



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116694459 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 05

(21) 申请号 202310718989.9

(22) 申请日 2023.06.16

(71) 申请人 四川大学

地址 610064 四川省成都市望江路29号

(72) 发明人 李峰 董天彧

(74) 专利代理机构 北京领科知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 11690

专利代理师 张丹 王立红

(51) Int. Cl.

C12M 1/38 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/24 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

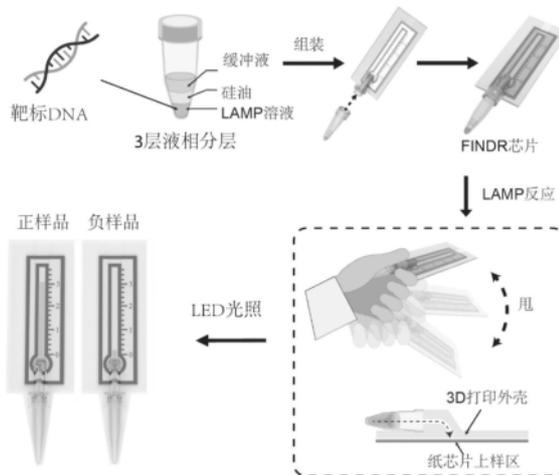
权利要求书2页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

一种便携式核酸检测系统

(57) 摘要

本发明公开了一种便携式核酸检测系统,该核酸检测系统包括:对靶标核酸进行LAMP反应的核酸扩增反应管;能显示扩增子移动距离的芯片部件;为LAMP反应提供反应环境并为扩增子的检测提供光照条件的便携式扩增检测一体机。本发明采用读取扩增子移动距离的方式对靶标核酸进行定性、定量检测分析,相较于传统PCR、qLAMP扩增,本发明的检测结果更加鲁棒,操作更加简便、对技术人员和检测设备的要求低;另外,本发明制造成本低、体积小、重量轻,更适用于基层医院、诊所和医疗资源受限制的偏远地区。



1. 一种便携式核酸检测系统,其特征在于:所述核酸检测系统包括:
核酸扩增反应管,其用于对待检测样品的核酸进行环介导等温扩增;
芯片部件,其能与所述核酸扩增反应管可拆卸连接,所述芯片部件内包含纸芯片,所述纸芯片上设置有相互连通的加样区和检测区;所述加样区内预置有荧光染料,所述荧光染料为嵌合型荧光染料。
2. 根据权利要求1所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述检测区的边缘设置用于标记扩增子的移动距离的刻度尺。
3. 根据权利要求1所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述芯片部件包括中间的塑封芯片和粘贴在所述塑封芯片上表面的外壳;
所述塑封芯片包括中间的所述纸芯片和贴附在所述纸芯片上下表面上的塑封膜;
在所述外壳上邻近所述加样区的一端设置有连通所述核酸扩增反应管的管路,所述管路的另一端连通所述加样区。
4. 根据权利要求3所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述纸芯片与下层所述塑封膜之间设置有疏水的密封膜;
在上层所述塑封膜上设置有与所述加样区和所述检测区的图案相同的镂空区域。
5. 根据权利要求3所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述外壳在所述加样区和所述检测区的对应处设置有与所述加样区和所述检测区相匹配的凹槽;
在所述凹槽内设置有倒置的漏斗状结构,漏斗的小开口为所述管路连通所述加样区的管口,漏斗的大开口扣在所述加样区内。
6. 根据权利要求1至4中任一项所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述加样区为圆形,所述检测区为长方形;
所述圆形中设置一段圆弧缺口,所述圆弧对应弦的长度小于等于所述长方形的宽度。
7. 根据权利要求1至4中任一项所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述荧光染料选自SYBRGreenI、EvaGreen或Syto82。
8. 根据权利要求1至4中任一项所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述核酸检测系统还包括LAMP反应试剂、水性隔离剂、酸性缓冲液;
在检测样品时,与添加的先后次序相对应,所述核酸扩增管内由下到上依次分布混合有靶标核酸的所述LAMP反应试剂、所述水性隔离剂、所述酸性缓冲液;
所述酸性缓冲液的pH值为3.0-5.0,所述LAMP反应试剂的pH值为7.2-8.2。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述核酸检测系统还包括便携式扩增检测一体机,其能与所述核酸扩增反应管和所述芯片部件相连接;
所述便携式扩增检测一体机为所述环介导等温扩增反应提供反应环境,并且为所述扩增子的检测提供光照条件。
10. 根据权利要求9所述的便携式核酸检测系统,其特征在于:所述便携式扩增检测一体机包括等温加热模块、光照模块、LCD显示屏、电源;
所述等温加热模块包括电路控制板、加热板、加热块、温度传感器、数字输出转换器和冷却风扇;
所述加热块位于所述加热板上方,且所述加热块上设置盛放所述核酸扩增反应管的孔

