

建立大规模筛选病毒的核酸检测方法

梁 雪 石云峰 张经纬

摘 要 目的 开发快速、简便、可大规模对病毒进行筛选的核酸检测方法。**方法** 通过集液滴生成、循环扩增、信号读取为一体的液滴数字聚合酶链反应(droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)系统,以严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的ORF1ab和N基因为靶序列,以人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参基因,进行核酸扩增并监测每个液滴的荧光信号。**结果** 一体式DDPCR仪实现了“样本进-结果出”的简易操作。其水油体系与SARS-CoV-2检测试剂盒中试剂兼容,至扩增结束液滴稳定未融合,实现了实时检测区分出大量液滴中不同的荧光信号。恒温扩增条件下,最早可在第9min观察到带有三重荧光信号(FAM/HEX/CY5)的液滴。扩增过程中的实时荧光信号通过拟合后与实时荧光定量聚合酶链反应扩增曲线类似,包括基线期、指数期和平台期。各基因几百个液滴的扩增曲线显示,各液滴中无特异性扩增,同时Ct值分析结果显示,最早可在第12min得到扩增信号,达到鉴别目的。**结论** 一体式ddPCR仪操作简便,液滴中反应迅速,可达到快速检测的目的。恒温扩增对反应设备要求较低,可大规模批量反应,同时拍照式信号采集可记录大量液滴的荧光信号,达到大规模筛选的目的。

关键词 一体式液滴数字聚合酶链反应 严重急性呼吸综合征冠状病毒2 恒温扩增

中图分类号 R331 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2024.04.006

Establishment of Nucleic Acid Detection Methods for Large-scale Screening of Viruses. LIANG Xue, SHI Yunfeng, ZHANG Jingwei. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To develop rapid and simple nucleic acid assays for large-scale screening of epidemic viruses. **Methods** The droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) system, which integrates droplet generation, cyclic amplification, and signal reading, was used to amplify nucleic acids and monitor the fluorescence signal of each droplet targeting the ORF1ab and N genes of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene as internal reference gene. **Results** The integrated DDPCR instrument operated on the simple principle of “sample in-result out.” Its water-oil system was compatible with the SARS-CoV-2 assay kit’s reagents, and the droplets were stable and unfused by the end of amplification, allowing real-time fluorescence detection to distinguish different fluorescence signals in a large number of droplets. Droplets with triple fluorescence signals (FAM, HEX, CY5) were observed as early as the 9th minute under thermostatic amplification conditions. By fitting, the real-time fluorescence signal during amplification resembled the real-time polymerase chain reaction amplification curve, including the baseline, exponential, and plateau phases. The amplification curves of several hundred droplets of each gene showed that there was no specific amplification in each droplet, while the results of Ct value analysis showed that the amplification signal could be obtained at the 12th minute at the earliest for identification purposes. **Conclusion** The integrated ddPCR instrument is simple to operate and reacts quickly in droplets, allowing for rapid detection. Thermostatic amplification requires less reaction equipment and is suitable for large-scale batch reactions, whereas photo-type signal acquisition can record the fluorescence signal of a large number of droplets for large-scale screening.

Key words Integrated droplet digital polymerase chain reaction; SARS-CoV-2; Thermostatic amplification

核酸扩增(nucleic acid amplification, NAA)检测是一种快速的分子检测技术,包括聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)及其他等温扩增技术^[1]。传统PCR检测均在大型、昂贵的热循环仪中

进行,升降温缓慢。通过减小反应体积、增加反应接触面与反应体积的比值、重新设计仪器中对温度传导或控制的原件来加快反应时间^[2~4]。然而,这些设备都更为精密和复杂。虽然各种等温扩增技术被开发出来以规避PCR循环中对温度的需求,但这些技术都有不同程度的非特异性反应^[5,6]。

由病原体严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,

基金项目:国家重点研发计划项目(SQ2020YFA080008)

作者单位:200433 上海,复旦大学生命科学学院

通信作者:张经纬,电子信箱:jingwei_zhang@fudan.edu.cn

SARS – CoV – 2)引起的人类急性呼吸道综合征对全球健康和经济的影响持续至今。目前诊断 SARS – CoV – 2 感染的金标准是基于反转录实时荧光定量 PCR (reverse transcription quantitative PCR, RT – qPCR),但其判断阈值较为主观^[7]。液滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 基于水油系统形成油包水液滴, 包含在待测样品中的目标核酸分子被分隔在热稳定的独立液滴中平行地进行 PCR 反应。如今, 几个 ddPCR 平台也已商业化, 如 Raindrop™ 数字 PCR、Bio – Rad QX200™ Droplet Digital™ 系统、Naica™ 系统, 但使用这些平台完成一次检测, 大多都需要几台设备协同, 如液滴生成仪、液滴读取仪、PCR 热循环仪等^[8]。

