

专家介绍

何农跃,男,1958年生,1997年在南京大学获博士学位(物理化学专业),东南大学生物电子学国家重点实验室(吴健雄实验室)教授,博士生导师;中南大学兼职博士生导师。2002—2006年曾任江苏省人民医院江苏省医学重点学科(实验室)临床生物学诊断和治疗实验室学科/学术骨干;主要研究领域为功能纳米材料的制备、表征和生物医学应用研究;系统提出与发展了基于纳米磁性颗粒的高通量单核苷酸多态性(SNP)和拷贝数变异(CNV)分析技术。主持和作为主要成员承担和完成 50 多项各种国家和省部级课题(国家 973、863、自然科学基金、九五科技部仪器攻关、江苏省高新技术、湖南省自然科学基金、全军医药卫生科研基金项目,广东省自然科学基金等),主持完成的国家自然科学基金项目“基因芯片 DNA 微阵列原位合成新方法及应用研究(60071032)”和“基于纳米磁分离和化学发光的烈性病原体 and 重组病原体信息高通量获取”(90606027)被评为国家基金委完成特别优秀的项目。2000 获教育部骨干教师资助计划资助。2001 年获东南大学吴健雄奖,2002 年入选教育部《跨世纪优秀人才培养计划》,2002 年被教育部遴选为全国高等学校优秀骨干教师。2002 年 4—5 月到瑞士苏黎世联邦理工学院(ETH)进行访问研究,2002 年 9 月—2003 年 9 月得到韩国 BK21 资助到汉城大学进行访问研究。先后应邀出席 20 余次国际学术交流会。在国内外核心期刊上发表论文 300 余篇,SCI 收录 300 余篇,他引 6 000 多次。第一发明人和共同获授权发明专利 50 余项,实用新型 40 多项。获省部级科技进步奖 7 项(第一完成人 5 项,其中 1 项为一等奖,4 项为二等奖)。两篇文章入选 2013 年中国科学技术信息研究所发布 2013 年中国学者百篇最具影响力国际学术论文;2015 年入选 Elsevier 发布的 2015 年中国高被引学者榜单(“生物医学工程”领域)。

基于封闭式卡盒的现场病原体检测系统的设计与实现

廖佩^{1Δ},陈慧^{1Δ},邬燕琪^{1,2},方壹乐¹,陈柱^{1,3},邓燕^{1,3},何农跃^{1,3*}

(¹东南大学生物电子学国家重点实验室,江苏 南京 210096;²中山大学中山医学院寄生虫教研室,广东 广州 510080;³湖南工业大学经济林培育与利用湖南省高等学校 2011 协同创新中心,绿色化学与与生物纳米技术应用湖南省重点实验室,湖南 株洲 412007)

[摘要] 目的:设计操作简单、成本低、便携和易于实现自动化等特点的小型化现场病原体检测系统,实现在传染病疫情爆发现场对传染病病原体的快速检测。方法:设计一款封闭式病原体检测卡盒,可进行一体化病原体核酸检测,并创新性地采用 3D 打印技术对该卡盒进行迭代设计和制造。在此基础上,研发与之配套的全自动便携式核酸检测系统,整套系统可自动化完成病原体核酸的单重检测或多重检测。结果:在卡盒和全自动便携式核酸检测系统设计完成后,分别对其进行各项性能的测试,如卡盒的气密性和移液性能,混匀性能等,测试结果均能满足病原体核酸检测的要求。以百日咳杆菌为代表,将整套系统应用于实际的病原体核酸检测,实验结果表明该卡盒系统可自动化完成核酸检测。结论:该系统能够成功地完成现场传染病从样本输入到结果输出的自动化一体化检测过程,实验结果准确可靠。

[关键词] 封闭式卡盒;现场检测;核酸检测系统;多重 PCR;3D 打印

[中图分类号] R318.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)02-139-10

doi: 10.7655/NYDXBNS20170202

[基金项目] 国家自然科学基金(61471168,61527806);中国博士后科学基金(2016T90403);经济林培育与利用湖南省高等学校 2011 协同创新中心[(2013)448]

*通信作者(Corresponding author),E-mail:nyhe1958@163.com

Δ共同第一作者

Design and implementation of an on-site pathogen detection system based on the enclosed cartridge

Liao Pei^{1Δ}, Chen Hui^{1Δ}, Wu Yanqi^{1,2}, Fang Yile¹, Chen Zhu^{1,3}, Deng Yan^{1,3}, He Nongyue^{1,3*}

(¹State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096; ²Department of Parasitology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080; ³China Economical Forest Cultivation and Utilization of 2011 Collaborative Innovation Center in Hunan Province, Hunan Key Laboratory of Green Chemistry and Application of Biological Nanotechnology, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412007, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a simple, low cost, portable and easy to realize automation pathogen nucleic acid detection system to meet the rapid on-site testing requirements. **Methods:** An enclosed cartridge was designed for integrated pathogen nucleic acid testing and creatively manufactured using 3D printing technology that speeded up the development cycle and saved the cost of the whole system. On this basis, a fully automatic portable system was developed, which now is able to automatically and integrately realize single or multiple nucleic acid detection. **Results:** Various tests of this instrument were carried out, including airtightness of cartridge and pipetting performance, blending performance, etc. All test results met the requirements of pathogen detection. At last, take pertussis for example, the practical applications of nucleic acid detection showed that the cartridge system can complete nucleic acid testing automatically. **Conclusion:** This system can successfully and automatically complete the integration testing process of infectious diseases from sample input to result output. The experimental results are accurate and reliable.

