结果表明液相芯片检测体系能够正确检出VHSV,检测特异性高,为VHSV的检测提供了新方法。

### 3.2 细菌性传染病病原体的检测

液相芯片技术已应用于大肠埃希菌的研究<sup>[20]</sup>,该技术的主要优势是可以同时对大肠埃希菌进行血清学分型和检测毒力以及致病性标志物的存在。相比于实时荧光PCR<sup>[21]</sup>对细菌性病原体的检测最主要的优势是高能、多通道性。董晓琳等<sup>[22]</sup>建立的E. coli 0157:H7新型液相蛋白芯片技术,与常规液相蛋白芯片不同,该方法直接将染色后的菌体荧光作为报告分子,能够较为快速的实现对E. coli 0157:H7的检测。Liang DW等<sup>[23]</sup>研究发现沙门菌血清型快速分型试剂盒(XMAP®液相芯片法)具有高通量的特点,可以快速准确地对沙门菌进行血清学分型。该试剂盒可以用于鉴定沙门菌的血清型。金玉娟等<sup>[24]</sup>建立了一种基于多重PCR结合液相芯片技术同时检测沙门菌、副溶血性弧菌、单增李斯特氏菌及肠出血性大肠埃希菌的方法,发现该方法能快速、准确、特异的同时检测这四种常见食源性致病菌。通过使用通用的Luminex®xTAG技术,Thierry S等<sup>[25]</sup>发现了一种有效的多种SNP基因分型的方法,可以检测炭疽芽胞杆菌基因组中的13个SNP位点。Carlos CA等<sup>[26]</sup>利用液相芯片技术鉴定出组织内的病原微生物是细胞内菌分枝杆菌。随后感染的患者开始使用克拉霉素、利福布丁和乙胺丁醇,临床症状有所改善。细菌培养可能出现阴性结果并且需要3周才能显示生长,所以这种分子学的方法提供了一个快速、特异的诊断分枝杆菌的方法。Martins<sup>[27]</sup>在微球上交联A组链球菌的9种不同抗原,定量分析了患者感染A组链球菌后血清中的抗体,结果显示该方法测定针对不同抗原的单克隆抗体特异性和灵敏度均较高。王亚丽等<sup>[28]</sup>针对金黄色葡萄球菌引起食物中毒,建立了一种金黄色葡萄球菌液相芯片检测方法,具有较高的灵敏度和特异性。Wiesinger-Mayr等<sup>[29]</sup>使用液相芯片技术对临床血标本中革兰阳性球菌、肠杆菌、非发酵菌和念珠菌等病原体进行了鉴定,发现该方法是快速鉴定相关病原体的有用工具。赵丽等<sup>[30]</sup>建立的空肠弯曲菌液相芯片检测方法,可快速检测食品中的空肠弯曲菌,具有灵敏度高、特异性强、重复性好等特点。

### 3.3 其它病原体或毒素的检测

王旺等<sup>[31]</sup>建立了一种能同时检测5种鼠传病原体:流行性出血热病毒、斑疹伤寒立克次体、鼠疫

耶尔森菌、恙虫病立克次体、钩端螺旋体的液相芯片多重检测方法,具有较高的灵敏度和特异性;液相芯片技术也可以快速地同时鉴定多种临床上重要的真菌<sup>[32]</sup>,这项技术具有简单、快速、特异性高、高通量并且可以在一个反应体系中进行多品种检测等特点。

Ros-García A等<sup>[33]</sup>用液相芯片技术检测牛梨浆虫,发现该方法特异性高、敏感性好,并且检测速度快,可以进行高效筛选。该方法可以显著提高梨浆虫的检测,从而更好地保护家畜贸易和促进预防控制程序。刘畅等<sup>[34]</sup>建立了可以同时高效、灵敏和特异检测猪囊尾蚴和华支睾吸虫的液相基因芯片方法,为人畜共患寄生虫的检测和监控提供了新方法。

生物恐怖是人类本世纪面临的一个重大挑战,徐华等<sup>[35]</sup>建立了包括蓖麻毒素B、肉毒梭菌毒素A、金黄色葡萄球菌肠毒素B及产气荚膜毒素ε在内的4种重要生物恐怖因子的多重液相芯片检测方法,结果证明是一种准确、灵敏、快速和高通量的检测方法,适合毒素的快速检测。