鉴于快速 PCR 系统精密复杂, 恒温扩增产生的非特异性不可避免, 本研究试图利用反转录液滴实时恒温扩增的方式, 建立快速且设备简单的检测体系。目前已有的研究仅能处理液滴的平均荧光信号或少量液滴的实时荧光信号, 虽然 BioMark™ HD 系统可

同时实现荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 和实时数字 PCR (digital PCR, dPCR), 但需要其他采样设备, 检测成本高昂^[9]。除了对少量液滴进行实时扩增外, 也有研究可对大量液滴的荧光信号进行实时监测。如一项研究使用硅衬底制造了约 20000 个微室的芯片对质粒进行 dPCR 扩增, 在每个延伸阶段的最末端同时记录和分析了荧光图像, 再基于建立的分析模型对阳性和阴性扩增曲线进行分析^[10]。另一项研究虽然也能通过拍照处理大量液滴的实时扩增曲线, 但其也需配套对应的微流控芯片阵列^[11]。

因此, 相较于操作步骤繁琐且需配备外围设备甚至精密芯片的实时液滴扩增技术, 研究人员利用新型液滴生成方式——振动注射技术, 通过枪头前端的匀速摆动生成大小均一的微滴, 打造了一款集液滴生成、扩增和结果读取于一体的全自动 ddPCR 仪 (图 1), 大幅减少了外围配套设备及耗材, 缩短了实验时间, 降低了实验成本。

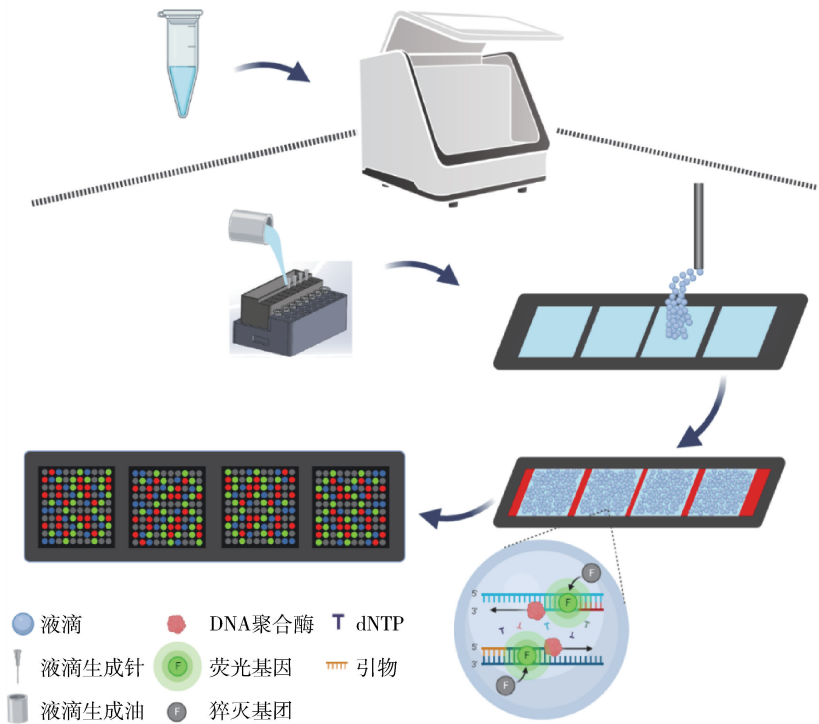


图 1 实验流程图

材料与方法

1. 引物设计: 根据 2020 年 3 月 21 日发布在 GISAID25 和 GenBank 上的 SARS – CoV – 2 基因组, 使用 Primer Explorer v. 5 进行引物设计, 设计方法如研究所述^[12]。引物包括人 GADPH 基因作为样本内部

对照, ORF1ab 基因和 N 基因引物共同检测病毒。

2. 试剂介绍: SARS – CoV – 2 检测试剂盒购买于南京普济生物有限公司, 其中含有引物及探针混合液; PCR buffer mix (内含反转录酶、DNA 聚合酶以及缓冲离子); 对照品 [包括空白对照 (无核酸酶的水)、

