

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.06.044

试纸型生物传感器检测病原微生物的研究进展*

胡柳杨, 韩冰 综述, 曹东林[△] 审校

广东省第二人民医院检验医学部, 广东广州 510317

关键词: 试纸型生物传感器; 病原微生物; 即时检测

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)06-0857-04

当今感染性疾病仍是引起人类死亡的主要原因,开展病原微生物的现场快速检测对疾病的治疗和预后尤为重要。目前,临床上主要使用的呼吸道病原体检测方法包括显微镜检查、细菌培养和免疫学试验,这些方法操作过程烦琐,耗时长,具有一定技术难度,灵敏度较低。随着分子生物学技术的飞速发展,DNA G+C mol%测定、特异探针杂交技术、PCR 技术扩增特异核酸片段、16SrRNA 序列分析、限制性片段长度多态性分析及生物芯片等技术被应用于病原微生物检测,这些方法的灵敏度和特异度高,并且能做到快速检测,但都依赖于昂贵的仪器设备及经过培训的实验室技术人员,这使其在小型社区医院及偏远地区的应用受到限制。生物传感器技术是近年来发展迅速的病原微生物检测方法,具有快速、灵敏、成本低、易于自动化的优点,用于病原体检测的主要有免疫传感器和 DNA 生物传感器^[1]。其中 DNA 生物传感器可以特异性地识别病原微生物的特异核酸序列,已受到越来越多的关注。DNA 生物传感器的一般原理包括将 DNA 探针固定在传感器表面,通过电化学^[2]、光学^[3]或重量法^[4]进行杂交和检测。越来越多的 DNA 生物传感器被设计用于病原微生物的即时诊断,试纸型生物传感器——基于纸张的微流体生物测定几乎符合即时诊断设备的所有关键标准^[5],即不需要复杂的设备、试剂或电源,灵敏且准确测定,并且检测快速、成本低,易于使用和运输。本文阐述了试纸型生物传感器的工作原理、应用研究和最新进展,并探讨其在病原微生物现场快速检测中所面临的挑战和发展趋势。

1 试纸型生物传感器的原理

1.1 试纸型免疫生物传感器 试纸型免疫生物传感器^[6]的试纸条依次由样品垫、缀合垫、硝酸纤维素膜和吸收垫组成,硝酸纤维素膜和吸收垫以重叠方式附着在塑料背衬上,以促进毛细管流动。试纸型免疫生物传感器各组成部分的作用分别为^[6]:塑料背衬提供

稳定性和黏合性;硝酸纤维素膜分别固定单克隆抗体和多克隆二抗,用于测试和对照;硝酸纤维素膜的一端是吸收垫,其与硝酸纤维素膜部分重叠,为毛细管流动提供驱动力;试纸条的最前端是样品垫;在样品施加末端放置缀合垫,由纤维素制成并用信号发生基团标记的特异性多克隆抗体处理。该生物传感器由检测线、对照线和控制线 3 部分组成,试纸条上的条带颜色取决于信号发生基团的颜色。目前试纸型免疫生物传感器多数以纳米金粒子作为信号发生器,纳米金粒子在 520 nm 处有等离子体共振峰,表现为特征性红色。待测样品在样品垫被加载,然后经毛细管作用沿着条带移动,并在最后的吸收垫处被收集,样品移动到缀合垫时,待测物质与多克隆抗体结合形成待测物质-信号基团-多克隆抗体复合物,当样品移动到测试区时,特异性的单克隆抗体捕获待测物质-信号基团-多克隆抗体复合物,信号基团在检测线中累积,呈现肉眼可见的条带,条带颜色的强弱与待测物质的含量呈正比。在测试区捕获复合物后,未结合的成分(包括过量的信号基团-多克隆抗体)和流体部分继续沿着条带流动,通过多克隆二抗在对照区捕获未结合的信号基团-多克隆抗体显色。控制线始终显色,以保证试纸型生物传感器的正常功能。

1.2 试纸型 DNA 生物传感器 试纸型 DNA 生物传感器的试纸条组成与试纸型免疫生物传感器大致相同,但不同于试纸型免疫生物传感器,试纸型 DNA 生物传感器的检测不依赖于抗原-抗体的特异性结合。试纸型 DNA 生物传感器将 PCR 与生物传感器组合成一个系统,作为一种简单快速的 PCR 后分析工具,与琼脂糖凝胶电泳相比,灵敏度更高,并且检测更加简单和快速。试纸型 DNA 生物传感器的一般原理包括将 DNA 探针固定在传感器表面,通常将对捕获 DNA 扩增子具有极强亲和力的特定寡核苷酸序列或免疫物质(例如:半抗原-抗体和半抗原-蛋白质)作为 DNA 探针。目前大多数试纸型 DNA 生物传感器通