## 4 液相芯片技术的前景展望

病原微生物的快速检出在传染病的诊治中具有重要作用,并将对临床诊断产生积极影响。液相芯片技术用微球作为载体,荧光检测仪作为检测平台,可对蛋白质和核酸等生物大分子进行测定,具有高通量、快速、可靠、经济等特点,可实现临床对病原体检测的要求,能在突发公共卫生事件中起到高通量、快速检出的作用。但用到临床也有一定的局限,主要有:①配套的Luminex液相芯片分析仪和试剂较为昂贵,检测成本较高,制约了其临床应用;②目前获得CFDA批准用于临床诊断的项目或指标目前还比较少,不能满足临床诊断的需求;③实验操作的环节和步骤仍然较为复杂,实验影响因素较多,难以形成统一标准,实验结果共享受到限制;④序列信息的限制:目前与人类疾病相关的微生物的序列信息没有完全破解或公布,而液相芯片检测病原微生物以核酸序列为基础,应用就会受到一定的限制。

尽管如此,随着微流体技术、数字信号处理技术、光学信号处理技术及分子生物学技术研究的不断深入,在传染病诊断领域及应对突发公共卫生方面将会有更广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] LI K, WU K. Liquechip technology and its application in tear cytokine analysis[J]. Yan ke xue bao 2010; 25: 4-10.
- [2] HUI G, ZHAO Z. Progress in research on LiquiChip technology in biomedical engineering[J]. J Biomed Eng 2010; 27: 1406-1409.
- [3] 党亚丽,周亭屹,么春艳,等.食源性致病菌液相芯片高通量快