阴性对照(仅含人 GAPDH 部分序列)和阳性对照(SARS-CoV-2 病毒的 ORF1ab 基因、N 基因,以及人的内参基因 GAPDH)]; Buffer A(具有细胞裂解功能)。

3. 实验操作:6.4 μ l PCR Buffer mix,2.4 μ l 引物及探针混合液,7.2 μ l Buffer A,4 μ l 对照品,0.5 μ l ROX 参比染料。将 4 孔板和 4 孔板密封盖分别放置到 4 孔板托盘架和 4 孔板压盖板架上,一起放入机器内。将枪头盒放入样本架中,并在枪头盒左侧储油池处倒入液滴生成油,完成后将盛放枪头盒的样本架放入机器内。将待测样品放置在样本架右侧的八连管凹槽上,开启仪器将自动生成液滴,22 μ l 的待测样品理论将生成为 23000 个微液滴。样品生成液滴后,于 61 $^{\circ}$ C 运行 60~90min。扩增同时,机器内置的荧光检测器负责采集不同荧光通道的液滴图像。

4. 数据处理:实时捕获液滴的荧光强度(1 分钟/次),选择仪器参数在 HEX(GAPDH 基因)、FAM(ORF1ab 基因)、CY5(N 基因)荧光通道的图片,通过 Image J 软件合并图像,并进行灰度处理,得到的灰度值拟合合成曲线。确定液滴数字等温扩增的周期阈值

(Ct)数:每个荧光通道阈值被设定为(最小值+最大值) $\times$ Y%,Y=5 为每条扩增曲线确定交叉点 Ct 数。

结 果

1. 一般液滴系统的水相和油相与常规核酸扩增溶液兼容,但本实验使用的 SARS-CoV-2 检测试剂盒含有表面活性剂。为了测试该表面活性剂与已有水油系统兼容,选择无核酸酶的水为对照,实验首先测试了试剂盒中 Buffer A 与液滴生成系统的兼容性,结果如图 2 所示。将 3 个荧光通道的照片合并成一张,其中 ORF1ab 扩增的 FAM 信号呈蓝色,N 基因扩增的 CY5 信号呈红色,内参基因 GAPDH 扩增的 HEX 信号呈绿色,3 种颜色重叠呈现出图中的白色液滴。根据图片结果,对于无核酸酶的水,可第 9min 观察到扩增信号(白色液滴),达到荧光观测阈值。对于具有细胞裂解功能的 Buffer A,在第 19min 呈现出白色液滴,表现出扩增信号。Buffer A 扩增体系至反应结束未见液滴融合,说明在有益于细胞裂解的表面活性剂情况下扩增系统依然稳定,并且未影响各基因的扩增,依然可成功区分阳性对照(FAM、HEX、CY5 三重信号),内参信号(仅 HEX)和空白液滴。