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

[△] 通信作者, E-mail: caodl@126.com。

过使用金纳米粒子^[7-11]和有色聚苯乙烯微球^[9]作为信号发生器来进行 DNA 的显色检测。试纸型 DNA 生物传感器不仅可以定性检测,还能进行半定量分析,定量数据可以通过仪器进行强度读数或通过与酶^[8]、荧光染料^[12-13]或放射性偶联物^[14]的额外偶联来记录。试纸型 DNA 生物传感器分为检测区、对照区和控制区 3 个部分,传感器表面的探针结合扩增的 DNA,信号发生基团在检测区累积,出现肉眼可见的条带,当在低于饱和浓度的分析范围内测试 DNA 产物的量时,强度与靶 DNA 的量呈正相关,从而提供了靶 DNA 的定量信息^[7]。

2 试纸型生物传感器的优点

试纸型生物传感器的优点:(1)大部分 DNA 生物传感器需要使用仪器,并且在大多数情况下,涉及几个孵育和洗涤步骤。试纸型 DNA 生物传感器不需要复杂的设备、试剂或电源,无须使用仪器即可直观检测 DNA。此外,试纸型生物传感器无须多次孵育和洗涤,并最大限度地降低对实验室人员的要求。(2)具有良好的灵敏度和特异度。YETISEN 等^[5]证实试纸型 DNA 生物传感器对 PCR 产物的检测灵敏度是溴化乙锭电泳的 50 倍及以上,并且高于普通杂交。(3)试纸型生物传感器可运行在多重反应系统上。试纸型免疫生物传感器可以根据不同的需求在一个条带上固定不同病原微生物的特异性抗体,实现病原体的多重检测;试纸型 DNA 生物传感器可以在一个条带中检测到多个扩增的靶基因 DNA 片段,不同探针分别用寡核苷酸或免疫物质(例如:半抗原-抗体和半抗原-蛋白质)标记,在临床使用时,可根据不同需求,选择特殊组合的探针,实现个体化核酸检测。(4)检测快速、体积小、一次性检测、检测成本低、易于使用和运输。试纸型免疫生物传感器无须对样品进行任何预处理,样品点样后 5 min 内完成检测^[6];试纸型 DNA 生物传感器在 PCR 扩增后 15 min 内可得到结果^[7-9]。这些特性使得它更适用于在检验设备缺乏的小型实验室和需要快速检测的现场进行即时检测。

3 试纸型生物传感器在微生物病原体检测中的应用

试纸型生物传感器平台可根据不同需求进行相应的构建,可对不同的病原体进行多重、快速、准确、可视化检测,在病原微生物及抗菌药物耐药分析中具有巨大的应用潜力。现将试纸型生物传感器在病原微生物检测中的应用总结如下。

3.1 病毒性病原体的检测 LILES 等^[15]应用试纸型生物传感器检测登革病毒并评估其检测的灵敏度和特异度,该方法在检测登革热感染方面比 Taqman RT-PCR 更敏感,证实了这种方法也适用于使用反转录 DNA 模板检测登革病毒。KOIWA 等^[16]基于试纸型 DNA 生物传感器建立了一种同时对 3 种常见的

病毒(包括感染性肌坏死病毒、桃拉综合征病毒和龟头病毒)进行快速检测的新方法,这 3 种病毒中的每种病毒均具有与常规 PCR 相同的灵敏度,且能产生更清晰的显色结果并且能够 1 次检测 3 种病毒。试纸型 DNA 生物传感器被应用于筛查、确定宫颈癌标本中是否存在人乳头瘤病毒 16 型(HPV16),测试结果与这些癌症的表征匹配率为 100%^[14]。GLYNOU 等^[7]应用寡核苷酸功能化金纳米粒子作为干试剂条带生物传感器中的探针用于 DNA 杂交分析,并检测来自人血浆的丙型肝炎病毒 RNA 的 RT-PCR 产物,检测效率比琼脂糖凝胶电泳高 8 倍,该研究者发现条带传感器对靶 DNA 的检测明显更快,与琼脂糖凝胶电泳和其他技术检测所需的时间相比更短,仅需 10 min。