洞,所述孔洞在所述加热块上呈矩阵式排列;

所述温度传感器连接所述加热板,优选所述温度传感器内置于所述加热板上,所述温度传感器优选为热电偶;

所述光照模块包括由下至上依次设置的LED灯、芯片插槽、滤光片和观测窗口;

所述电源为内置的可充电电池。

一种便携式核酸检测系统

技术领域

[0001] 本发明属于生物学中的基因检测技术领域,尤其涉及一种便携式核酸检测系统。

背景技术

[0002] 核酸检测是一种从生物样本或临床样本中检测遗传标志物的技术。待检物的遗传信息可以从微量的样本中被提取与分析,以运用于下一步的检测。核酸检测技术被大量运用于疾病检测预防、食品安全分析、生物鉴定等多个领域,尤其是在疾病检测与预防上核酸检测展示了其不可或缺的地位。自1985年由Mullis发明了聚合酶链式反应(PCR)之后,核酸扩增作为一种性能优异的检测方式被广泛运用于各种核酸检测用途上,但PCR需要接受过专门训练的人员使用专业实验仪器进行操作,有着操作步骤复杂、需要专业人员和专门的核酸检测实验室才能运转等一系列问题,所以传统的核酸检测在一般或者大型疾病检测中心的专业实验室进行操作。这些问题都限制了核酸检测部署至现场进行检测。

[0003] 针对将核酸检测技术从实验室中部署至需要检测的现场的需求,世界卫生组织提出了一系列的要求:价格合理、测量灵敏、特异性高、易于使用、高速且可靠、无需额外设备、能运送到最终使用者手上(ASSURED标准)。但是将核酸检测技术集成至一起进行野外部署仍然面临着一系列的难题,比如基于荧光的高精度检测技术需要复杂设备、传统操作流程交叉污染风险大、检测试剂成本过高等问题。所以有许多研究成果将传统核酸检测技术与微流控技术、纳米科技、以及合成生物学技术结合到一起,开发了许多现场检测技术。但这些技术方法依旧有着操作繁琐,有交叉污染风险,需要额外辅助仪器等问题,难以大规模运用到核酸即时检测(POCT, Point-of-care testing)上。

[0004] 得益于PCR扩增反应的高效率、反应可控、使用方便等优点,至今为止仍旧是核酸扩增的金标准。然而PCR本身变温反应的特征使得其对热循环仪等变温设备严重依赖,导致其大多只能部署在中心医院与实验室之中,难以部署至资源受限地区检测疾病传播。因此,大量的等温扩增技术,如环介导等温扩增(LAMP)、滚环扩增反应(RCA)、重组酶聚合酶扩增反应(RPA)、链置换扩增反应(SDA)被开发出来以弥补PCR变温扩增的缺陷。其中LAMP反应使用2到3对引物在65℃恒温下对靶标进行扩增。相对于PCR,LAMP反应有着选择性更高、扩增DNA数量级更多、检测线更低的优势,十分适合检测低丰度的疾病核酸靶标。