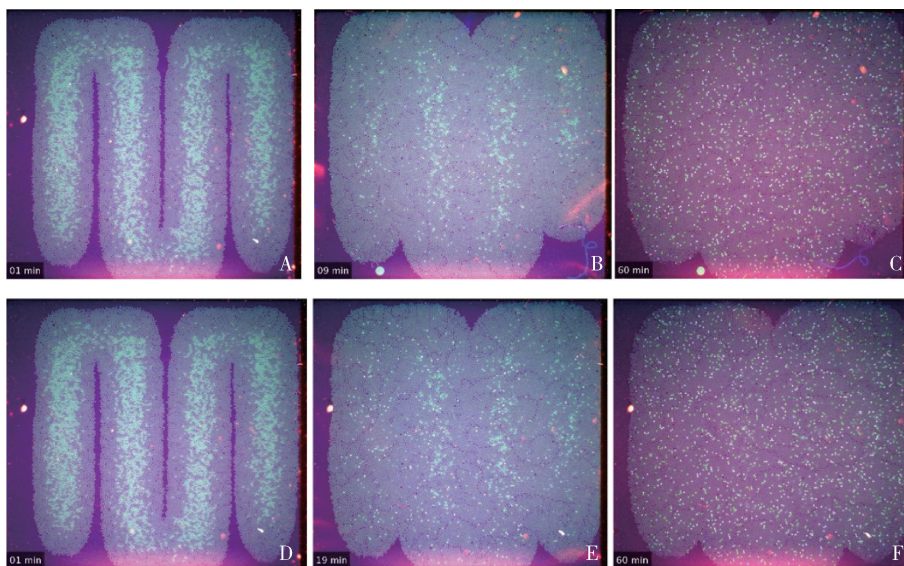


图 2 Buffer A 与液滴系统的兼容性

A~C. 无核酸酶的水;D~F. Buffer A。A、D. 液滴生成结束;B、E. 初见荧光信号(白色液滴);C、F. 扩增结束

2. 传统核酸扩增检测时,成千上万条核酸序列在 PCR 管中混合在一起对靶序列的扩增造成限制或干扰。常规恒温反应虽能规避仪器对温度控制原件的需求,但也正是因为单一温度无法对扩增过程产生的非特异性产物进行变性而产生非特异性信号。液滴系统则将样本中大量的核酸序列分散到各个液滴中,

使每个液滴包含一个或不包含目标核酸序列,在随后的扩增过程确保了所有目标序列平等和独立地扩增。但常见的液滴扩增系统大多在扩增终点信号进行“是”或“否”的判别,无法判断该信号是否为非特异性信号。本实验所用仪器中内置了高分辨率相机,每隔 1min 对样本液滴进行拍照记录,实现液滴中实时

荧光监测。为了测试相机捕捉的荧光强度是否符合扩增规律,实验首先选定阳性对照中特定液滴的 FAM 通道(ORF1ab 基因),将其荧光经过处理后得到图 3A 所示,该荧光信号强度随时间的增加而增强,最早可在第 6min 观察到扩增信号。将该液滴的荧光

强度进行曲线拟合,结果如图 3B 所示,可见该曲线与金标准 qPCR 扩增曲线类似,有基线期、对数期和平台期。说明用拍照实时监测荧光的方式与 qPCR 相当,可区分液滴是否有扩增。

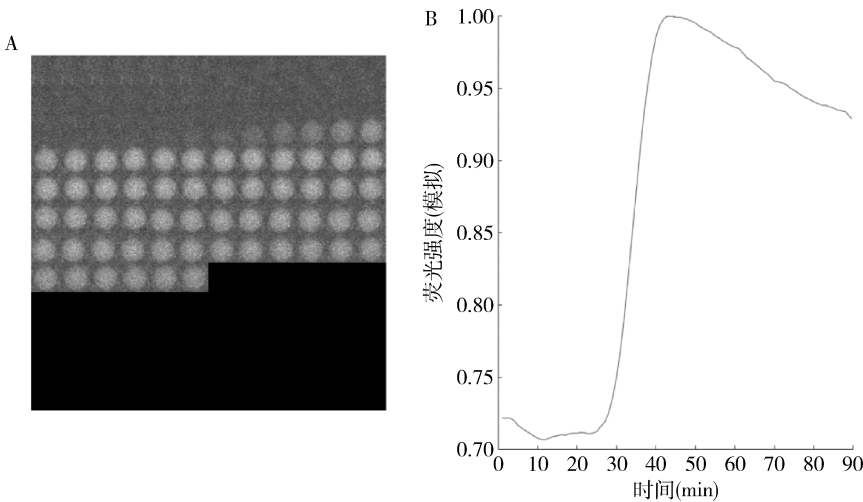


图 3 单个液滴中 ORF1ab 基因扩增曲线图
A. 单个液滴中 ORF1ab 基因扩增荧光亮度;B. 液滴中 ORF1ab 基因扩增曲线

3. 在 qPCR 检测过程中,仪器在特定的波长对每个样本进行荧光扫描,随设定时间记录荧光数据。而在本次实验中采用拍照方式可实现对样本产生的大量液滴进行相关信息的记录,包括液滴产生、液滴扩增以及样本中每个液滴的荧光变化。为了确认每个被机器确认为阳性的液滴中无特异性扩增信号,实验对阳性液滴进行了如图 3 相同的处理,得到大量液滴的扩增曲线,结果如图 4 所示。其中 ORF1ab 基因分析了 640 个阳性液滴,N 基因扩增曲线含 634 个阳性液滴,以及内参 GAPDH 基因的 852 个阳性液滴。由图可见,每个基因的阳性液滴均有扩增,在反应结束时已无新扩增信号,说明液滴中无非特异性扩增。但在同一基因的一时刻,不同液滴的扩增阶段不同,说明每个反应中各个液滴的扩增速度不一致。