[Key words] enclosed cartridge; on-site detection; nucleic acid detection system; multiple PCR; 3D printing

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02): 139-148]

1 引言

传染病病原体的现场快速检测是防控传染病疫情的一项重要及有效措施,传统的全自动核酸样本检测与处理设备往往体积大,耗时长,处理流程较为复杂,可能导致患者错过最佳治疗时机。并且,在传染病疫情爆发初期,很难根据患者的症状确定是由哪一种病原体甚至哪几种病原体共同引起的^[1-3],这涉及到病原体的多重检测,在检测过程中需要对引发类似病理反应的病原体进行逐一排查^[4-5]。目前,国内外均对传染病的快速诊断研究做出了不少努力。

核酸是广泛存在于细胞核内的一种生物大分子^[6],检测方法多种多样,但检测原理都是使得目的 DNA 分子的存在以能检测到的信号方式呈现出来^[7],因此,核酸扩增技术是核酸分子检测的核心。随着现代分子诊断技术的发展,实时荧光定量 PCR 技术有了非常多的应用^[8],与常规 PCR 相比,荧光定量 PCR 技术在灵敏度、特异性方面具有很大优势,并且能有效解决 PCR 后开盖检测易污染的问题。在不断改进方法学的基础上,大量相关样品处理设备也适时出现^[9]。Cepheid 公司的 GeneXpert 系统是世界上第一个整合全自动样品制备和检测程序的实时定量 PCR 仪^[10],直接加入采样样品后,系统自动完

成样品裂解、核酸纯化浓缩、定量 PCR 扩增,同时荧光检测,最后直接输出分析结果,整个过程仅需要 30 min。集样本处理、核酸扩增检测一体化的封闭式卡盒设计,有效避免了样本制备过程中的失误和污染,使得该系统在敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值方面比常规培养法更具优势^[11],目前已能够检测全球 300 万遗漏的肺结核病例^[12]。美国 iCubate 公司研究开发了革新的扩增子拯救多重 PCR 技术 ARM-PCR,成功解决了靶点不兼容的问题^[13-14],并创新性地设计了一次性全封闭卡盒,以及配套的卡盒处理仪、卡盒阅读仪和控制软件,整合成为现在的 iCubate 全自动多重微生物核酸检测系统。

基于以上现状,本文根据现场传染病检测的特点和要求,设计了一种封闭式的检测卡盒,并基于该卡盒自主研发了与之配合的便携式现场传染病病原体一体化检测系统。该系统采用实时荧光多重 PCR 技术,可以独立完成病原体检测的全流程。

2 封闭式的检测卡盒设计

虽然核酸检测的实现载体和平台各有不同,但自动化、小型化、一体化以及安全性一直是国内外学者共同的目标。应用于现场的检测系统多数采用了以卡盒或者与卡盒类似的装置为载体,结合与之

相应的自动化系统来完成现场检测^[15-19]。卡盒的优势在于,它将实验试剂均包含在一个小型器件内,实验所需反应均在此器件内完成,从而极大降低甚至避免了实验污染。然而,商用仪器的卡盒均是一次性使用的,检测的成本除了试剂,更多的是在卡盒身上。卡盒内部结构复杂,零部件较多,加工难度大,导致单个卡盒成本较高,难以普及。因此,本课题组采用微量移液的方法,运用 3D 打印技术设计了一种结构简单的滑片式检测卡盒。

2.1 病原体的检测方法

应用于病原体的现场检测方法必须稳定高效,步骤简洁,本课题结合课题组原有研究基础,采用核酸分子检测技术进行病原体检测。病原体的核酸检测主要有 3 个流程:样本核酸的提取,核酸扩增,核酸检测^[20-21]。其中最复杂也最重要的一个环节就是核酸的提取和纯化,传统的制备方法有 CTAB 法^[22]、SDS 法^[23]、碱裂解法^[24]、煮沸法^[25]、苯酚法^[26]等,但这些都只限于手工提取,且有诸多弊端。随着纳米材料的日新月异,基于磁分离的核酸提取技术出现了^[27-30]。磁珠法核酸提取的流程如图 1 所示,与传统方法相比之下,既简单高效又易于实现自动化。并且,本课题组在磁珠法核酸提取方面有大量前期累积经验^[31-34]。

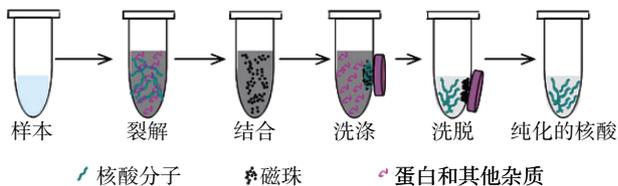


图 1 磁珠法核酸提取步骤

Figure 1 Nucleic acid extraction steps of magnetic beads method

核酸的扩增和检测方法直接影响到病原体现场检测的准确性,因此,选择实时荧光 PCR,这种方法具有高灵敏度,其探针法具有高特异性,并且可以直观显示检测结果。当需要对单一样本的多种病原体或者多个基因进行检测时,多重荧光 PCR 就可以很好地解决这个问题。它将实时荧光 PCR 技术和多重 PCR 技术相结合,在 PCR 体系中加入多组引物和探针,针对不同荧光基因标记的探针不同,检测时使用不同的光路检测通道。

2.2 3D 打印技术的应用

3D 打印在医疗器械开发方面有突出的优势,它可以把数据化图纸化的仪器设计结构直接快速地转化为现实模型,让医疗器械生产商能够将产品以

前所未有的速度推向市场。比起传统的开模制造,3D 打印不仅省时省力、节约成本,更是可以加快仪器开发的速度。因此,本课题中检测卡盒的设计前期均采用 3D 打印技术,将每次设计修改后的模型快速打印出来进行实验,再修改再实验,经过不断的迭代设计,形成最终符合检测需求的卡盒。

2.3 核酸检测卡盒的设计

2.3.1 核酸提取的流程

实验流程分为两大部分:核酸提取和多重实时荧光 PCR 检测。核酸提取部分与上文中介绍的手动磁珠法核酸提取类似,只是在卡盒中,试剂是预先存放在试剂槽中的,采用移液的方法对试剂进行操作。流程如下:①样本加入到盛有裂解液的液槽中,用吸液头吹打混匀;②裂解完成后,从盛有磁珠和结合液的试剂槽中将磁珠与结合液的混合液移至裂解液槽中,吹打混匀;结合完成后,磁铁在裂解液槽外进行磁分离,用吸液头将废清液移回至磁珠和结合液的试剂槽,移开磁铁;③将清洗液 I 移至裂解液槽中,吸液头吹打混匀,第 1 次清洗完成后,磁铁进行磁分离,吸液头将废清液移回至清洗液 I 的试剂槽中,移开磁铁;④将清洗液 II 移至裂解液槽中,吸液头吹打混匀,第 2 次清洗完成后,磁铁进行磁分离,吸液头将废清液移回至清洗液 II 的试剂槽中,移开磁铁;⑤将洗脱液移至裂解液槽中,吸液头吹打混匀,磁铁进行磁分离,清液即为分离纯化好的样本核酸。