[0005] 纸因其廉价、易于获得和易于加工,被认为是制作可现场部署的核酸检测器的优秀原材料。纸基微流控分析装置最早可追溯至2007年Whitesides的研究组,他们创新性的将纸和微流控技术结合到一起,使用光刻法在纸上制作了由环氧树脂基聚合物形成的疏水屏障所构成的图案,通过对纸面进行分区,实现了操控液体样品对多种靶标同时进行检测。2015年Whitesides的研究组开发了将核酸检测完全集成化的微流控装置,他们成功的将样品准备、核酸扩增和检测集成在一个纸基装置上(paper machine)。此装置有着很低的检测线,可以成功检测到最低5个添加入人血清中的大肠杆菌或低至1条人工合成DNA链。在封装纸芯片检测病原体方面,Copper研究组开发了一种基于纸芯片的核酸提取、扩增、检测集成

化纸芯片系统,用于检测人血中的疟疾感染。

[0006] 虽然现在有很多便携核酸检测设备被报导,但这些设备大多难以集成核酸检测的全部功能到一个设备上,需要繁琐的操作以及额外的仪器辅助来量化核酸浓度,无形中增加了核酸检测的操作难度和成本。另外,开放性检测系统极易发生气溶胶交叉污染。

[0007] 因此,将标准核酸检测技术小型化,开发高效、廉价、可现场部署的便携式核酸即时检测平台对疾病检测与控制具有重要意义。既有助于在患者床边或医生办公室进行快速诊断,又可以在资源受限的边远地区或疫情大规模爆发地区有效地监测、管理各种由病毒、细菌、真菌、寄生虫等引起的疾病。

发明内容

[0008] 为了解决上述的技术问题,实现核酸检测技术小型化,开发一种高效、廉价、可现场部署的便携式核酸即时检测平台。

[0009] 第一方面,本发明提供一种便携式核酸检测系统,其包括:

[0010] 核酸扩增反应管,其用于对待检测样品的核酸进行环介导等温扩增;

[0011] 芯片部件,其能与核酸扩增反应管可拆卸连接,芯片部件内包含纸芯片,纸芯片上设置有相互连通的加样区和检测区;加样区内预置有荧光染料,荧光染料为嵌合型荧光染料,其与DNA双链结合后会释放荧光;

[0012] 结合荧光染料的扩增子由核酸扩增反应管进入加样区后,通过毛细作用渗入检测区,能沿检测区流动,在蓝光背景下,人眼能直接观测扩增子在检测区内的移动距离,从而对待检测样品进行定性/定量分析;

[0013] 其中,扩增子在检测区内的移动距离与扩增子的浓度呈正比。

[0014] 优选地,核酸扩增反应管为PCR管,PCR管的体积选自0.1mL、0.15mL、0.2mL、0.5mL中的任意一种,进一步优选为0.2mL。

[0015] 优选地,芯片部件包括中间的塑封芯片和粘贴在塑封芯片上表面的外壳。外壳上设置有连通核酸扩增反应管的管路,管路的另一端连通纸芯片上的加样区。

[0016] 优选地,外壳与塑封芯片通过(例如)透明胶带粘合在一起以保证芯片部件的整体密封性。

[0017] 优选地,外壳由透明塑料经过3D打印而成。

[0018] 优选地,塑封芯片包括中间的纸芯片和贴附在纸芯片上下表面的塑封膜。纸芯片与下层塑封膜之间设置有疏水的密封膜。上层塑封膜上设置有与加样区和检测区的图案相同的镂空区域,以暴露出纸芯片的加样区和检测区(便于加样和观测结合荧光染料的扩增子在检测区的移动距离)。