为了对比通过拍照记录的荧光信号规律是否同金标准 qPCR 一致,笔者制备了与预加到 ddPCR 系统相同的 PCR 反应液,进行了 qPCR 实验。实验同 ddPCR 一样,60℃ 恒温扩增 60min,结果如图 5 所示。由图可见,多数样本在 30min 处达到指数扩增阶段,在 50min 时扩增结束。而 ddPCR 由于液滴体积较小,反应更为迅速,体现在图 4 中则表现在 30min 时,部分液滴达到了扩增的平台期。对比图 4 和图 5,表明通过拍照记录荧光信号的 ddPCR 与金标准 qPCR 一致,其结果可靠。

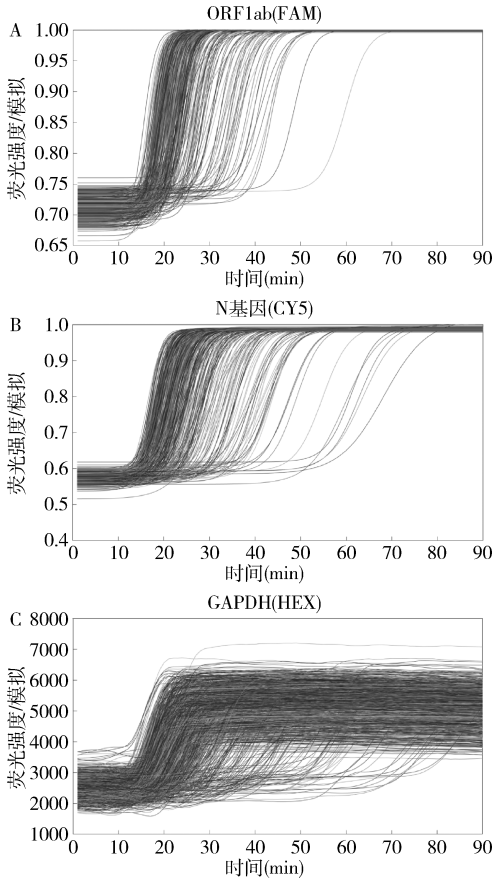


图 4 不同基因的平行液滴扩增曲线图
A. ORF1ab;B. N 基因;C. GAPDH

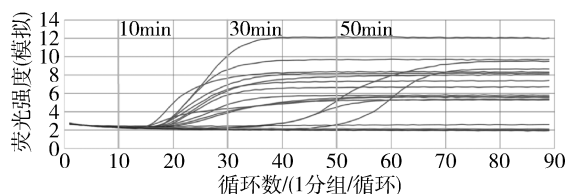


图5 利用 SARS-CoV-2 检测试剂盒进行 qPCR 检测结果

4. 由于扩增起始时间和速度不同,本研究进一步研究了大量液滴中各基因扩增的循环数阈值 (cycle

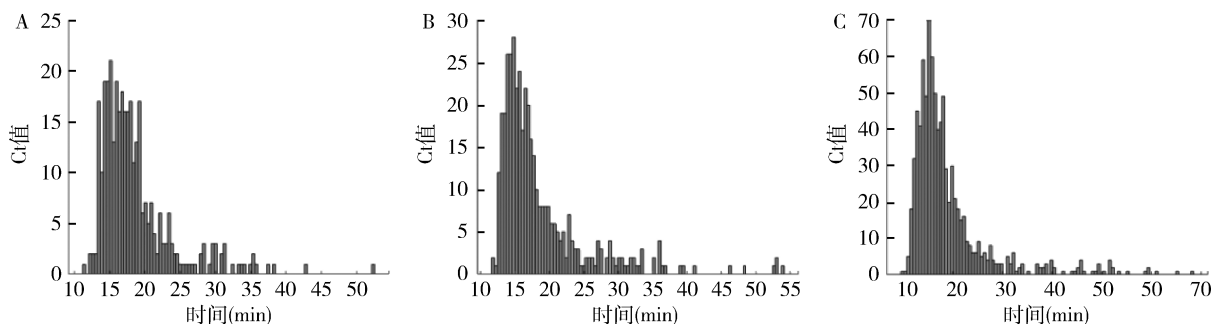


图6 阳性液滴中各信号的 Ct 值

A. ORF1ab; B. N 基因; C. GAPDH

讨 论

本研究将 SARS-CoV-2 检测试剂盒的应用推广到一款集液滴生成、循环扩增、信号读取于一体的 ddPCR 平台,首先验证了检测试剂与 ddPCR 油相系统有良好的兼容性,扩增过程中未发生液滴融合或破碎。即使是在有表面活性剂成分的情况下,各基因均有良好的扩增。但在恒温反应下,液滴只能靠振动后的动能缓慢平铺,从产生到平铺所用的时间相对较长,若在 PCR 反应中,温度变化则会加快液滴平铺速度。此外,由于 Buffer A 具有细胞裂解功能,使得该体系适用于免提取、大规模样本的采集检测。

随后,研究通过记录 FAM 荧光通道下特定液滴的荧光强度,并对荧光值进行拟合得到扩增曲线,验证了该曲线与金标准 qPCR 扩增曲线一致,实现了将扩增曲线分析与高敏感度的液滴系统相结合,用于判定液滴扩增的特异性。本研究还利用拍照可记录大量液滴荧光的优点,分析得到了大量阳性液滴中的扩增曲线。此外,大量液滴的扩增曲线表明 3 个基因在阳性液滴中均有扩增,但各个液滴的扩增速度并不一致,可能的原因是恒温反应下,液滴内无温度循环,各种物质相对运动较慢,相互碰撞而产生反应的时间不同。同时扩增曲线显示,反应结束时未见新的扩增信