在多重荧光 PCR 检测部分,试剂也是预先装好的,为了防止 PCR 反应过程中试剂的蒸发,采用矿物油密封试剂,同时还可以降低污染风险。流程接上:⑥将提取纯化好的核酸依次加入到多重检测的试剂槽;⑦再向每个反应试剂槽中加入矿物油,密封试剂。

2.3.2 卡盒的结构设计

根据设计的实验流程,本文设计了封闭式的检测卡盒,整个卡盒的 3D 打印件有 7 件:卡盒主体、扣盖、试剂槽固定模块、压片、套筒、二通件、压盖等,组装过程可以在 1 min 内完成,组装后的三维效果图以及实物图可见本课题组发表的文章^[35]。套筒、二通件、压盖配合弹簧和吸液头组成卡盒内的移液模块。移液模块与滑片相对固定,移液模块在水平轨道上移动可带动滑片在卡盒主体内的 U 型轨道上滑动并保持卡盒的封闭性。实验室常用的 1.5 mL 离心管和 0.2 mL 离心管固定在试剂槽固定模块中,并用压片加固。实验试剂可预封装入离心

管中,将卡盒的各零部件组装好后,配合外部驱动可自动化完成封闭环境中的病原体核酸检测。

卡盒耦合外部驱动的示意图如图 2 所示,二通件连通液路驱动系统,下方的第 1 个 1.5 mL 离心管用于进行核酸提取的磁分离和加热操作,最后 3 个 0.2 mL 离心管则进行实时荧光 PCR,包括热循环扩增和荧光检测,卡盒的主体耦合外部固定结构。

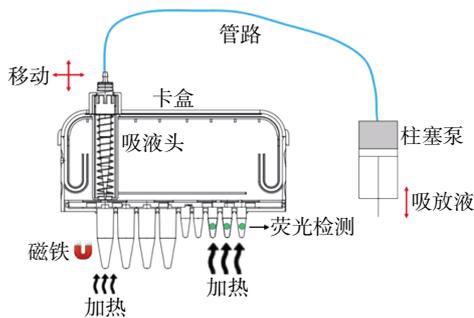


图 2 卡盒外部驱动耦合示意图

Figure 2 Diagram of the cartridge's external drive coupling

2.4 卡盒性能测试

完成检测卡盒的设计后,卡盒的一些关键性能需要验证。

2.4.1 移液模块气密性和移液性能

气密性是移液模块能正常移液的基本保证。气密性的测试通常将吸液头吸入满量程的液体并垂直悬停 15 s 内无漏液现象,认为该移液器的气密性合格。结合外部的液体驱动系统柱塞泵及相应管路,与移液模块中的二通件配合,二通件的另一端接入吸液头,放入灭菌过的蒸馏水中,柱塞泵抽取 200 μ L 蒸馏水,取出二通件和吸液头,垂直悬停 15 s,观察是否有液珠滴落。

使用称重法进行移液操作的性能测定,检测平台如图 3 所示,使用专门用于移液器校准的十万分之一电子天平(AD4212B-101-PT,AND 公司,日本),其他实验器材还包括卡盒移液模块的二通件,柱塞泵系统,待测液体和试剂槽,一次性吸液头等。

气密性实验过程中无液珠滴落,也无液体在吸液头尖部聚集,表明所设计的卡盒的移液模块气密性良好,满足实验要求。移液实验测试了 5 个量程的体积,200、100、50、10、2 μ L,每个量程重复测量 10 次。根据该结果计算出卡盒内移液模块的移液操作的相对误差和重复性,并和国标 JJG 646-2006 中的对应检定点的性能要求进行对比(表 1)。结果表明,卡盒移液模块的移液相对误差和重复性均远小于国标要求,说明移液模块的移液性能满足国标的最低要求,并且移液精度远高于国标。因此,卡盒内



图 3 移液性能测试平台

Figure 3 Pipetting performance test platform

表 1 卡盒移液性能与国标对比

Table 1 Pipetting performance compared with national standard

标称值	平均值	相对误差差 \leq (%)	重复性 \leq (%)	计量性能要求	
				相对误差差 \pm (%)	重复性 \leq (%)
200	200.423	-0.21	0.19	1.5	1.0
100	100.767	-0.76	0.77	2.0	1.0
50	50.678	-1.34	0.22	3.0	1.5
10	10.174	-1.71	2.30	8.0	4.0
2	2.043	2.15	4.83	12.0	6.0

的移液模块满足核酸检测实验的需要。

2.4.2 混匀性能

卡盒内的试剂混匀是利用柱塞泵系统进行吸放液操作完成的,混匀效果与吸放液的速度和次数有关。我们发现吸放液速度越快,混匀效果越好,但是,速度过快却会使得吸液头内的气压不平衡,导致吸液头内的液体无法完全排除,累积起来甚至会超出吸液头的量程,沾湿滤芯。为了确定合适的吸放液速度,搭建了如图 4 所示的实验平台,其中,在离心管 1~5 内分别加入 100 μ L 裂解液和 50 μ L 的大肠杆菌样本、150 μ L 磁珠和结合液、200 μ L 清洗液 I、200 μ L 清洗液 II、100 μ L 洗脱液,选用 100 μ L 的体积进行吸放液。