[0019] 优选地,纸芯片以纤维素纸作为基底,进一步优选采用Whatman No.1纤维素纸。

[0020] 优选地,在纸芯片上,加样区和检测区是亲水的,其他区域是疏水的,以限定样品溶液扩散的区域,其可通过对基底纸进行部分区域疏水化处理实现,例如将融化的蜡渗透进基底纸中。

[0021] 在本发明的一个具体实施方式中,通过打印蜡图案,将其置于基底纸上,加热,使蜡融化渗透进基底纸中,得到蜡限定的检测区域(相互连通的加样区和检测区)。

[0022] 优选地,塑封膜的厚度为100-150 μm ,进一步优选为110-130 μm ,例如:110 μm 、113 μ

m、115 μ m、118 μ m、120 μ m、123 μ m、125 μ m、128 μ m、130 μ m,更优选为125 μ m。

[0023] 优选地,密封膜为石蜡膜,通过石蜡膜可以防止加样区和检测区上的扩增子溶液渗入底层的塑封膜,从而造成扩增子样品溶液的浪费和影响检测结果的准确性。

[0024] 优选地,在进行加样操作时,核酸扩增反应管内的扩增子由核酸扩增反应管依次进入芯片部件外壳上的管路、顶层塑封膜与外壳之间的空隙、加样区对应的镂空区域、加样区。

[0025] 优选地,加样操作完成后,扩增子即可沿加样区进入检测区。

[0026] 优选地,检测区的边缘设置刻度尺,以便操作人员读取和标记扩增子的移动距离。

[0027] 优选地,外壳上与核酸扩增反应管连通的管路内径为0.5-2.5mm,进一步优选为0.5-2.0mm,例如:0.5mm、0.7mm、1.0mm、1.2mm、1.5mm、1.7mm、2.0mm,更优选为1.0mm。

[0028] 具体地,荧光染料为SYBR Green I,EvaGreen,Syto82。优选地,荧光染料为SYBR Green I。

[0029] 纸芯片的核酸定量检测的原理基于纤维素纸与DNA嵌合型染料(如SYBR GREEN I(SGI))和DNA之间的相互作用。SGI与纤维素之间有着强相互作用力,因此当SGI被添加至纤维素纸上时,SGI不会因为毛细作用随着溶液向测试通道流动,而是被保留在加样区。同时,SGI与纤维素纸的相互作用力大于SGI与扩增引物(单链DNA)但小于SGI与扩增子(双链DNA)之间的相互作用力。因此SGI可以被靶标DNA扩增产生的扩增子有效洗脱至检测通道中,但在缺少靶标DNA时,扩增溶液中的单链DNA引物无法有效将SGI洗脱至检测通道中(见图1)。在纸上SGI洗脱长度可以通过在蓝光下观测其荧光长度来识别。因此,发明人巧妙的将传统的基于SGI的核酸检测手段转化为了在纸上观测流动距离的检测方法,此方法无需精密荧光强度检测仪器,肉眼即可读数,十分适合开发成POCT(Point-of-care testing,即时检验),检测技术并部署至现场进行疾病检测。

[0030] 在本发明的一个具体实施方式中,发明人将加样区设计为圆形,检测区设计为长方形。圆形中设置一段圆弧缺口,圆弧对应弦长度小于等于长方形的宽度,进一步优选弦的长度等于长方形的宽度。

[0031] 优选地,圆形的直径为2mm-10mm,进一步优选为4-8mm,例如:4.0mm、4.4mm、4.8mm、5.2mm、5.6mm、6.0mm、6.4mm、6.8mm、7.2mm、7.6mm、8.0mm。更优选为5.6mm。

[0032] 优选地,长方形的长为20mm-60mm,进一步优选为20-50mm,例如:20mm、25mm、30mm、35mm、40mm、45mm、50mm,更优选为35mm。

[0033] 优选地,长方形的宽为1.5mm-3.0mm,进一步优选为1.5-2.5mm,例如:1.5mm、1.8mm、2.0mm、2.2mm、2.5mm,更优选为1.8mm。