threshold, Ct),将图 4 中各基因的部分扩增曲线进行分析得到了如图 6 所示的 Ct 值结果。由图可见,对 340 个液滴的 Ct 值分析显示,ORF1ab 基因最早可在第 11min 达检测阈值,最晚在 52min;320 个液滴中 N 基因的 Ct 值最小为 11,最大为 54min;对 412 个液滴扩增的 Ct 值分析得出,内参基因 GAPDH 最小 Ct 值在第 10min,最大在 69min。3 个基因的大部分液滴的 Ct 值在 12~25 之间,即最早可在第 12min 观察同时到 3 个基因的扩增,完成对病毒的定性检测。

号,表明反应在终点无非特异性信号。

最后对扩增曲线进行了 Ct 值的分析,发现各基因 Ct 值分布较广,差异较大,但是扩增时间较短,ORF1ab 基因、N 基因和内参基因 GAPDH 的大部分液滴的 Ct 值在 12~25min 之间,快速完成对病毒的定性检测。

本研究中所涉及的一体式 ddPCR 平台集众多优点于一身。首先,其操作简便,仅需实验人员配制反应液后上机即可,无需过多手动操作,节约实验时间。其次,该平台利用油包水的形式生成液滴,相比于微流控控制的液滴生成法,仅需的耗材是液滴生成针、液滴生成油、4 孔板及板盖,节约了大量耗材成本。而且,由于反应恒温,未来还可探索改造 PCR 反应元件,无需精密的温控系统从而降低仪器成本。此外,该平台目前样本上样后液滴振动平铺的速度较慢,但是对于定性实验来讲,液滴量无需太多,试剂成本和检测时间都将会大幅降低。同时还可以对荧光通道数、敏感度、特异性、通量以及检测位点进一步优化,检测更加复杂背景下的靶标序列。

但本研究所用的平台也有不足之处:①仪器需要极高分辨率的拍照设备来区分记录每个液滴的实时状态和信号,由此使得仪器价格相对昂贵;②生成液

滴的水油系统可能与其他试剂盒的各种水相试剂不兼容,比如扩增酶中可能含有的金属离子,扩增缓冲液中不同浓度的盐离子等,导致生成的液滴不稳定,在扩增过程中发生融合。因此,在平台进行新检测的应用前,需要进行早期的兼容性测试和调整。

随着该技术的不断成熟,凭借其特有的优势,在传染病早期检测中甚至有可能取代 qPCR 成为检测金标准。在医学检验方面,在传染病快速检测、癌症的液体活检、无创产前检查和药物基因组学等领域具有较大临床应用潜力和优势,和 NGS 测序技术的优势互补也令人期待。该方案的初步建立,其应用范围有待于进一步扩大。该系统在整个扩增过程恒温,对环境和设备要求低、延展性强、免核酸提取的特性,可用于建立一体化可移动的 PCR 实验室,对流行病的传播监测的发展起到重要的推进作用。

