·综　　述·　　DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2018.21.045

微流控技术在病原微生物检测中的应用*

郝良玉[1,2]，曲　晗[2]，李志萍[2]，王习文[2]，王宇田[2]，孙　瑞[2]，崔煜菲[1]综述，夏志平[1,2]△，李乾学[2]▲审校
（1.吉林农业大学动物科学技术学院，吉林长春 130118；2.军事兽医研究所，吉林长春 130062）

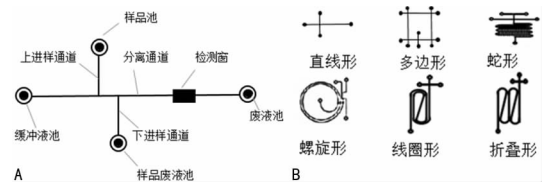
关键词：微流控；　微通道；　病原体
中图法分类号：R446.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1672-9455(2018)21-3299-04

随着当今社会经济的飞速发展，传统的病原微生物检测方法已经不能满足现代的需求。传统的菌落培养和血清学检测方法不仅费时、费力，而且只能局限在实验室中操作，而基于抗原抗体的酶联免疫吸附试验（ELISA 法），因其容易出现假阳性检测结果，尽管方法简便但并不适用于精准分析。目前实验室常见的聚合酶链式反应（PCR 法），因其具有检测范围广、明暗度较高、特异性强等特点受到欢迎，但实验所需设备沉重，并不适用于现场快速检测。因此，需要探寻一种新型技术，以达到适应现场、精准检测、快速研判的目的。

1　芯片实验室研究进展

微流控技术是一种交叉学科技术，在微尺度管道（5～500 μm）内操控微小体系流体（10^{-9}～10^{-18} L）的新型科学研究平台，经过数余年的发展，现已成为生化分析中的一个独立领域。在微流控平台上，可以针对液体或气体、流体进行微升、纳升甚至皮升级的生物化学反应，能极大降低试剂的消耗量（至少 2～3 个数量级）[1]。微流控芯片，简单来讲就是指待检测样品在一个小的实验室装置中连续完成样品核酸的提取、纯化、PCR、跑胶等过程而不需要人为的外在干预。微流控芯片作为当今生物医学领域研究的前沿和热点可以集中地将实验室功能转移到芯片上，把原有大型检验仪器微型化制成可完成生化等分析的便携式仪器。

微流控芯片技术是在芯片毛细管电泳基础上发展起来的，通过微加工手段在金属、硅、玻璃、高分子聚合物等材质的基片上，加工出微米级别的流体通道、检测室等微结构单元，从 20 世纪 90 年代起，微流控技术被多数人定义为一种分析化学平台进而逐步快速发展。我国微流控研究起步较晚，但经过十多年的发展，微流控技术也已走向成熟。2000 年以后，随着微流控芯片的深入研究，这种技术逐渐得到学术界和产业界更高层次和更大范围的认可。同时，这项技术作为微量流体亚毫米级别尺寸上的一种精确操控技术，将生物学与化学上所需的基本操作单位结合在小型芯片上。这种芯片多由储液池和微通道构成，微通道包括有入口、主通道、辅助通道（侧流通道）和出口。根据不同需要设计的入口和出口可以满足不同流体的导入与导出。流体性质的样品从入口进入，在主通道发生分离、混合和反应[2]。作为实现微流控功能的主要部分，主通道需要根据具体功能设计结构和尺寸。结构最简单的通道是平面型通道，见图 1[3]，图 1A 为双 T 形微流控芯片结构简图，图 1B 为常见的微通道布局包括了直线形、多边形、蛇形、螺旋形、线圈形、折叠形，需要混合不同流体时则常常采用二维或三维结构。相比而言三维结构需要通过提供更强的动力来完成混合，制作工艺也更为复杂。微通道可由石英、硅、玻璃等材料制作，不同材料的利弊及适用场所也有所不同。玻璃是一种成本低、透光性强、绝缘性和强度好的材料[4]，可以及时观察微通道内流体状态，适合通常的样品分析。晶体硅制作的微流控器件有着散热性强，与其他电子元件交互性好的优势，但硅的绝缘性和透光性较差、硅片间黏合率低等缺点影响了硅的应用。目前，高分子聚合材料因其成本低、易于加工和批量生产，制作过程简单而多用于较复杂通道的制备，其中以聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）和环状烯烃共聚高分子（COC）最受欢迎。



