

<http://www.journals.zju.edu.cn/med>

基于悬浮芯片技术的56种病原微生物的高通量检测

朱海红, 蒋汉梁, 陈 智, 曹清毅, 孙 箴, 侯晓丽, 周林福,
陈 峰, 羊正纲, 贾红宇, 许晓燕

(浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的:建立高通量、快速、可靠、经济的病原微生物诊断技术平台。方法:设计和合成针对56种常见病原微生物的探针和阳性对照,采用悬浮芯片技术,对56种病原微生物的阳性标准品进行检测。结果:56种标准品的检测值显著高于阴性对照,各病原微生物的阳性标准品和各探针之间无交叉反应。结论:建立了高通量、快速、可靠、经济的病原微生物诊断技术平台,为突发传染病的病原体诊断提供技术储备。

[关键词] 微生物学技术; 基因表达; 悬浮芯片技术; 高通量诊断; 病原微生物

[中图分类号] R 372 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2007)06-0524-07

A high-throughput diagnostic method for detecting pathogenic microbes

ZHU Hai-hong, JIANG Han-liang, CHEN Zhi, et al (*Institute of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China*)

[Abstract] **Objective:** To develop a high-throughput diagnostic method with suspension array technique for detecting pathogenic microbes. **Methods:** The probes and positive controls of 56 kinds of pathogenic microbes were designed, synthesized, and used to detect pathogenic microbes with suspension array technique. **Results:** Fluorescence signals of 56 positive controls were higher than those of the negative controls, and there was no cross-reaction between the probes and positive controls of different microbes. **Conclusion:** Based on suspension array technique, the high-throughput diagnostic method may be useful in clinical detection of pathogenic microbes.

[Key words] Microbiological techniques; Gene expression; Suspension array technique; High-throughput diagnosis; Pathogenic microbes

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007, 36(6):524-530.]

目前传染病仍是危害人类健康、导致死亡的重要原因。2006年全国共报告法定传染病发病4 608 910例,死亡10 726人。报告发病率为352.48/10万,报告死亡率为0.82/10万,病死

收稿日期: 2007-07-16 修回日期: 2007-08-23

基金项目:浙江省科技厅重大项目(2003C13015);浙江省医药卫生科学研究基金项目(2006B029)。

作者简介:朱海红(1972—),女,副研究员,传染病学专业。

通讯作者:陈 智(1956—),男,教授,博士生导师,从事病毒性肝炎的机制、防治研究以及病原微生物高通量诊断技术研究;E-mail:chenzhi@zju.edu.cn

率为0.23%。

自20世纪70年代以来,全世界相继发现了30多种新的传染病,其中不少传染病为爆发流行,在短期内使数以万计的人罹患疾病并造成大规模的人群死亡。一些多年没有发生的恶性传染病如鼠疫、霍乱、登革热等又死灰复燃。因此,如何有效地对传染病进行控制,将仍然是医学研究领域的重点。

病原微生物的快速检出是及时、准确地预测、预报和预警的关键。只有明确病原微生物后,才能及时、准确地预测、预报和预警,医师和各职能部门才能判断该种疾病的患者是否需要隔离,如何进行消毒切断传播途径,以及是否需要预防接种以提高易感人群的免疫力。如果病原微生物未被及时诊断,那么就会造成在人群中扩散。

因此,只有建立高通量、快速、可靠、经济的病原微生物诊断平台,才能切实有效地控制传染病的发生与流行。本研究利用悬浮芯片(suspension array)技术^[1-3],对56种病原微生物的阳性标准品进行检测,探索建立传染病的高通量、快速诊断技术平台,为突发传染病病原体的快速诊断提供技术储备。

1 材料与方法

1.1 探针和阳性对照设计和合成

1.1.1 病原微生物选择:选取《中华人民共和国传染病防治法》涉及的病原微生物和导致常见感染的病原微生物:腮腺炎病毒(Mumps virus),呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus),流感病毒(Influenza viruses),副流感病毒(Parainfluenza viruses),人埃可病毒(Human echovirus),单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus),风疹病毒(Rubella virus),脊髓灰质炎病毒(Human poliovirus),人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus),柯萨奇病毒(Coxsackievirus),狂犬病病毒(Rabies virus),麻疹病毒(Measles virus),人疱疹病毒3(Human herpesvirus 3),西尼罗病毒(West Nile virus),日本乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus),登革病毒(Dengue virus),汉滩病毒(Hantaan virus),铜绿假单胞菌