实验中按照磁珠法核酸提取的流程进行混匀操作,待管 1 中裂解完成,吸接管 2 中磁珠和结合

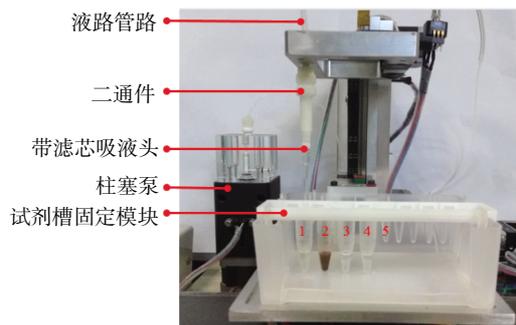


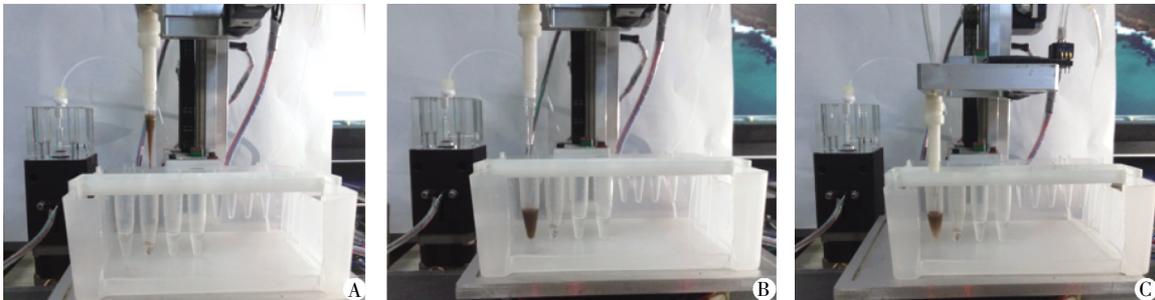
图 4 混匀性能测试平台

Figure 4 Blending performance test platform

液的混合液加入到管 1 中,用适当的速度吸放液混匀,结果如图 5 所示。

结合结束后进行磁分离,此时磁珠呈团聚状态,如图 6 所示,吸走上清液,撤磁,从管 3 中吸取

清洗液 I 到管 1 中,用适当的速度吸放液混匀;两次清洗结束后再次进行磁分离,吸走清液,撤磁,然后从管 5 中吸取洗脱液到管 1 中,用适当的速度吸放液混匀。



A:吸取磁珠和结合液的混合液;B:加入到离心管 1 中;C:结合混匀。

图 5 磁珠与核酸结合过程

Figure 5 Combining processes of magnetic beads and nucleic acid

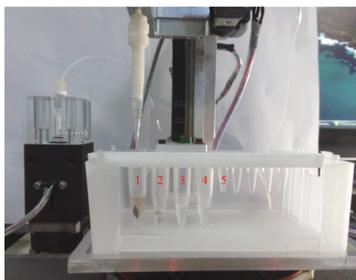


图 6 磁分离后磁珠团聚

Figure 6 Reunited magnetic beads in magnetic separation process

同时,为了测试合适的吸放液次数,在磁珠清洗过程中,测试了分别吸放液 5、10、20、30 次混匀效果。结果如图 7 所示,可以看到,磁珠只需吸放液 20 次便可完全在溶液中分散开。

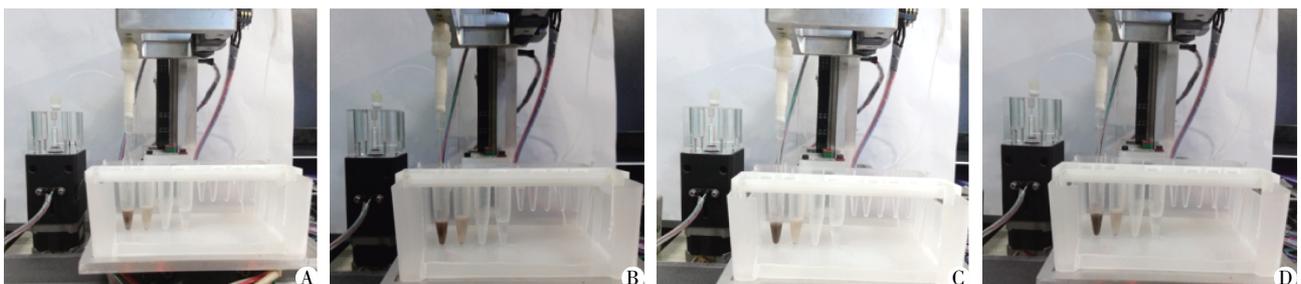
3 基于封闭式卡盒的核酸检测系统设计

为了实现核酸的自动检测,卡盒还需要与之配套的自动化驱动系统。结合现场检测的需求和卡盒外部驱动要求,设计研发了现场病原体检测系统。

3.1 系统的整体设计

本系统的设计采用方法带动设备的方式,因此,结合卡盒的结构设计,有了如图 8 所示的设计路线。卡盒内的实验需求和自动化仪器的需求一一对应,包括试剂转移,核酸提取,核酸扩增,荧光信号采集到最后的实验结果的显示分析,对应着仪器设计中的移液控制模块,磁分离加热模块,循环加热模块,荧光扫描模块以及控制软件。卡盒放入仪器后,通过对这些模块的自动化控制来完成实验所需的操作。其中控制软件可以独立于仪器整体结构的设计,先行分析需求设计界面和功能,最后配合硬件控制设计,实现实时的检测和结果分析。

如图 9 所示是该系统机械模块组装三维图和实物图。核酸检测前,由磁分离加热模块和循环加热模块固定卡盒的底座,再通过上层底板上的固定模块固定卡盒主体。核酸检测时,移液控制模块转移液体,混匀使液体相互反应,到磁分离过程磁分离模块将磁珠贴壁团聚,移液控制模块移走液体。晾干和洗脱时,控制磁分离加热模块中的加热部件