[0034] 由于LAMP相对PCR对交叉污染更加敏感,因此将LAMP整合入POCT系统需要隔绝开盖污染和交叉污染。LAMP反应在偏碱性溶液中进行反应与扩增,但SGI与扩增子结合在pH偏酸性条件下反应效果好。为实现在芯片上不开盖完成两步不同反应条件的反应,发明人巧妙地将LAMP的反应体系设计为相互分离的3层。

[0035] 优选地,LAMP反应体系包括LAMP反应试剂、水性隔离剂、酸性缓冲液。在检测样品时,与添加的先后次序相对应,核酸扩增管内由下到上依次分布混合有靶标核酸的LAMP反应试剂、水性隔离剂、酸性缓冲液;

[0036] 具体地,LAMP反应试剂包含LAMP扩增反应所需试剂,例如引物、dNTP、酶、Mg²⁺(例如

以氯化镁、硫酸镁的形式)、水等。

[0037] 优选地, LAMP反应试剂的pH为7.2-8.2, 例如: 7.2、7.6、8.0、8.2, 更优选为pH 8.0。

[0038] 优选地, 酸性缓冲液的pH为3.0-5.0, 例如: 3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0, 更优选为pH 4.0。

[0039] 优选地, 酸性缓冲液选自磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液、乙酸-乙酸钠缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 进一步优选为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

[0040] 优选地, 酸性缓冲液的体积为5-20 μ L, 进一步优选为5-15 μ L, 例如: 5 μ L、8 μ L、10 μ L、12 μ L、15 μ L, 更优选为8 μ L。

[0041] 在本发明的一个具体实施方式中, 发明人巧妙地在纸芯片的加样区和检测区对应处的外壳上设置有与加样区和检测区相匹配的凹槽, 在凹槽内与加样区的对应处设置有倒置的漏斗状结构(见图4和图5)。漏斗的小开口为连通PCR管的管路连通加样区的管口, 漏斗的大开口扣在加样区内。使得漏斗的内部与加样区的上表面之间形成相对封闭的空间。此空间只通过连通核酸扩增反应管的管路的管口与外界连通。在LAMP扩增反应结束后, 检测人员手持连接有核酸扩增管的芯片甩动时, 该漏斗状结构能防止LAMP扩增反应液和缓冲液从纸芯片的加样区直接甩入纸芯片的检测区。

[0042] 优选地, 漏斗的小开口直径为4.0-6.0mm, 例如: 4.0mm、4.5mm、5.0mm、5.5mm、6.0mm, 更优选为5mm。

[0043] 优选地, 漏斗的大开口直径为5-8mm, 例如: 5.0mm、5.5mm、6.0mm、6.5mm、7.0mm、7.5mm、8.0mm, 更优选为6.0mm。

[0044] 优选地, 漏斗的高度0.4-0.8mm, 例如: 0.4mm、0.5mm、0.6mm、0.7mm、0.8mm, 更优选为0.6mm。

[0045] 在本发明的一个具体实施方式中, 核酸检测系统还包括便携式扩增检测一体机(Fast, Inexpensive Nucleic acid test with Distance-based Readout, FINDR), 其能与核酸扩增反应管和芯片部件相连接。便携式扩增检测一体机为环介导等温扩增反应提供反应环境, 并且为扩增子的检测提供光照条件。

[0046] 优选地, 便携式扩增检测一体机包括等温加热模块、光照模块、LCD显示屏和电源。

[0047] 等温加热模块包括电路控制板、加热板、加热块、温度传感器、数字输出转换器和冷却风扇。加热块位于加热板上方, 且加热块上设置盛放核酸扩增反应管的孔洞, 孔洞在加热块上呈矩阵式排列。