(*Pseudomonas aeruginosa*),结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*), *Mycobacterium ulcerans*,霍乱弧菌(*Vibrio Cholerae*),炭疽杆菌(*Bacillus anthraci*),表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*),肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*),无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*),小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*),单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*),无害李斯特菌(*Listeria innocua*),猪霍乱沙门菌(*Salmonella enterica*),副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),禽流感病毒(*Avian Influenza Virus*),输血传播病毒(TTV),肠腺病毒(*Enteric adenoviruses*),刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*),梅毒螺旋体(*Treponema Pallidum*),沙眼衣原体(*Chlamydia Trachomatis*),轮状病毒(*Rotavirus*),嵌杯状病毒(*Calicivirus*),星状病毒(*Astrovirus*),鼻病毒(*Rhinovirus*), α 病毒(*Alphavirus*),普氏立克次体(*R. prowazekii*),东方立克次体(*R. tsutsugamushi*),人免疫缺陷病毒A(HIV-A),人免疫缺陷病毒B(HIV-B),人免疫缺陷病毒C(HIV-C),甲型肝炎病毒(HAV),乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV),戊型肝炎病毒(HEV),大肠杆菌(*E. coli*),沙门菌(*Salmonella*),嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),空肠弯曲菌(*C. jejuni*)。

1.1.2 特异性探针(probe)设计和合成:通过生物信息学设计并合成56种病原微生物的特异性探针,每条特异性探针的5'→3'依次为:5'-氨基-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-病原微生物特异序列-3',详见表1。

1.1.3 标准品、阳性对照设计和合成:标准品序列为上述56种病原微生物探针序列的反义序列,并在5'端添加序列5'-gagacctactgggaaactttttttt-3',作为报道分子结合的互补序列,详见表2;阳性对照为5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3',与探针的18个T互补,可观察探针标记的效率。

表1 56种病原微生物名称、探针序列

Table 1 Name and specific probes of 56 kinds of pathogenic microbes

病原微生物名称	探针编号	探针序列
Mumps virus	P1	5'>CCATGCAGGCGGTCACATTCRACAACACTGC<3'
Respiratory syncytial virus	P2	5'>CACCATCCAACGGAGCACAGGAGAT<3'
Influenza viruses	P3	5'>CTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAAATG<3'
Parainfluenza viruses	P4	5'>TAGGCCAAAGATTGTTGTGCGAGACTATTCCAA<3'
Human echovirus	P5	5'>GCCGAGAAGGTAGCCAAGGGAAAGT<3'
Herpes simplex virus	P6	5'>TCCCAATCGATTTTCGCGGAAGAAC<3'
Rubella virus	P7	5'>CTGGGCTGTCAACGCCCTACTCCTCT<3'
Human poliovirus	P8	5'>AGATGGTGTGGAGAAGATTGGATTTCGGGAC<3'
Human cytomegalovirus	P9	5'>CCTACCACCGCAGTTGCTCTTTTCAC<3'
Coxsackievirus	P10	5'>CGGTCTTGTGGGGTTTGCTGATGTT<3'
Rabies virus	P33	5'>ATCCCCGCCGCTTATCCAACCACTA<3'
Measles virus	P34	5'>TGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTT<3'
Human herpesvirus 3	P11	5'>GCGGATTTAGTGATTGTTGGGGATA<3'
West Nile virus	P14	5'>ACCAACGCCATCAGTAGAAGGAGCGAAAAG<3'
Japanese encephalitis virus	P12	5'>TGGAGAAGCCACACAACGAGAAGCGA<3'
Dengue virus	P13	5'>TCTACGGGGCTGCTTTCAGTGGGGT<3'
Hantaan virus	P17	5'>TTTGTGAGGTTACTGTCACGGCAGATGTT<3'
Pseudomonas aeruginosa	P15	5'>GCTTCATTGATTTTAGCGGAAC<3'
Mycobacterium tuberculosis	P16	5'>TGTCGACCTGGGCAGGGTTCG<3'
Mycobacterium ulcerans	P18	5'>CACCACGCAGCATTCCTGCCGT<3'
Vibrio Cholerae	P21	5'>TCAACCGATGCGATTGCCCAAGA<3'
Bacillus anthraci	P22	5'>TGTACAGGGGGCGGGCGGTC<3'
Staphylococcus epidermidis	P23	5'>CACCCGAAGCCGGTGGAGTAAC<3'C
Staphylococcus aureus	P24	5'>AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTTCCACA<3'
Haemophilus influenzae	P25	5'>CACCACATCAAAACGAATGAGCGTGG<3'
Streptococcus pneumoniae	P26	5'>TGGCGCCATAAGCAACACTCGAA<3'
Streptococcus agalactiae	P27	5'>ATCAGAAGAGTCATACTGCCACTTC<3'
Yersinia enterocolitica	P28	5'>CAAGCAAGCTTGATGATCCTCG<3'
Listeria monocytogenes	P29	5'>TTCTTGGCGGCACATTTGTCACTGCA<3'
Listeria innocua	P30	5'>TTCGAATTGCTAGCGGCACACCAGT<3'
Salmonella enterica	P31	5'>TCTGGTTGATTTCCTGATCGCA<3'
Vibrio parahaemolyticus	P32	5'>CGCTACGTAAAGCACCATGCAGAAGACTC<3'
Avian Influenza Virus	P19	5'>TCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA<3'
TTV	P20	5'>GTGACCCCAAACCTTACAACCTTC<3'
Enteric adenoviruses	P35	5'>GTAAACACTCCCCACCGTGCCCTCA<3'
Toxoplasma gondii	P36	5'>AGTAGTGCGAACGAGTAGGGATAAGA<3'
Treponema Pallidum	P37	5'>TCTGTTGTGCGTGGCGGGTATGGGGTT<3'
Chlamydia Trachomatis	P38	5'>TTTGCCGCTTTGAGTTCTGCTTCCT<3'
Rotavirus	P39	5'>TCAGCAAACAGATGAGGCGAATAAA<3'
Calicivirus	P40	5'>AAACCTAAAACACCAAAGCCCCACCGACCA<3'
Astrovirus	P41	5'>ATACTCACAACCTTACGGCAAGGCAC<3'
Rhinovirus	P42	5'>GCCTCACAAATAAACTAAAAGCCCCAA<3'