3.2 细菌性病原体的检测 试纸型 DNA 生物传感器被应用于检测食源性病原体霍乱弧菌。在一项对 174 株霍乱弧菌和非霍乱弧菌进行临床评估的研究中,与常规琼脂糖凝胶电泳 DNA 检测相比,试纸型 DNA 生物传感器的灵敏度和特异度均为 100%^[9],证明它是琼脂糖凝胶电泳分析的可行替代品,易于使用,且能一次性使用,不需要任何专门的设备且无须使用致癌化学品。ANG 等^[10]建立了新型序列特异性核酸侧向流动试纸型生物传感器,用于检测引起腹泻的产毒性霍乱弧菌的霍乱毒素基因,并且在几分钟内得到快速的显色结果,而无须在高温下多次洗涤或孵育。KALOGIANNI 等^[11]建立了能同时检测大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的双色试纸型 DNA 生物传感器,该传感器能够较为快速地对这两种常见细菌的检测。LI 等^[6]描述了能用于铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌特异性检测的多重免疫传感器的制造过程和测试结果。目前的即时检测平台都不能同时检测多重细菌,但该试纸型免疫生物传感器可用于快速检测多重细菌的感染因子,对于每种测试的感染因子,传感器都显示出了高特异性和 500~5 000 CFU/mL 的检测范围。HAYASHI 等^[17]用试纸型 DNA 生物传感器实现了包括肠道沙门菌、志贺菌、肠侵袭性大肠埃希菌和肠出血性大肠埃希菌在内的 4 种食源性病原体的快速筛查,能够帮助确认安全的食品进入市场。TIAN 等^[18]建立了能够多重检测口腔微生物群的试纸型 DNA 生物传感器,实现了对口腔常见微生物的五重分析,并对其进行了半定量分析。接着,该研究者应用试纸型 DNA 生物传感器多重分析了口腔斑块中与龋齿相关的常见细菌的五元亚群^[19],表明该一次性试纸型 DNA 生物传感器在分析口腔微生物组成以及微生物亚群的即时诊断方面具有巨大潜力。试纸型 DNA 生物传感器可用于细菌性

鼻窦炎相关细菌的检测^[20],改进该传感器对细菌性鼻窦炎和支气管炎的诊断具有潜在价值。在过去 30 年中,细菌变异、抗菌药物的不合理使用以及感染控制方面的问题,导致耐药菌株的增加和播散,SHAN-MUGAKANI 等^[21]建立了一种能直接在粪便标本中多重检测碳青霉烯酶基因的试纸型 DNA 生物传感器平台,能在 2 h 内直接在粪便标本中多重检测 blaNDM、blaKPC、blaIMP 和 blaOXA-48 等碳青霉烯酶基因。因此,试纸型 DNA 生物传感器是可以应用于耐药基因检测的一种价格合理、快速的即时检测工具。OHSHIRO 等^[22]开发了一种快速的试纸型 PCR-DNA 生物传感器用于鉴定阳性血培养瓶中的金黄色葡萄球菌和抗菌药物耐药基因 mecA 和 blaZ,整个过程可在 1 h 内完成。由于该方法与常规 PCR 方法相比,非常快速和简便,并且与实时 PCR 或全自动装置相比,更为经济,证实其所提出的试纸型 DNA 生物传感器技术可应用于快速诊断甚至应用于社区医院等检测仪器缺乏的地方。

4 试纸型生物传感器技术的前景展望

试纸型生物传感器技术平台为临床诊断中的多重分析及标本半定量分析提供了简单、快速的检测手段。由于试纸型生物传感器小型化、便携、检测成本低、无须孵化和洗涤步骤、快速且灵敏度高、特异性强等优点,试纸型生物传感器已被用于种植业^[23]、水产业^[16,24]、食品安全^[17]、医疗卫生^[18-19]等领域。