注：A 为双 T 形微流控芯片结构简图；B 为常见的微通道

图 1　双 T 型微流控芯片结构简图及常见微通道布局

现阶段越来越多的研究者尝试通过 3D 打印技术加工微流控芯片，这项技术的发展使微流控芯片制作过程更为简便，成本低廉。目前已有研究利用微流控芯片实现 DNA 的快速分离[5]。利用微流控芯片上搭载各化学反应，可以发展药物方面的合成筛选。我国体外诊断主要集中在生化分析和免疫诊断上[6]，而国外欧美国家微流控片在体外诊断方面已经取得明显

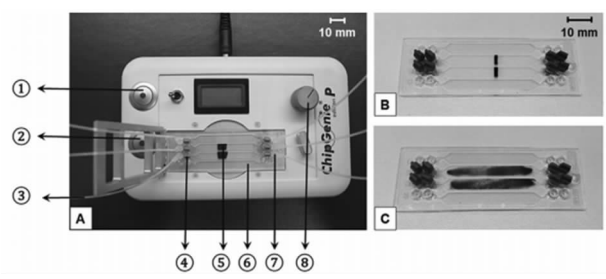
* **基金项目**：国家重点研发计划项目（2016YFD0501000）。
△ **通信作者**，E-mail：zipxia@126.com。　▲ **共同通信作者**，E-mail：lqxue@hotmail.com。

突破，通过实现全自动 PCR 分子诊断，微流控展现出巨大潜能[7-8]。器官芯片也是当今的热门研究方向，利用微流控芯片的集成功能制备器官芯片，这一技术在 2016 年的达沃斯论坛上入选年度十大新兴技术之一。国内已有团队研发出一种使多种细胞及组织在体外共存的类器官多功能微流控芯片[9]。何佳芮等[10]设计出可以联合检测大肠埃希菌菌体抗原及药敏分析的微流控芯片，这种方式证实了微流控芯片制备向产业化发展的可行性。WANG 等[11]利用聚二甲基硅氧烷(PDMS)作为结构材料制备微流体结构，通过磁性纳米颗粒对样品溶液进行磁性捕获，以荧光分子标记的抗性 IgG 作为信号观测，提高分析分辨率并降低了可能出现因表面吸附而产生的堵塞现象，整个样品的检测和分析都集合在一个微流体平台上使检测过程高效、准确。JAMIE 等[12]通过在一个蛋白质芯片上集成反应单元，可以实现酶促反应、产物电泳分离、组分标记和信号检测等连续进行。

2　微流控技术在病原检测中的应用

传统病原微生物检测主要包括涂片检查、分离培养、血清学鉴定和分子生物学鉴定，相对于微流控芯片技术，这些传统检测方法冗时费力，而新型微流控技术现已在核酸分离和定量分析、DNA 测序及各类病原体的检测等方面广泛应用，在蛋白、氨基酸、PCR 产物等领域也有了成熟的检测技术，其基于免疫分析原理，主要以抗原、抗体和荧光靶标为新型标记物。在传统检测方法上发展出来的芯片大致分为两类，电化学芯片和基因芯片[13]。电阻抗技术结合微通道制作而成的电化学微流控芯片，是通过在芯片上自动集成化操作，可以高效准确地收集数据，由于电化学传感器在结构设计和性能与微流控芯片相匹配，这种电化学微流控芯片更适用于即时检测。基因芯片的构建，融入了微流控平台和 PCR 技术，这项技术手段可以很好地解决在实际环境中面临的问题，比如，分流协同检测提高了样品检测效率并保证了检测过程不受干扰。通过基因芯片分离扩增基因片段，可以建立全自动微生物分型，实现基因芯片产业化，提高检测效率。利用荧光标记单链 DNA 来制作微流控芯片，芯片经物理吸附待检测样品与单链 DNA 相结合，避免了表面处理和探针固定等繁琐步骤，这种方式可以多通路同时检测多种病原体，但需要通过毛细管道进入反应区域，所以该种芯片以滤纸作为制作材料检测效果更为良好。