A:5 次;B:10 次;C:20 次;D:30 次。

图 7 不同吸放液次数的混匀效果

Figure 7 Different blending effects of different blending time

给离心管加热。核酸提取完成后,将纯化好的核酸加入到待测的 PCR 管中,移矿物油密封。控制循环加热模块和荧光扫描模块进行实时荧光 PCR。

3.2 软硬件控制设计

3.2.1 硬件控制设计

核酸检测实验主要分为核酸提取和实时荧光 PCR 扩增检测两部分,这两部分的操作步骤又可细分为移液,磁分离,加热,循环加热,荧光扫描等几个动作,因此我们针对这几个动作分别设计了对应的实现模块:①移液控制模块,负责 X 轴移动、复位, Y 轴移动、复位,吸放液、吸放液复位;②磁分离加热模块,负责磁铁移动、金属浴加热;③循环加热模块,负责温度控制、散热、温度采集;④荧光检测

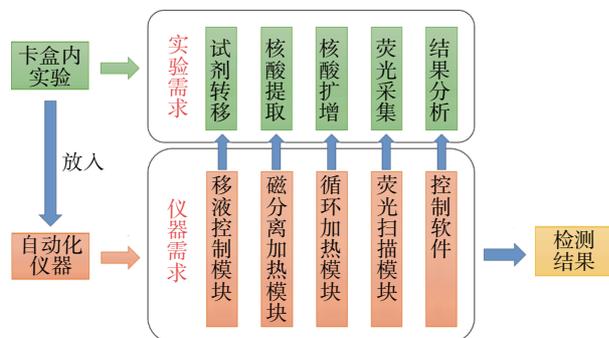
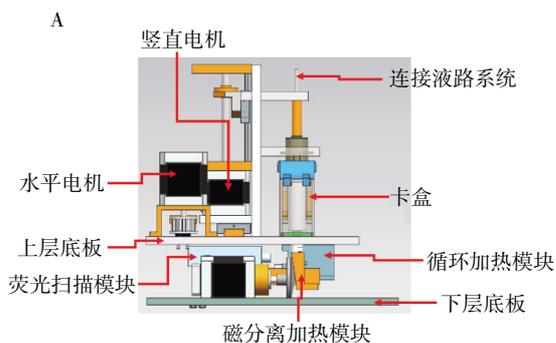


图 8 核酸检测系统设计路线

Figure 8 Design route of nucleic acid detection system



B

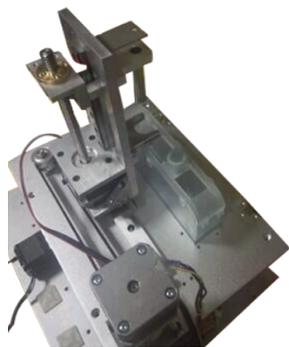
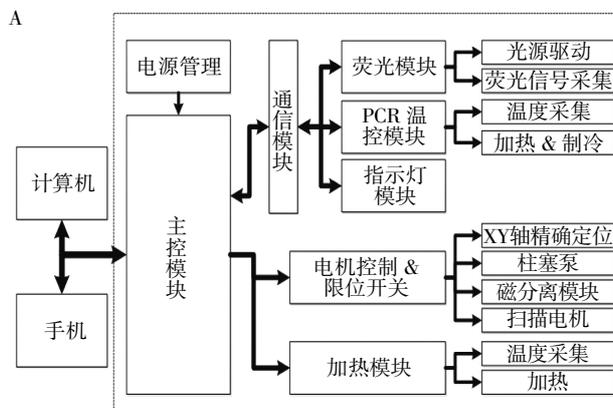


图 9 系统机械模块组装三维图(A)和实物图(B)

Figure 9 Three-dimensional diagram(A) and real diagram(B) of system mechanical module assembly

模块,负责激发光源、信号检测、检测孔扫描、扫描复位;⑤其他模块,负责供电、状态指示、开关、通讯等。整个系统的电路控制框图以及电路控制板如图 10 所示。



B

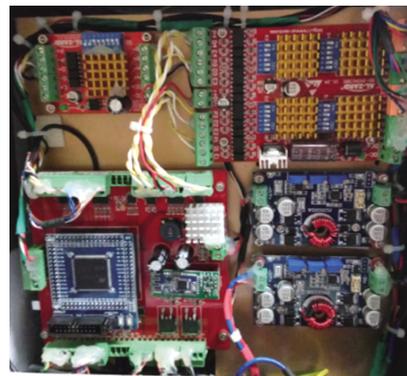


图 10 核酸检测系统的电路控制框图(A)和电路控制板(B)
Figure 10 Control circuit diagram(A) and circuit panel(B) of nucleic acid detection system

3.2.2 软件控制设计

现场检测仪器要求操作简单方便,因此软件的设计要提供简洁友好的操作界面,并提供完成核酸检测的全部功能。本系统通过蓝牙实现上下位机通讯,由上位机软件完全控制下位机的硬件电路。软件的需求分为实验控制和数据管理两大部分,前者负责实验的流程控制与 PCR 曲线的实时显示,后者负责实验数据的处理与分享。本软件采用面向对象的编程语言 C#, 在 Microsoft Windows 10 操作系统上完成开发,主界面如图 11(A)所示。在实时荧光 PCR 的过程中,右下方区域将显示实时扩增曲线或熔解曲线,如图 11(B)所示。

3.3 系统总体构成

将整个系统组装集成后,得到实物图如图 12 所示,配合上位机控制软件、移液器等所需配件,即可在现场进行核酸检测实验。实验操作流程如下:使用移液枪将样本添加到卡盒中,用连接电脑的扫

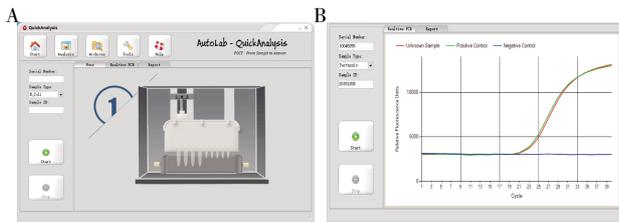


图 11 核酸检测控制软件主界面(A)和实时荧光 PCR 界面(B)
Figure 11 Main interface of control software (A) and real-time fluorescent PCR interface (B)