目前试纸型生物传感器在病原体检测方面的研究仍处于初期阶段,国内相关研究相对较少,用于临床检测也有一定的局限性,主要包括:(1)试纸型生物传感器测定细菌仅提供相对丰度,其不一定能反映细菌的实际量;(2)试纸型 DNA 生物传感器仅能对有限物种进行分析,因为该方法依赖于物种特异性引物的 PCR 扩增,而目前与人类疾病相关的微生物序列信息没有被完全破解或公布,其应用会受到一定的限制;(3)试纸型生物传感器检测到的细菌可能并不直接参与疾病的发病;(4)试纸型 DNA 生物传感器多重检测平台的建立要克服多重 PCR 的难题,因此较难实现高通量检测。随着试纸型生物传感器信号处理技术、探针技术以及多重 PCR 技术研究的不断深入,试纸型生物传感器在医疗设备不齐全的社区医院、偏远地区医院,以及在基因分型、病原微生物检测等方面将有着较好的应用前景。同时可以预见,试纸型生物传感器在现场即时检测方面也将有着广泛的应用前景。

5 小 结

综上所述,试纸型生物传感器不需要复杂的设备、试剂或电源,具有良好的灵敏度和特异度,并且检测快速、体积小巧、检测成本低、易于使用和运输,是适用于小型实验室和现场即时检测呼吸道病原体的

理想平台。

参考文献

[1] SINGH R, DAS MUKHERJEE M, SUMANA G, et al. Biosensors for pathogen detection: a smart approach towards clinical diagnosis [J]. Sens Actuators B Chem, 2014, 197(1): 385-404.

[2] DRUMMOND T G, HILL M G, BARTON J K. Electrochemical DNA sensors[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(10): 1192-1199.

[3] MINUNNI M, TOMBELLI S, MARIOTTI E, et al. Biosensors as new analytical tool for detection of Genetically Modified Organisms (GMOs) [J]. Fresenius J Anal Chem, 2001, 369(7/8): 589-593.

[4] STOMBELLI M M, MASCINI M. Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices[J]. Methods, 2005, 37(1): 48-56.

[5] YETISEN A K, AKRAM M S, LOWE C R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices [J]. Lab Chip, 2013, 13(12): 2210-2251.

[6] LI C Z, VANDENBERG K, PRABHULKAR S, et al. Paper based point-of-care testing disc for multiplex whole cell bacteria analysis [J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(11): 4342-4348.

[7] GLYNOU K, IOANNOU P C, CHRISTOPOULOS T K, et al. Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization [J]. Anal Chem, 2003, 75(16): 4155-4160.

[8] MAO X, MA Y Q, ZHANG A G, et al. Disposable nucleic acid biosensors based on Gold nanoparticle probes and lateral flow strip[J]. Anal Chem, 2009, 81(4): 1660-1668.

[9] CHUA A, YEAN C Y, RAVICHANDRAN M, et al. A rapid DNA biosensor for the molecular diagnosis of infectious disease[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(9): 3825-3831.

[10] ANG G Y, YU C Y, YEAN C Y. Ambient temperature detection of PCR amplicons with a novel sequence-specific nucleic acid lateral flow biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2012, 38(1): 151-156.

[11] KALOGIANNI D P, LITOS I K, CHRISTOPOULOS T K, et al. Dipstick-type biosensor for visual detection of DNA with oligonucleotide-decorated colored polystyrene microspheres as reporters[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(6): 1811-1815.

[12] WANG L, CHEN W, MA W, et al. Fluorescent strip sensor for rapid determination of toxins[J]. Chem Commun, 2011, 47(5): 1574-1576.

[13] PYO D, YOO J S. New trends in fluorescence immuno-chromatography[J]. J Immunoassay Immunochem, 2012, 33(2): 203-222.

内容中体现出学科的新进展,让教学与学生学习均可做到与时俱进。(5)将多种教学方法与手段有机结合并应用到实验教学中,让学生主动参与实验中,并注重实验与理论的联系,加强理论与实际结合的综合分析能力。

本研究具有的特色:(1)注重理论联系临床实践,注重实践教学,注重对学生动手能力的培养,形成突出医学检验技术专业人才培养特点的教学模式;(2)利用信息技术和网络技术,将骨髓涂片电子化,并且在公共平台上发布,大大提高学生学习的积极性和有效性;(3)教学中融入了临床检验实验室的行业标准与规范,让学生在学校教育中树立很强的质量意识;(4)在不改变教学课时的前提下进行教学改革,不影响其他学科的课程安排。

参考文献

[1] 王也飞,丁磊,徐子真,等. PBL 教学在临床血液学检验理论教学中的应用与思考[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36 (1): 138-139.

[2] 金红,闫海润. “临床血液学检验”实验课教学改革与实践[J]. 实验室科学, 2017, 20(2): 105-106.

[3] 梁骑,李英,刘文,等. 《临床血液学检验技术》教学改革初探[J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(35): 9-11.