2.1　细菌病原体检测　病原微生物具有传播性、感染性和毒力，针对各种病原微生物的特点，应用在病原微生物上的微流控技术可以结合不同方法产生更好检测效果。针对某种病原体在多通道微流控芯片上采用定位捕获富集，通过荧光检测后定量分析，这种新的试验方法在实际检测中有着极大的潜在优势。对纸基芯片进行等离子体处理后，纸表面上产生了功能性基团醛基，以实现抗体的固定化。这种运用夹心法化学发光免疫分析的固定化蛋白方式，建立了在纸上进行荧光免疫测量球蛋白的新方法，相比于传统方法操作更为简便。而通过 PCR 检测复杂样品中的细菌病原体不受限于通道尺寸和形状，对其进行有效的 DNA 提取时效果显著、结果明确，同时 PCR 芯片可以实现 DNA 的单分子扩增及核酸的定量实验[13]。通过大量探针与不同标记物的样品杂交后检出的信号强度，可以分析出样本序列可实现病原体的检测。鉴定细菌通常采用两种方式，一种是传统方法培养细菌后进行药敏实验，将待测细菌放入不同生化发酵管中，观察各发酵管的反应确定细菌种类；另一种是病原体核酸检测技术，多采用基于 PCR 的分子诊断。而新型基于微通道毛细阻力的药敏检测技术，通过改变流体毛细阻力通道的长度来控制液体的流速，以驱使不同种类的菌体分流向不同通道，不仅能够对细菌进行分选、培养和分离，同时可以对其进行高敏度的检测。由于芯片的简便性及多样性，微通道可根据病原种类的不同特点进行针对性设计，XIA 等[14]设计出含 20 个微通道芯片对多种病原菌同时检测，部分细菌检测的准确性高达 100%。如图 2A 中 1～8 分别为加热开关、磁球开关、通道、插头、磁球、4 个独立反应池、mini-Luer 连接器、温度开关，图 2B 为排列成条纹粒子的微磁球芯片，图 2C 为混合磁粉的芯片，JULICH 等[15]利用磁珠的磁性对捕获的目标 DNA 高效洗涤后，可检测出水体表面的苏云金杆菌和土拉热杆菌。通过运用液滴及介电泳技术实现高通量颗粒检测与分选，陶冶[16]在单个液滴中实现一步法反转录的 PCR 扩增，由此构建高通量液滴的荧光信号检测平台，实现通过液滴微流控技术来准确分析低拷贝数下的重组病毒。这种技术对病原体基因的特征片段进行针对性设计和选择，检测其 PCR 产物，可以得到后续实验所需的多种信息，芯片中每孔可供多个不同的 PCR 同时进行，具有广泛的实用性。集毛细管电泳、荧光标记和 PCR 技术于一体的微流体技术，在基因测序及表达、病原体检测等领域正在高速发展，在单细胞分析方面也有着广泛的应用。



注：A 为微流控芯片；①为加热开关；②为磁球开关；③为通道；④为插头；⑤为磁球；⑥为 4 个独立反应池；⑦为 mini－Luer 连接器；⑧为温度开关；B 图为微磁球芯片；C 为混合磁球芯片