[0048] 温度传感器连接加热板, 优选温度传感器内置于加热板上, 温度传感器优选为热电偶。

[0049] 光照模块包括由下至上依次设置的LED灯、芯片插槽、滤光片和观测窗口。

[0050] 电源为内置的可充电电池, 优选为锂电池。

[0051] 优选地, 孔洞呈3 \times 8矩阵排列, 孔洞与核酸扩增反应管一一对应, LED灯呈矩阵式排列, 每列LED灯对应一个芯片插槽。LED灯优选呈2 \times 4矩阵排列

[0052] 第二方面, 本发明提供了一种便携式核酸检测系统的使用方法, 其具体包括以下步骤:

[0053] 步骤1, 提取待检测样品的核酸, 然后将核酸与LAMP反应溶液混合均匀, 然后缓慢加入核酸扩增反应管的底部, 再依次加入硅油和酸性缓冲液。

- [0054] 步骤2,将核酸扩增反应管通过芯片外壳上的管路密闭连接到芯片外壳上。
- [0055] 步骤3,将核酸扩增反应管插入孔洞中,开启便携式扩增检测一体机,通过等温加热模块控制LAMP反应的温度,进行LAMP反应。
- [0056] 步骤4,操作人员手持芯片,并甩动芯片使扩增后的LAMP反应液与酸性缓冲液混合,然后依次通过连接芯片和核酸扩增反应管的管路、漏斗状结构进入纸芯片上的加样区,使扩增子与荧光染料充分结合,水平静置10min,待溶液通过毛细作用从加样区渗透入检测区。
- [0057] 步骤5,将芯片水平放置于芯片插槽中,静置后开启LED灯,通过观察窗观测带有荧光标记的扩增子的移动距离。
- [0058] 步骤6,对扩增子的移动距离检测结果进行分析,获得检测样品的检测结果。
- [0059] 优选地,步骤3中LAMP反应的温度为60℃-65℃,例如:61℃、62℃、63℃、64℃、65℃,进一步优选为65℃。
- [0060] 优选地,步骤5中芯片的静置时间为5-15min,进一步优选为8-12min,例如:8min、9min、10min、11min、12min,更优选为10min。
- [0061] 优选地,步骤5中扩增子的移动距离可通过人肉眼观测,也可以使用可拍照电子设备,如智能手机进行图像采集用于记录和后续数据处理。
- [0062] 为了使本发明的核酸检测系统能够适用于基层医院、诊所和医疗资源受限制的偏远地区,而且适合大规模生产。发明人经过精心研究和不断地完善设计,将便携式扩增检测一体机的造价控制在300元人民币以下,每个芯片部件造价约2元人民币。尤其是便携式扩增检测一体机一次性充电可支持260min的 $65 \pm 0.5^\circ\text{C}$ LAMP反应,并且可支持完成192组LAMP反应。一台便携式扩增检测一体机的尺寸约 $12.8 \times 15.6 \times 13\text{cm}$,重量约0.5kg。而现有ABI 7000qPCR仪的尺寸为 $39 \times 51 \times 53\text{cm}$,重量34kg。另外GeneXpert IV的尺寸 $28 \times 30.5 \times 30\text{cm}$,重量12kg。
- [0063] 本发明的有益效果:
- [0064] 一、本发明采用读取扩增子移动距离的方式对靶标核酸进行定性、定量检测分析,相较于传统PCR、qLAMP扩增的定性、定量分析,本发明的检测方法更加简便、对于技术人员和检测设备的要求低,从而提高了检测效率。
- [0065] 二、本发明的FINDR相对于qLAMP更加鲁棒,可以从大量非靶标DNA混合物中检测到单拷贝靶标DNA,并且可以应用于任何基于核酸检测的疾病诊断。
- [0066] 三、FINDR一体机大小与重量相对于传统检测仪器在体积上有着数量级的差距,结合FINDR芯片可做到现场不开盖核酸检测,满足了在资源受限区域的现场检测。
- [0067] 四、相较于现有的PCR、qPCR检测设备,本发明的FINDR一体机和芯片的制造成本低,更适用于基层医院、诊所和医疗资源受限制的偏远地区,而且适合大规模生产。