表1(续)

病原微生物名称	探针编号	探针序列
Alphavirus	P43	5'>TAACACCATACGCATACAGACTTCCGCCC<3'
R. prowazekii	P44	5'>GTGAAAGTTGTATTACGACCGCTCCC<3'
R. tsutsugamushi	P45	5'>GGTGAGCAATATGATTGAAGCTGGAG<3'
HIV-A	P46	5'>CAATAACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTAT<3'
HIV-B	P47	5'>CCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGG<3'
HIV-C	P48	5'>CTGAGCACCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCA<3'
HAV	P49	5'>AGACAAAAACCATTCAACGCCGGAGG<3'
HBV	P50	5'>TGATAAAACGCCGACAGACACATCCA<3'
HCV	P51	5'>ATTGGGGCGTGCCCCGC<3'
HEV	P52	5'>CGAACCACCACAGCATTCGCCA<3'
E. coli	P53	5'>TGTTTCGACACACTATCATT<3'
Salmonella	P54	5'>TGACTCGTCACACTATCATT<3'
Aeromonas hydrophila	P55	5'>TGGAACGGTCCTGGAAAGGC<3'
C. jejuni	P56	5'>TATAGAGATATACATTACCT<3'

表2 56种病原体的阳性对照

Table 2 Positive controls of 56 kinds of pathogenic microbes

病原体	阳性对照序列
Mumps virus	5'>GCAGTTGTYGGAATGTGACCGCTGCATGG<3'
Respiratory syncytial virus	5'>ATCTCCTGTGCTCCGTTGGATGGTG<3'
Influenza viruses	5'>CATTTTGGACAAAGCGTCTACGCTGCAG<3'
Parainfluenza viruses	5'>TTGGAATAGTCTCGACAACAATCTTTGGCCTA<3'
Human echovirus	5'>ACTTTCCCTTGGCTACCTTCTCGGC<3'
Herpes simplex virus	5'>GTTCTTCCCGCGAAATCGATTGGGA<3'
Rubella virus	5'>AGAGGAGTAGGCGTTGACAGCCCAG<3'
Human poliovirus	5'>GTCCCCAAATCCAATCTTCTCCAACACCATCT<3'
Human cytomegalovirus	5'>GTGAAAGAGCAACTGCGGTGGTAGG<3'
Coxsackievirus	5'>AACATCAGCAAACCCACAAAGACCG<3'
Rabies virus	5'>TAGTGGTTGGATAAGCGCGGGGAT<3'
Measles virus	5'>AAATGAGCGGCTTGGGCTGTAAACA<3'
Human herpesvirus 3	5'>TATCCCCAACAATCACTAAATCCGC<3'
West Nile virus	5'>CTTTTCGCTCCTTCTACTGATGGCGTTGGT<3'
Japanese encephalitis virus	5'>TCGCTTCTCGTTGTGGGCTTCTCCA<3'
Dengue virus	5'>ACCCCACTGAAAGCAGCCCCGTAGA<3'
Hantaan virus	5'>AACATCTGCCGTGACAGTAACCTCAACAAA<3'
Pseudomonas aeruginosa	5'>GTTCCGCTAAAAATCAATGAAGC<3'
Mycobacterium tuberculosis	5'>CGAACCCCTGCCAGGTCGACA<3'
Mycobacterium ulcerans	5'>ACGGCAAGAATGCTGCGTGGTG<3'
Vibrio Cholerae	5'>TCTTGGGCAATCGCATCGGTTGA<3'
Bacillus anthracis	5'>GACCGCCCGCCCCCTGTACA<3'