图 2　纯化 DNA 的微流控芯片系统

2.2　核酸检测　核酸作为生物体基本的遗传物质，

对核酸进行精准检测也就是对这种病原体的分析。微流控技术对病原体核酸进行检测时，微通道内施加电场产生能量变化，所需的试样量少，可使分子扩散程度低，分离效果极好，因此微流控 CE 分析在核酸诊断分离中的分辨能力要远远好于平板凝胶电泳。将核酸提取、PCR 扩增、分子杂交、电泳分离及检测有机地结合在一张微芯片上，这张微芯片其快速、高质量的分离效能在寡核苷酸、DNA、RNA 片段分析及基因表型和测序应用中可以得到充分反映。TSUKAKOSHI 等[17]对特异性结合的 DNA 适配体进行筛选，对得到序列的二级结构进行分析后，将序列长度进行了优化，通过设计芯片结构对两端引物序列进行封闭，有效避免了该段序列对目标结合时产生的影响。PETRALIA 等[18]研制了基于硅微柱微流体装置的生物过滤器，见图 3，微芯片从一侧进样经过中间层硅柱由另一侧输出，芯片由不同规格的高分子聚碳酸酯、PDMS、硅层、玻璃层构成，用于提取乙型肝炎病毒的全基因组 DNA。微流控芯片与 PCR 技术相结合，制作成基于磁珠提取核酸方法的微流控芯片，是将亲水性阴离子交换剂预先固定在磁珠表面，利用二氧化硅颗粒来吸附带负电荷的核酸，达到从样品中最大程度提取和纯化核酸，在引物约束下特异性地 PCR 扩增。富集与蛋白质特异性相结合的核酸，是进一步检测的前提及关键。现阶段微流控芯片结合分子诊断技术，待检样品体积只需几微升，加热器直接集成在芯片上，可以较传统 PCR 方法效率提高 2～10 倍。

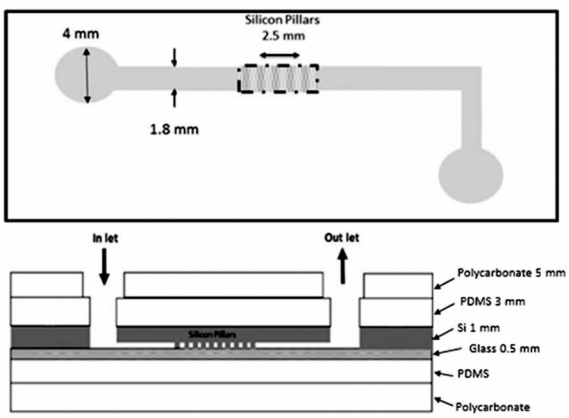


图 3　硅微柱生物滤池提取核酸示意

2.3　蛋白质及其他检测　蛋白质是生命的物质基础，对蛋白质结构和功能进行准确分析可以检测出机体的生理或病理变化。传统蛋白检测需要提取蛋白质，对凝胶电泳分离后的蛋白区带进行切割、酶降解，然后用质谱等方法检测分析。这种传统方法无法满足现代科学的精准、高效等需求。而随着 RNA 标记物的研究深入，检测核糖核蛋白中的 mRNA 等物质，通过流体蛋白质的大小在时间和空间上分离病原体蛋白，是一种低成本快速检测蛋白的方法[19-20]。将电渗流分离和紫外分光光谱检测等技术集合在一块小芯片上，将待检样品加入后，芯片自动按照设定好的检测程序完成检测，这种检测手段快速，且成本低。基于微流控芯片的蛋白质免疫分析方法的微反应空间大于表面积，分子扩散的距离减小[21-22]，使整体反应效率大大提高。GIUFFRIDA 等[23]在不同入口处加入各反应物，在 T 形连接点形成液滴后在混合反应区完成检测，见图 4，通过金纳米粒子增强出的生物发光信号与适配体相互作用结合，可将样品体积低至 1 μL 并将检测时间控制在 10 min 内，其极低的检测限也可供临床根据所需选择。