扫描枪扫描卡盒上的条形码或者二维码,软件将自动配置相应的实验参数,接着根据软件画面提示,把卡盒固定在主体设备中后关上门,控制软件开始实验。实验过程中电脑画面将动态显示实时的 PCR 曲线以及熔解曲线,实验完成后,软件自动生成检测报告。整个的主体设备组装后的重量为 6.5 kg,长宽高 27.0 cm × 27.5 cm × 25.0 cm,小巧美观。使用手机端软件控制时更加方便。



图 12 核酸检测系统总体构成
Figure 12 Overall composition of nucleic acid detection system

4 核酸检测系统性能验证

4.1 磁分离加热性能

在 1 个离心管中加入 500 μL 的磁珠混合液体,放在加热支座上,驱动永磁铁从下往上到离心管锥形部分的最高点,停留 3 s 后向下移动到靠近离心管底部,整个过程历时 8 s,磁分离效果如图 13 所示。从图中可以看出,磁分离后液体基本澄清,无明显游离的磁珠颗粒。

核酸提取温度的控制要求是 1.5 min 内升温到 65 $^{\circ}\text{C}$ 温度保持精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。实验中,由于洗脱液的体积一般设置为 100 μL ,因此在离心管中加入 100 μL 的蒸馏水,洗脱时无离心管盖,让加热块给加热支座升温,温度传感器采集温度,实时温度曲线如图 14 所示。从图中可以看出,从室温升到 65 $^{\circ}\text{C}$ 所需的时间大概是 90 s,保温阶段最大的温度变化是 $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$,达到温度控制的要求。

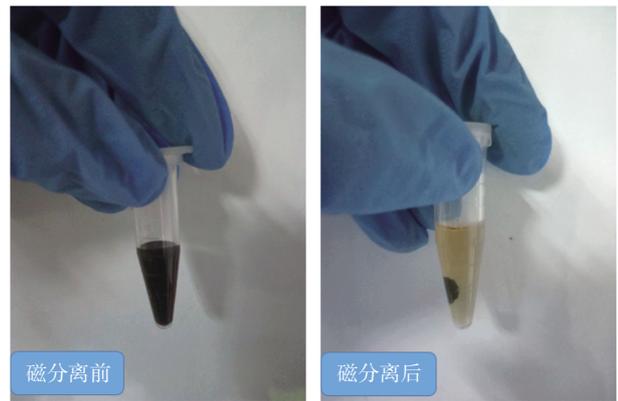


图 13 磁分离前后效果对比
Figure 13 Effect contrast of magnetic separation before and after

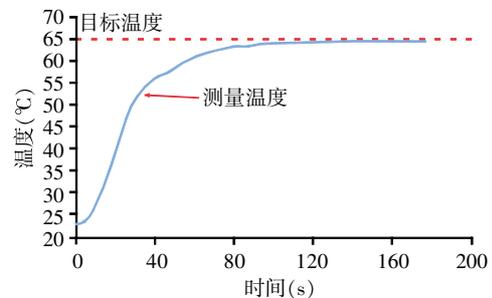
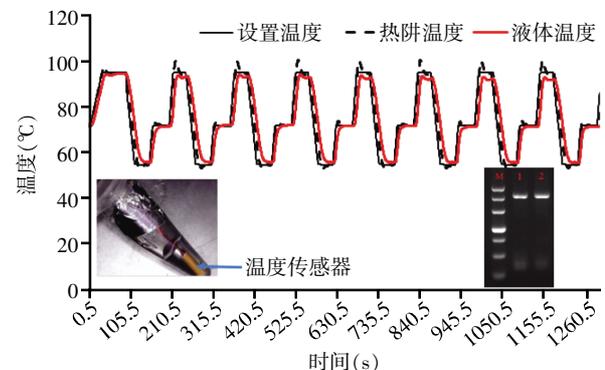


图 14 加热效果曲线
Figure 14 Heating effect curve

4.2 温度循环性能

系统中温度传感器检测的不是试剂的实际温度,而是热阱的温度,因此温度控制的时候需要对温度和时间进行一定的补偿,补偿后的温控效果如图 15 所示,曲线说明液体的实际温度和设置的目标温度的跟随性比较好。实验中使用了如图 15 左下角所示温度传感器检测液体温度。同时,在热阱



条带 M: 500 bp 的 marker; 条带 1: 在温度循环模块中进行的 PCR 产物条带; 条带 2: 在商用 PCR 仪上进行的 PCR 实验产物条带。
图 15 温度循环模块温度控制曲线
Figure 15 Temperature control curve of temperature cycle module

中放置一管配有 PCR 试剂的 PCR 管, 进行标准的 PCR 实验。PCR 实验结束后, 通过琼脂糖凝胶电泳对 PCR 后的产物进行分析, 电泳图如图 15 右下角所示, 可以看出, 温度循环模块的 PCR 扩增条带亮度和商用仪器没有很大差别, 说明温度循环模块可以进行 PCR 扩增。

4.3 荧光扫描性能

4.3.1 单孔扫描性能

在循环热模块中放入 1 管含有荧光探针的 PCR 试剂进行 PCR 热循环, 同时荧光部件对准检测孔, 开启一路 LED 光源, 实时检测 PCR 过程中的荧光值, 整个 PCR 循环进行 40 个循环。得到荧光信号的曲线图如图 16 所示, 红色标记的点是每个循环中采集到的荧光信号最大值点。从图中可以看出荧

光部件采集到的荧光信号和 PCR 循环过程中产生的荧光信号是一致的, 每个循环的峰值连成的曲线即实时荧光 PCR 的扩增曲线, 说明荧光扫描部件可以完成单孔实时荧光 PCR 的检测。

4.3.2 三孔扫描性能

对三孔进行单路荧光扫描检测, 得到荧光信号的曲线图如图 17 所示。扫描过程共采集 260 个点, 为了减少数据处理量, 将 3 个孔对应的点区间分别限定在 40~70、120~150、200~210 之间。从图中可以看出, 整个扫描过程中波峰值只出现 3 个, 经过区间数据处理很容易找到对应孔的荧光信号值, 在循环结束后即形成相应的扩增曲线。这表明荧光扫描模块可在实时荧光 PCR 过程中对卡盒的三管 PCR 试剂进行扫描检测。