[4] 何亚楠. 临床血液学检验实验教学改革与探讨[J]. 健康必读, 2013, 10(10): 556-556.

[5] 马芳,郝艳梅,殷平鳌,等. 临床血液学与检验实验教学探讨[J]. 基础医学教育, 2013, 15(3): 856-857.

[6] 李英,李君安,刘文,等. 《临床血液学与检验》实验教学的几点体会[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(8): 1016-1020.

[7] 王健,彭新国,王涛,等. 临床血液学检验技术中形态学实验教学探索[J]. 卫生职业教育, 2017, 35(23): 67-68.

[8] 刘瑞明,杨晓艳. “临床血液学检验”实验课教学改革与实践探究[J]. 中国卫生产业, 2018, 16(32): 105-106.

[9] 牟凤林,王静,邓晶荣,等. 基于建立骨髓细胞教学图谱资源库的高职高专《血液学检验技术》形态学教学模式改革探索[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(2): 279-281.

[10] 唐玉莲,韦莹慧,黄燕,等. 浅谈临床血液学检验多元互动实验教学[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(14): 2201-2202.

[11] 张晓丽,潘静,司维柯,等. 多渠道网络教学在《临床血液学检验》教学中的应用探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(20): 2852-2853.

[12] 殷平鳌,马芳,李玉云. 血小板计数的实验教学探讨[J]. 基础医学教育, 2011, 13(5): 460-461.

[13] 卢艳,韩海燕. 临床血液学检验教学心得体会[J]. 临床医药文献杂志, 2016, 3(40): 8057-8060.

(收稿日期:2019-05-26 修回日期:2019-09-29)

(上接第 859 页)

[14] CORSTJENS P, ZUIDERWIJK M, BRINK A, et al. Use of up-converting phosphor reporters in lateral-flow assays to detect specific nucleic acid sequences: a rapid, sensitive DNA test to identify human papillomavirus type 16 infection[J]. Clin Chem, 2001, 47(10): 1885-1893.

[15] LILES V R, PANGILINAN L A, DAROY M L, et al. Evaluation of a rapid diagnostic test for detection of dengue infection using a single-tag hybridization chromatographic-printed array strip format[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(3): 515-521.

[16] KOIWAI K, KODERA T, THAWONSUWAN J, et al. Rapid diagnosis of three shrimp RNA viruses using RT-PCR-DNA chromatography[J]. J Fish Dis, 2018, 41(8): 1309-1312.

[17] HAYASHI M, NATORI T, KUBOTA-HAYASHI S, et al. A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after a six-hour enrichment culture in a broad-range food pathogen enrichment broth[J]. Biomed Res Int, 2013(1): 295050.

[18] TIAN L Y, SATO T, NIWA K, et al. Rapid and sensitive PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of the oral microbiota[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 180323.

[19] TIAN L Y, SATO T, NIWA K, et al. PCR-dipstick DNA chromatography for profiling of a subgroup of caries-associated bacterial species in plaque from healthy coronal

surfaces and periodontal pockets[J]. Biomed Res, 2016, 37(1): 29-36.

[20] SONG C, CHORATH J, PAK Y, et al. Use of dipstick assay and rapid PCR-DNA analysis of nasal secretions for diagnosis of bacterial sinusitis in children with chronic cough[J]. Allergy Rhinol (Providence), 2019, 10(1): 1-8.

[21] SHANMUGAKANI R K, AKEDA Y, YAMAMOTO N, et al. PCR-Dipstick chromatography for differential detection of carbapenemase genes directly in stool specimens[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(6): e00067-e00077.

[22] OHSHIRO T, MIYAGI C, TAMAKI Y, et al. Development of a rapid diagnostic method for identification of Staphylococcus aureus and antimicrobial resistance in positive blood culture bottles using a PCR-DNA-chromatography method[J]. J Infect Chemother, 2016, 22(6): 372-376.

[23] MONDEN Y, TAKASAKI K, FUTO S, et al. A rapid and enhanced DNA detection method for crop cultivar discrimination[J]. J Biotechnol, 2014, 185(1): 57-62.

[24] KOIWAI K, KODERA T, THAWONSUWAN J, et al. A rapid method for simultaneously diagnosing four shrimp diseases using PCR-DNA chromatography method[J]. J Fish Dis, 2018, 41(2): 395-399.

(收稿日期:2019-06-20 修回日期:2019-10-09)