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

1 Gharizadeh B, Yue J, Yu M, *et al.* Navigating the pandemic response life cycle: Molecular diagnostics and immunoassays in the context of covid - 19management[J]. IEEE Rev Biomed Eng, 2021, 14: 30 - 47

2 Fuchiwaki Y, Nagai H, Saito M, *et al.* Ultra - rapid flow - through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 27(1): 88 - 94

3 Maltezos G, Johnston M, Taganov K, *et al.* Exploring the limits of ultrafast polymerase chain reaction using liquid for thermal heat exchange: a proof of principle[J]. Appl Phys Lett, 2010, 97: 26

4 Yin H, Wu ZH, Shi N, *et al.* Ultrafast multiplexed detection of sars - cov - 2 rna using a rapid droplet digital pcr system[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021, 188, doi: 10. 1016/j. bios. 2021. 113282

5 Wong YP, Othman S, Lau YL, *et al.* Loop - mediated isothermal amplification (lamp): a versatile technique for detection of micro - organisms[J]. J Appl Microbiol, 2018, 124(3): 626 - 643

6 Honsvall BK, Robertson LJ. From research lab to standard environmental analysis tool: will nasba make the leap? [J]. Water Res, 2017, 109: 389 - 397

7 Ochert AS, Boulter AW, Birnbaum W, *et al.* Inhibitory effect of salivary fluids on pcr: potency and removal[J]. PCR Methods Appl, 1994, 3(6): 365 - 368

8 Perkins G, Lu H, Garlan F, *et al.* Droplet - based digital pcr: application in cancer research[J]. Adv Clin Chem, 2017, 79: 43 - 91

9 Sundberg SO, Wittwer CT, Gao C, *et al.* Spinning disk platform for microfluidic digital polymerase chain reaction[J]. Anal Chem, 2010, 82(4): 1546 - 1550

10 Yao J, Luo Y, Zhang Z, *et al.* The development of real - time digital pcr technology using an improved data classification method[J]. Biosens Bioelectron, 2022, 199: 113873

11 Zhou S, Gou T, Hu J, *et al.* A highly integrated real - time digital pcr device for accurate DNA quantitative analysis[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 128: 151 - 158

12 Tang YW, Lozano L, Chen X, *et al.* An isothermal, multiplex amplification assay for detection and genotyping of human papillomaviruses in formalin - fixed, paraffin - embedded tissues[J]. J Mol Diagn, 2020, 22(3): 419 - 428

(收稿日期: 2022 - 09 - 12)

(修回日期: 2023 - 02 - 01)

血清内脂素作为人体衰老生物学标志物的相关性研究

刘媛媛 王 瑶 霍 达 李雪飞 曾律滔 范国庆 张立群 庞 婧 张铁梅 蔡剑平 崔 菊

摘 要 **目的** 探讨血清内脂素水平作为评估人体衰老程度的生物学标志物的潜力。**方法** 共招募 248 例年龄 25 ~ 90 岁的受试者,采用酶联免疫吸附试验测定血清内脂素水平,结合各项身体指标进行统计学分析。**结果** Spearman 相关性分析结果显示,血清内脂素水平与年龄呈负相关($r = -0.186, P = 0.003$)。将受试者按年龄分为 3 个区间,采用方差分析或秩和检验结果显示,年龄与血清内脂素水平、估算肾小球滤过率、胰岛素样生长因子 1、免疫球蛋白 M 呈负相关;与体重指数、腰臀比、全身脂肪质量、全身脂肪质量指数、D - 3 羟基丁酸、游离脂肪酸、空腹血糖、胰岛素、胰岛素抵抗指数、胆碱酯酶、乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶、

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC2000300);国家自然科学基金资助项目(82073264);深圳合成生物学创新研究院科研基金资助项目(DWK20210009);北京市东城区优秀人才培养资助项目(2022 - dehrpyzz - 66)

作者单位:100730 北京医院、国家老年医学中心、国家卫生健康委北京老年医学研究所、国家卫生健康委北京老年医学重点实验室、中国医学科学院老年医学研究院(刘媛媛、王瑶、霍达、曾律滔、范国庆、张立群、庞婧、张铁梅、蔡剑平、崔菊);518055 中国科学院深圳先进技术研究院、深圳合成生物学创新研究院、中国科学院定量工程生物学重点实验室(李雪飞)

通信作者:崔菊,电子信箱:cuiju4366@bjhmoh.cn