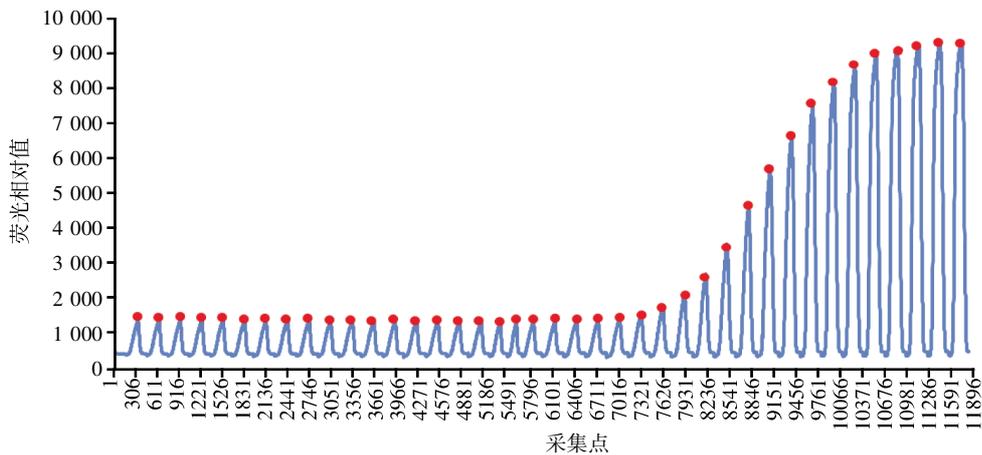


图 16 单孔扫描测试荧光曲线图

Figure 16 Single hole scanning fluorescence test curve

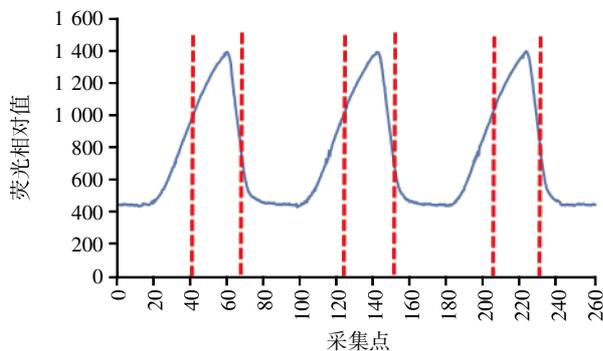


图 17 三孔扫描测试荧光曲线图

Figure 17 Three hole scanning fluorescence test curve

4.4 核酸自动化检测实验

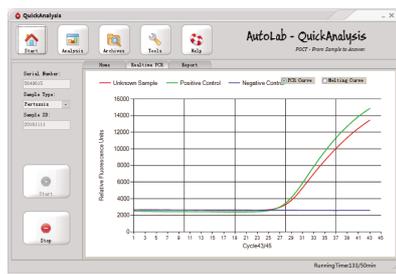
各性能测试通过后, 在系统上进行核酸检测实验。根据卡盒内的核酸检测流程, 将所需试剂按照顺序预装载入卡盒中, 核酸提取试剂采用本实验室生化组同学自主研发的核酸提取试剂盒, 实时荧光

PCR 试剂来自上海之江生物科技有限公司的百日咳探针法实时荧光 PCR 试剂盒, 样本取自试剂盒中百日咳杆菌阳参。取一定量百日咳杆菌阳参用 TE 缓冲液稀释 1 000 倍, 取 50 μ L 稀释后的阳参加入裂解液中, 用锡箔纸密封离心管口, 组装好卡盒后将卡盒放入系统中, 并根据试剂盒提供的实验参数在软件中进行相应的配置, 启动实验, 系统自动化完成实验。

3 个 PCR 管分别对应未知样本, 阳性对照, 阴性对照, 实验的扩增曲线、检测报告和 Ct 值结果如图 18 所示。从该扩增曲线结果看, 系统可以实现自动化核酸提取和实时荧光 PCR 检测。

5 总结

本研究利用 3D 打印技术, 设计并制作了封闭式的检测卡盒, 对其的一些重要性能进行实验测



Test report

Serial Number: 5649615
Sample ID: 20161111 Sample Type: Pertussis
Test Time: 2016-01-11 20:39:59 Test Method: Realtime PCR
Reference Result: Rositive

Result

	Unknown Sample	Positive Control	Negative Control
Ct	29.5	29.22	0

图 18 核酸自动化检测实验结果

Figure 18 Results of automatical nucleic acid testing experiment

试,包括移液的气密性,移液精度,以及混匀性能。实验证明,卡盒设计的气密性和移液精度满足核酸检测过程中的移液要求,尤其是添加提取好的核酸到 PCR 体系中时;通过合适的吸放液体积,速度和次数,卡盒的二通件和洗液头可以很好地混匀试剂。在卡盒的基础上,本课题组研发了全自动便携式的核酸检测系统,包括机械、硬件和软件上的设计,接着对系统各个模块的性能进行了包括磁分离、温度循环和荧光检测在内的测试实验,并进行了自动化的核酸检测实验。实验结果表明,系统的各模块均满足实验需求,系统可以实现自动化的核酸检测实验。

本系统针对传统传染性病原体的检测过程分散、繁琐、实验操作复杂、对环境敏感等缺点,开发了具有操作简单、成本低、便携、一体化和自动化等特点的全自动便携式核酸检测系统,能够成功地完成现场传染病从样本输入到结果输出的自动化一体化检测过程,实验结果准确可靠。

[参考文献]

[1] Cobo ER,Chadee K. Antimicrobial human defensins in the colon and their role in infectious and non-infectious diseases[J]. Pathogens,2013,2(1):177-192
[2] Borchert M,Mutyaba I,Kerkhove MDV,et al. Ebola haemorrhagic fever outbreak in Masindi District,Uganda;outbreak description and lessons learned[J]. BMC Infectious Diseases,2011,11(1):357
[3] Black RE. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens[J]. Rev Infect Dis,