Staphylococcus epidermidis	5'>GGTTACTCCACCGGCTTCGGGTG<3'

表2(续)

病原体	阳性对照序列
<i>Staphylococcus aureus</i>	5'>TGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATT<3'
<i>Haemophilus influenzae</i>	5'>CCACGCTCATTTCGTTTGATGAGTGGTG<3'
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5'>TTCGAGTGTGTGCTTATGGGCGCCA<3'
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5'>GAAGTGGCAGTATGACTCTTCTGAT<3'
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5'>CGGAGGATCACAAGCTTGCTTG<3'
<i>Listeria monocytogenes</i>	5'>TGCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAA<3'
<i>Listeria innocua</i>	5'>ACTGGTGTGCCGCTAGCAATTCGAA<3'
<i>Salmonella enterica</i>	5'>TGCGATCAGGAAATCAACCAGA<3'
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5'>GAGTCTTCTGCATGGTGCTTAACGTAGCG<3'
Avian Influenza Virus	5'>TGCTAGGGAACCTGCCACTGTTGA<3'
TTV	5'>GAAGGGTTGTAAGGTTTGGGGTCAC<3'
Enteric adenoviruses	5'>TGAGGGCACGGTGGGGAGTGTTTAC<3'
<i>Toxoplasma gondii</i>	5'>TCTTATCCCTACTCGTTCGCCACTACT<3'
<i>Treponema Pallidum</i>	5'>AACCCCATACCCGCCACGCACAACAGA<3'
<i>Chlamydia Trachomatis</i>	5'>AGGAAGCAGAACTCAAAGCGGCAAAA<3'
Rotavirus	5'>TTTATTCGCCTCATCTGTTTGCTGA<3'
Calicivirus	5'>TGGTCGGTGGGGCTTTGGTGTTTTAGGTTT<3'
Astrovirus	5'>GTGCCTTGCCGTAAGTTTGTGAGTAT<3'
Rhinovirus	5'>TTGGGGCTTTTAGTTTATTGTGAGGC<3'
Alphavirus	5'>GGGCGGAAGTCTGTATGCGTATGGTGTTA<3'
<i>R. prowazekii</i>	5'>GGGAGCGGTCGTAATACAACCTTCAC<3'
<i>R. tsutsugamushi</i>	5'>CTCCAGCTTCAATCATATTGCTCAC<3'
HIV-A	5'>ATAATTGTCTGGCCTGTACCGTCACGTTATTG<3'
HIV-B	5'>CCACTGTGTTTAGCATGGTGTTTAAATCTTGTGG<3'
HIV-C	5'>TGCCATTGTACTGCTGTCTTAAGGTGCTCAG<3'
HAV	5'>CCTCCGGCGTTGAATGGTTTTTGTCT<3'
HBV	5'>TGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA<3'
HCV	5'>GCGGGGGCACGCCCAAAT<3'
HEV	5'>TGGCGAATGCTGTGGTGGTTCC<3'
<i>E. coli</i>	5'>AATGATAGTGTGTCGAAACA<3'
<i>Salmonella</i>	5'>AATGATAGTGTGACGAGTCA<3'
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5'>GCCTTTCAGGACCGTTCCA<3'
<i>C. jejuni</i>	5'>AGGTAATGTATATCTCTATA<3'