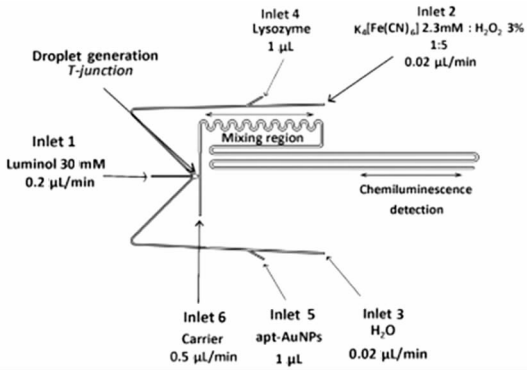


图 4　微流控原理图

3　微流控技术在病原检测领域的优势

相对于传统的免疫诊断方式和病原的鉴定培养而言，微流控技术在病原检测尤其是现场检测方面有着独特的优势[24-25]。(1)自动化、污染小、更安全，样品检测的多个步骤集成在一张芯片上。根据实验设计采取不同微通道，使繁琐的实验流程变得简易。封闭式自动化的结构可以保证检测期间样品不受污染，同时也减少对实验室等外在环境造成的影响，保证了后续实验操作不受中间产物的影响。(2)高通量性。因为微通道可以根据所需设计成三维-多通道，这种立体多元结构可以将待检测样品完美分流，各通道不受其他通道影响。同一时间同一样品可做不同项目检测，与传统生化检测方法相比，极大地提高了检测效率的同时，也保证了检测结果的准确性，符合高通量操作快速、灵敏、准确等特点。(3)检测成本低。由于系列操作集中在一块小芯片上，各个结构单元微小，所需的检测试剂和待检样品消耗量自然随之减少。尽管检测试剂浓度可能增大，但实际使用量要远小于常规检测方法，节约了实验成本也避免造成浪费。因为自动化集中操作，所需被检测的样本量只需要微升甚至纳升级别。随着微流控技术的进步，产业化商业化的发展，一块微芯片的成本控制在可接受范围将逐步实现。

正因为微流控具有以上几个重要的优势和优点，使其成为了即时检验(POCT)的首选，并在临床检测中逐渐推行开来。

4　存在的问题和发展趋势

微流控技术可极大地缩短样品处理时间，通过精密控制液体流动，最大化地利用试剂耗材，把整个化

验室的功能集成在微芯片上,为病原微生物检测等领域提供了无限的前景。尽管微流控可以大幅度降低试样和试剂的消耗,但因其昂贵的制作成本和复杂的制作工艺使这项技术并不能很好地应用在临床实际检测中,同时制作微芯片的方法和基底材质受限过大,对于操作人员的技术要求较高。现阶段随着各项学科研究的深入,生物芯片将得到更为广泛的应用,新兴的数字微流控技术(DMF)在行业内引起广泛关注,这种可实现离散液滴精准自动化操纵的新型液滴操纵技术对于检测样品具有十分重要的意义。同时,微机电系统(MEMS)是指尺寸在几毫米甚至更小的高科技装置,因其融合了精密机械加工、薄膜和硅加工等多项技术,期待微机电系统在微流控芯片小型化中带来的新研究思路。

参考文献

[1] THORSEN T,MAERKL S J,QUAKE S R. Microfluidic large-scale integration[J]. Science,2002,298(5593):580-584.

[2] 李宇杰,霍曜,李迪,等. 微流控技术及其应用与发展[J]. 河北科技大学学报,2014,35(1):11-19.

[3] 文伟力. 聚合物微流控芯片的制作、检测及仿真研究[D]. 长春:吉林大学,2007.

[4] 郑小林,鄢佳文,胡宁,等. 微流控芯片的材料与加工方法研究进展[J]. 传感器与微系统,2011,30(6):1-4.