1990,12(Suppl 1):S73-S79
[4] 何长龙. 感染性腹泻常见 6 种病原体研究进展[J]. 重庆医学,2011,40(34):3511-3513
[5] 洪因之,章根华,刘世科. 宁海县感染性腹泻病原体及流行特征调查[J]. 上海预防医学,2011,23(11):536-538
[6] 怡 然. 核酸的发现与 DNA 的应用[J]. 中国保健食品,2008,3:66-67
[7] 王 蕊,张改平,乔松林,等. 猪 IFN-8 和 IRF-3 基因实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 河南农业科学,2012,41(5):137-140,144
[8] 陈凤华,孙建华,马盈盈,等. 实时荧光定量 PCR 技术在病原体快检中的研究进展与应用[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2013,(23):11004-11006
[9] 张博博. 基于磁分离的全自动核酸工作站的软件设计与实现[D]. 南京:东南大学,2013
[10] Niemz A,Ferguson TM,Boyle DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases[J]. Trends Biotechnol,2011,29(5):240-250
[11] 陈 旭,董丹凤,韩立中,等. GeneXpert 实时荧光定量 PCR 快速检测艰难梭菌的临床评估[J]. 检验医学,2014(6):590-592
[12] Giang do C,Duong TN,Ha DT,et al. Prospective evaluation of GeneXpert for the diagnosis of HIV- negative pediatric TB cases[J]. BMC Infect Dis,2015,15(1):1-10
[13] Buchan BW,Reymann GC,Granato PA,et al. Preliminary evaluation of the research use only (RUO)iCubate iC-GPC assay for the identification of select gram positive bacteria and their resistance determinants in blood culture broths[J]. J Clin Microbiol,2015,53(12):3931-3934
[14] Lachance D. American pie [J]. Huntsville R and D Report,2012,66(7):544-549
[15] Safavieh M,Ahmed MU,Sokullu E,et al. A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection [J]. Analyst,2014,139(2):482-487
[16] Qiu X,Chen D,Liu C,et al. A portable,integrated analyzer for microfluidic based molecular analysis[J]. Biomed Microdevices,2011,13(5):809-817
[17] Chen D,Mauk M,Qiu X,et al. An integrated,self-contained microfluidic cassette for isolation,amplification, and detection of nucleic acids[J]. Biomed Microdevices,2010,12(4):705-719
[18] Poritz MA,Blaschke AJ,Byington CL,et al. FilmArray,an automated nested multiplex PCR system for multipathogen detection;development and application to respiratory tract infection[J]. PLoS One,2011,6(10):e26047
[19] Goldmeyer J,Li H,McCormac M,et al. Identification of Staphylococcus aureus and determination of methicillin

- resistance directly from positive blood cultures by isothermal amplification and a disposable detection device[J]. *Jo Clin Microbiol*, 2008, 46(4): 1534–1536
- [20] Agarwal N, Chatterjee K, Coshic P, et al. Nucleic acid testing for blood banks: An experience from a tertiary care centre in New Delhi, India [J]. *Transfus Apher Sci*, 2013, 49(3): 482–484
- [21] Niemz A, Ferguson TM, Boyle D S. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases[J]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(5): 240–250
- [22] 左瑞娟, 周雨滋, 李丽娟, 等. CTAB 法用于染病烟草植株中烟草丛顶病毒 RNA 的提取 [J]. *云南农业大学学报(自然科学版)*, 2011, 26(1): 26–29
- [23] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 33(1): 17–20
- [24] Süss J. Use of acid, alkali and enzymes for the extraction of nucleic acids from pollen [J]. *Biologia Plantarum*, 1970, 12(5): 332–341
- [25] 范公忍, 韩聚强, 胡学玲, 等. 两种核酸提取方法对血清 HBV DNA 荧光定量检测结果的影响 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(9): 2110–2114
- [26] Wecker E. The extraction of infectious virus nucleic acid with hot phenol[J]. *Virology*, 1959, 7(2): 241–243
- [27] Levison PR, Badger SE, Dennis J, et al. Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification[J]. *J Chromatogr A*, 1998, 816(1): 107–111
- [28] Adams NM, Bordelon H, Wang KK, et al. Comparison of three magnetic bead surface functionalities for RNA extraction and detection[J]. *ACS Appl Mater Interface*, 2015, 7(11)
- [29] Kalina WV, Douglas CE, Coyne SR, et al. Comparative assessment of automated nucleic acid sample extraction equipment for bioterror agents [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(4): 1232–1234
- [30] Sun H, Zeng X, Liu M, et al. Synthesis of size-controlled Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles for nucleic acid analysis[J]. *J Nanosci Nanotech*, 2012, 12(1): 267–273
- [31] Chen Y, Lin J, Jiang Q, et al. A magnetic nanoparticle based nucleic acid isolation and purification instrument for DNA extraction of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *J Nanosci Nanotech*, 2016, 16(3): 2296–2300
- [32] Wu Y, Chen H, Chen Z, et al. Multifunctional device for nucleic acid extraction based on magnetic separation and its Co-working with liquid handling system for high throughput sample preparation [J]. *J Nanosci Nanotech*, 2016, 16(7): 6919–6924
- [33] He N, Wang F, Ma C, et al. Chemiluminescence analysis for HBV-DNA hybridization detection with magnetic nanoparticles based DNA extraction from positive whole blood samples [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, 9(2): 267–273
- [34] 李云龙. 明确思路-搭建平台-全面加强药品医疗器械检验检测系统能力建设-在 2009 年全国药品医疗器械检验检测工作座谈会上的总结讲话 [J]. *中国药事*, 2009, 23(9): 847–849
- [35] Chen H, Wu YQ, Chen Z, et al. From sample to answer: A low-cost disposable cartridge for epidemic detection on site based on 3D printing technology [J]. *Nanosci Nanotech Lett*, 2016, 8(12): 1118–1126

[收稿日期] 2016–12–23