1.1.4 阴性对照:以质粒 pcDNA3.1 为阴性对照。

1.1.5 报道分子(reporter)设计和合成:5'-biotin-aaaaaaaaagttccagtaggtctc-3'。

1.2 主要仪器及试剂 Liquichip 悬浮芯片系统(Qiagen 公司,德国);直径~5.6 μm 羧基化荧光微球(Luminex 公司,美国);链亲和素-藻

红蛋白(Qiagen 公司,德国)。

1.3 方法

1.3.1 探针交联微球:每个探针与相应的微球通过交联反应而连接在一起。5×10⁶个羧基化微球悬浮于 50 μl 100 mmol/L 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 4.5 的反应液中,加入 1 nmol 的氨基化的探针分子,

加入 25.0 μg 的交联剂 N-(3-Dimethylamino-propyl)-N-ethylcarbodiimide (EDC) (Pierce Chemical, Rockford, IL) 后,避光反应 30 min,再加入 25 μg 交联剂 (EDC),再避光反应 30 min。反应结束后,用 0.02% Tween-20 液洗一次,在用 0.1% SDS 液洗涤一次。最后,将标记有探针的微球悬浮于 TE, pH 8.0 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA), 2~8℃ 避光保存^[4]。

1.3.2 杂交和上机检测: 0.2 ml 的 eppendorf 管中,加入 38 μl 的 5×SSC 杂交液(内含每一种标记有型特异性探针的微球各 5 000 个),加入 12 μl 1.67 $\mu\text{mol/L}$ 的阳性对照或阴性对照 (1.67 $\mu\text{mol/L}$ 浓度), 12 μl 1.67 $\mu\text{mol/L}$ 的报告分子 reporter 1.67 $\mu\text{mol/L}$ 。在 PE 9600 PCR 仪上, 95℃ 变性 5 min, 55℃ 杂交 15 min。反应结束后,在 96-well microtiter plates (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 USA) 上, 100 μl 2×SSC/0.02% Tween-20 液洗涤微球两次。最后,将重悬于 75 μl 2×SSC/0.02% Tween-20 液。加入 25 μl 藻红蛋白 (Streptavidin-R-phycoerythrin, 10 $\mu\text{g/ml}$ 溶于 2×SSC/0.02% Tween-20)。避光室温反应 5 min。每个反应设 3 复孔。最后,在 Luminex¹⁰⁰ analyzer 上进行检测^[4]。

1.3.3 两组数据比较进行 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 56 种病原微生物阳性对照的检测值均数

按表 1 顺序分别为 2893, 1167, 2725, 4089, 2325, 4229, 3036, 3131, 4171, 3875, 6779, 3343, 4174, 4285, 5446, 7028, 7270, 4291, 6289, 5286, 7224, 7563, 3636, 3154, 3974, 5767, 5121, 5411, 7060, 5992, 6658, 2327, 5535, 4945, 3516, 4090, 5051, 7061, 4517, 2559, 4423, 2719, 5365, 4575, 5164, 4360, 4184, 4563, 4124, 5261, 4809, 5382, 5873, 5863, 5071, 6045。

2.2 56 种标准品的检测值均数 按照表 1 顺序分别为 6392, 5595, 3764, 5941, 5761, 6042, 5952, 6573, 5666, 7388, 5367, 6714, 6436, 4171, 5418, 5268, 3031, 5757, 6928, 4705, 5740, 5620,

6380, 5593, 4849, 6669, 3691, 5208, 4090, 4363, 3940, 3903, 5226, 5061, 7212, 5239, 6366, 3913, 4031, 5102, 4693, 5165, 5723, 6350, 4381, 4505, 4611, 4458, 5769, 5638, 3806, 6197, 4127, 4422, 5553, 3516。