[5] LOUGHRAN M,CRETICH M,CHIARI M. Separation of DNA in a versatile microchip[J]. Sensor Actuat B,2005,107(2):975-979.

[6] CHEN Y,CHENG N,XU Y,et al. Point-of-care and visual detection of P. aeruginosa and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor[J]. Biosens Bioelectron,2016,15:317-323.

[7] JUNG W,HAN J,CHOI J W,et al. Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies[J]. Microelectron Eng,2015,132:45-57.

[8] GUO L,SHI Y,LIU X,et al. Enhanced fluorescence detection of proteins using ZnO nanowires integrated inside microfluidic chips[J]. Biosens Bioelectron,2018,99:368-374.

[9] AN F,QU Y,LUO Y,et al. A Laminated Microfluidic Device for Comprehensive Preclinical Testing in the Drug ADME Process[J]. Scient Report,2016,6:25022.

[10] 何佳芮. 基于集成型微流控芯片的细菌快速检测及药敏分析[D]. 大连:大连医科大学,2014.

[11] WANG K,LIANG R,CHEN H,et al. A microfluidic immunoassay system on a centrifugal platform[J]. Sensor Actuat B,2017,251(5):242-249.

[12] JAMIE V,RICHARD C. Unraveling the CHIP: Hsp70 complex as an information processor for protein quality control[J]. BBA - Proteins Proteom,2017,1865(2):133.

[13] XU W,CHENG N,HUANG K,et al. Accurate and easy-to-use assessment of contiguous DNA methylation sites based on proportion competitive quantitative-PCR and lateral flow Nucleic acid biosensor[J]. Biosens Bioelectron,2016,80:654-660.

[14] XIA Y,LIU Z,YAN S,et al. Identifying multiple bacterial pathogens by loop-mediated isothermal amplification on a rotate&react slip chip[J]. Sens Actuators B: Chem,2016,228:491-499

[15] JULICH S,HOTZEL H,GARTNER C,et al. Evaluation of a microfluidic chip system for preparation of bacterial DNA from swabs,air and surface water samples[J]. Biologicals,2016,44(6):574-580.

[16] 陶冶. 基于液滴微流控的病毒颗粒检测与分选关键技术研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2016.

[17] TSUKAKOSHI K,HARADA R,SODE K,et al. Screening of DNA aptamer which binds to α-synuclein[J]. Biotechnology Letters,2010,32(5):643-648.

[18] PETRALIA S,SCIUTO E L,CONOCI S,et al. A novel miniaturized biofilter based on silicon micropillars for nucleic acid extraction[J]. Analyst,2017,142(1):140-146.

[19] 于立佳. 基于微流控芯片的蛋白质检测关键技术研究[D]. 北京:北京理工大学,2016.

[20] AROSIO P,MüLLER T,RAJAH L,et al. Microfluidic diffusion analysis of the sizes and interactions of proteins under native solution conditions[J]. ACS Nano,2016,10(1):333-341.

[21] ZHAO M,LI H,LIU W,et al. Plasma treatment of paper for protein immobilization on paper-based chemiluminescence immunodevice[J]. Biosens Bioelectron,2016,79:581-588.

[22] SHU B,LI Z,YANG X,et al. Active droplet-array(ADA) microfluidics enable multiplexed complex bioassays for point of caretesting[J]. Chem Commun,2018,54(18):2232-2235.

[23] GIUFFRIDA M C,CIGLIANA G,SPOTO G. Ultrasensitive detection of lysozyme in droplet-based microfluidic devices[J]. Biosens Bioelectron,2018,104:8-14.

[24] 王宇平,陈永义,张建明. 液相芯片技术在人类传染病检测中的应用[J]. 现代预防医学,2015,15(4):708-709.

[25] FERNANDES A C,SEMENOVA D,PANJAN P,et al. Multi-function microfluidic platform for sensor integration[J]. New Biotechnol,2018,162(1):2231-2237.

(收稿日期:2018-03-24 修回日期:2018-06-28)