- 速检测技术的应用进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(8): 192-195.
- [4] LEBLANC N, LEIJON M, JOBS M, et al. A novel combination of TaqMan RT-PCR and a suspension microarray assay for the detection and species identification of pestiviruses[J]. Veterinary microbiology, 2010, 142: 81-86.
- [5] LEBLANC N, CORTEY M, FERNANDEZ PINERO J, et al. Development of a suspension microarray for the genotyping of African swine fever virus targeting the SNPs in the C-terminal end of the p72 gene region of the genome[J]. Transboundary and emerging diseases, 2013, 60: 378-383.
- [6] 袁静, 鲍琳琳, 魏强, 等. 用液相芯片方法同时检测流感病毒 H5N1 和 H7N9 亚型[J]. 病毒学报, 2015, 31(6): 607-614.
- [7] LAAMIRI N, FALLGREN P, ZOHARI S, et al. Accurate diagnosis of avian respiratory viruses using multiplex PCR-based Luminex suspension microarray[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(11): 2716-2725.
- [8] 朱余军, 烧丹, 丛锋, 等. I 群禽腺病毒液相基因芯片检测方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(6): 50-52.
- [9] 王洁, 王卫萍, 胡毓安, 等. 靶序列富集多重 PCR-液相芯片联合检测 4 种常见呼吸道病毒的初步应用[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(9): 958-963.
- [10] AKHRAS MS, PETERSSON E, DIAMOND L, et al. The Sequencing Bead Array (SBA), a next-generation digital suspension array[J]. PloS one, 2013, 8: e76696.
- [11] 张莉, 冷俊, 周晔, 等. 液相基因芯片技术在崇明地区人乳头瘤病毒检测和分型中的应用[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(17): 2548-2550.
- [12] CHEN Y S, LI H R, ZHANG W, et al. Development of a bead-based suspension array for the detection of pathogens in acute respiratory tract infections[J]. Experimental Biology and Medicine, 2016, 241(14): 1551-1558.
- [13] HINDSON BJ, REID SM, BAKER BR, et al. Diagnostic evaluation of multiplexed reverse transcription-PCR microsphere array assay for detection of foot-and-mouth and look-alike disease viruses[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46: 1081-1089.
- [14] 刘毓刚, 吴丽娟, 乔羲, 等. 流式液相芯片用于临床水痘-带状疱疹病毒检测及分型研究[J]. 临床检验杂志, 2015(9): 653-656.
- [15] 周有良, 胡春凌, 王萍, 等. 同时检测八种 HCV 亚型的方法研究[J]. 口岸卫生控制, 2015(6): 31-33.
- [16] 纪方晓, 陈济钊, 梁焕斌, 等. 猪戊型肝炎病毒液相蛋白芯片检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(1): 60-65.
- [17] 石莹, 田绿波, 樊学军, 等. 5 种重要虫媒病毒液相蛋白芯片多重检测方法的建立及应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2015(21): 3604-3607.
- [18] 李云峰, 石静, 马旭, 等. 基孔肯亚热、克里米亚-刚果出血热、裂谷热病毒核酸液相芯片检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2015(4): 229-234.
- [19] 尹伟力, 梁君妮, 林超, 等. 病毒性出血性败血症病毒液相芯片检测技术的建立[J]. 中国动物检疫, 2015(6): 64-68.
- [20] CARTER JM, LIN A, CLOTILDE L, et al. Rapid, Multiplexed Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) Isolates Using Suspension Array Technology[J]. Frontiers in microbiology, 2016, 7: 439.
- [21] 谭国浩, 谭翰清. 实时荧光 PCR 在食源性致病菌食物中毒应急处置中的应用[J]. 现代医院, 2016, 16(12): 1780-1782.
- [22] 董晓琳, 夏志平, 吴永魁, 等. 大肠杆菌 O157:H7 新型液相蛋白芯片检测方法的建立[C]. 中国畜牧兽医学会议论文集, 2015: 313.
- [23] LIANG DW, LU JH, WU Q, et al. Comparing the ability of luminex xMAP<sup>®</sup> salmonella serotyping assay and traditional serotyping method for serotyping salmonella isolated from southern Chinese population[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(6): 1668-1676.
- [24] 金玉娟, 陈应坚, 甘莉萍, 等. 应用液相芯片技术联合多重 PCR 快速检测四种常见食源性致病菌的研究[J]. 热带医学杂志, 2015(6): 735-740.
- [25] THIERRY S, HAMIDJAJA RA, GIRAULT G, et al. A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for Bacillus anthracis[J]. J Microbiol Methods, 2013, 95: 357-365.
- [26] CARLOS CA, TANG YW, ADLER DJ, et al. Mycobacterial infection identified with broad-range PCR amplification and suspension array identification[J]. J Cutan Pathol, 2012, 39: 795-797.
- [27] MARTINS TB, AUGUSTINE NH, HILL HR. Development of a multiplexed fluorescent immunoassay for the quantitation of antibody responses to group A streptococci[J]. J Immunol Methods, 2006, 316: 97-106.
- [28] 王亚丽, 蔡阳, 刘韬, 等. 金黄色葡萄球菌液相芯片检测方法的建立及应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(10): 1383-1386.
- [29] WIESINGER-MAYR H, VIERLINGER K, PICHLER R, et al. Identification of human pathogens isolated from blood using microarray hybridisation and signal pattern recognition[J]. BMC microbiology, 2007, 7: 78.
- [30] 赵丽, 蔡阳, 黄伟, 等. 应用液相芯片检测空肠弯曲菌[J]. 中国动物检疫, 2015(4): 79-83.
- [31] 王旺, 杨宇, 王静, 等. 新型液相芯片复合检测 5 种鼠传病原体方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2013, 36(4): 73-76.
- [32] LIAO MH, LIN JF, LI SY. Application of a multiplex suspension array for rapid and simultaneous identification of clinically important mold pathogens[J]. Molecular and cellular probes, 2012, 26: 188-193.
- [33] ROS-GARCIA A, JUSTE RA, HURTADO A. A highly sensitive DNA bead-based suspension array for the detection and species identification of bovine piroplasms[J]. Int J Parasitology, 2012, 42: 207-214.
- [34] 刘畅, 路义鑫, 杨朋欣, 等. 猪囊尾蚴和华支睾吸虫液相基因芯片检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2015(5): 387-391.
- [35] 徐华, 顾大勇, 胡春凌, 等. 四种重要生物恐怖毒素液相芯片多重检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2012, 35(3): 154-160.