阴性对照的检测值低于 100, 平均值为 56。

56 种标准品的检测值高于阴性对照, 有统计学意义 ($P < 0.05$), 各病原微生物的阳性标准品和各探针之间无交叉反应。

3 讨论

本研究选择了《中华人民共和国传染病防治法》所涉及传染病的病原体, 以及常见的一些消化道、呼吸道感染的病原体, 结合生物信息学设计了探针, 采用悬浮芯片技术, 对 56 种病原微生物的阳性标准品进行了检测。本诊断技术为突发传染病病原体的诊断提供了技术储备。

病原微生物的快速检出在感染性疾病的诊治中具有决定性作用。这将对指导临床诊断、合理用药以及疾病控制产生积极影响。但是, 目前临床常用方法的检验项目大多不是针对病原体核酸, 如病原微生物分离培养和药敏试验等耗时长; 病原微生物培养的检测时间在 2~21 d 之间, 药敏试验的检测时间也在 2 d 以上。传统的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测的抗原需要较高的滴度才可以检测到, 而特异性抗体在传染病早期尚未出现或滴度很低, 需等到恢复期或后期才能检测到, 造成诊断困难。并且, 突发未知病原体的传染病时, 其抗原抗体的制备需要较长时间, 短时间内难以迅速研制成功诊断试剂。且这些方法都是各种病原体单独检测, 通量较低。因此, 在许多情况下不能满足临床要求, 更远达不到快速诊断和传染病预报的要求。研发一种可以高通量、快速、灵敏、经济的检测病原微生物的方法迫在眉睫。

高通量的基因芯片技术的出现, 给临床检测带来了很大的希望。但是传统的平面的基因芯片在临床应用一段时间后, 也逐渐暴露出其存在的灵活性较差、检测所需的时间较长、重复性不够理想、价格昂贵等不足。

近年来, 出现了一种基于微球体的高通量检测方法^[1-3]。该项技术是利用微球体作为载体, 荧

光检测仪作为检测平台,对核酸和蛋白质等生物大分子进行高通量测定。不同的微球体单元可以标记上比例不同的2种荧光(均用红色激光检测)作为单元的地址。当不同单元的微球体依次通过荧光检测仪时,仪器对检测到的2种荧光的比例进行分析,从而判断其属于何种单元。因此,不同的微球体单元可以放在同一管中通过荧光检测仪,由计算机软件根据荧光比例判断其单元地址。这些不同单元的微球体标记上不同的探针,就可以检测不同的病原微生物。目前市场上的微球的2种荧光分别有10种浓度,共有100种微球。因此,该技术可以实现临床的高通量、快速检测病原微生物的要求。

这项技术的优点在于:①通量高,有100种微球,可同时进行100种靶分子诊断;②液相环境有利于抗原抗体反应;③检测所需标本量少,本技术用0.1ml的血清就可进行10种以上病原微生物的检测;④可靠性高,本技术是对多个微球体荧光信号进行单独检测后,用配套的软件进行统计分析,使检测结果更加精确、可靠;⑤重复性好,不同地址的微球体分别标记后混合,再分装成小份,用于分别检测各标本,各小份的性质完全一致;⑥灵活性强,不同种类微球是分别标记后再混合的,所以在临床使用时,可以根据不同患者、不同疾病或其他不同需求,从中选择特殊组合的探针,临时搭配所需要的微球,使个体化的检测成为可能。

由于不同病原微生物的探针反应的最佳条件不一致,建立高通量诊断技术时需要将所有56种病原微生物的探针放在一起进行反应,因

此需要筛选出适合同一个反应体系的56种病原微生物的探针。而且,根据生物信息学设计的理论上可行的探针,实际应用中是否可行需要通过实验验证。本项目以5个病原微生物为一组,采用逐步增加的方法筛选56种病原微生物的探针。每个病原微生物至少设计了三条探针,将实验结果显示特异性差的探针剔除,替换上候补探针,最终获得可在同一反应体系中均有较好结果的56种病原微生物特异性的探针(见表1)。

References:

- [1] FULTON R J, MCDADE R L, SMITH PL, et al. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system [J]. *Clin Chem*, 1997, 43: 1749-1756.
- [2] DUNBAR S A, VANDER ZEE C A, OLIVER K G, et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system [J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 53: 245-252.
- [3] IANNONE M A, TAYLOR J D, CHEN J, et al. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry [J]. *Cytometry*, 2000, 39: 131-140.
- [4] JIANG H L, ZHU H H, ZHOU L F, et al. Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55: 715-720.

[责任编辑 张荣连]