附图说明

- [0068] 图1所示为本发明的检测原理;
- [0069] 图2所示为本发明检测靶标核酸的流程示意图;
- [0070] 图3所示为本发明中芯片的制作过程;
- [0071] 图4所示为本发明便携式FINDR一体机中芯片外壳的结构示意图;

- [0072] 图5所示为本发明便携式FINDR一体机中芯片外壳中凹槽及漏斗状结构示意图；
- [0073] 图6所示为本发明便携式FINDR一体机结构示意图；
- [0074] 图7所示为本发明便携式FINDR一体机运转过程示意图；
- [0075] 图8所示为本发明实验2.1的检测结果,按照由左至右的顺序,各个柱状图中的H37Rv基因组DNA的浓度依次为 10^3 copies/reaction、 10^2 copies/reaction、10copies/reaction、1copies/reaction、负对照(N.C)；
- [0076] 图9所示为本发明实验2.1中扩增结果与负对照(N.C.)流动长度(d_p)对比,数值为3组重复平均值±标准方差,p值计算自双尾学生t检验；
- [0077] 图10所示为本发明实验2.2中qLAMP反应结果；
- [0078] 图11所示为本发明实验2.1中FINDR检测结果与实验2.2中qLAMP检测结果热图对比；
- [0079] 图12所示为本发明实验2.3的稳定性测试结果；
- [0080] 图13所示为本发明实验2.3中扩增子移动距离平均值柱状图对比结果；
- [0081] 图14所示为本发明实验3.1结核患者痰液样本中DNA检测流程示意图；
- [0082] 图15所示为本发明实验3.1结核患者痰液样本中DNA检测结果的ROC曲线；
- [0083] 图16所示为本发明实验3.1结核患者痰液样本中DNA使用FINDR检测结果盒图,其中虚线表示将FINDR阳性(蓝色)与FINDR阴性(红色)分开的检测线；
- [0084] 图17所示为本发明实验3.1结核患者痰液样本中DNA使用FINDR检测结果的FINDR芯片荧光照片图。
- [0085] 图18所示为本发明实验3.1中FINDR检测结果、实验3.2中qPCR检测结果和实验3.3中qLAMP检测结果对比热图；
- [0086] 图19所示为本发明实验3.1中FINDR检测结果与实验3.2中qPCR检测结果的混淆矩阵。

具体实施方式

[0087] 下面结合说明书附图和具体实施例进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不用来限定本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照本领域常规条件或按照制造厂商建议的条件。如无特殊说明,均为常规方法。除非另行定义,文中所用的专业与科学用语与本领域技术人员熟悉的意义相同。

[0088] 实施例一FINDR核酸检测系统的制备与使用

[0089] 1.1FINDR芯片的制作

[0090] 如图3所示,先在电脑上设计芯片图案,其主要包括5.6mm直径的圆形加样区、35mm×1.8mm的矩形检测区以及矩形检测区旁边的刻度尺,然后选用Whatman No.1纤维素纸作为基底,将设计好的图案用蜡打印机(Xerox ColorQube 8580)打印至纸芯片上,其中圆形加样区上设置一段弦长35mm的圆弧缺口,该缺口对应矩形检测区的宽。再将纤维素纸芯片在加热板上用150℃加热40s,使蜡融化渗透进纸芯片中,在纸芯片上形成圆形加样区和矩形检测区边缘为蜡质疏水边界的检测区域。再将加热好的纸芯片使用厚度为125μm的塑封膜进行上下层塑封以保证FINDR芯片的总体强度。

[0091] 如图3所示,在上层塑封膜上挖出与纸芯片图案相似的镂空区域,暴露出纸芯片的

检测区域以便于加样。在下层塑封膜与纸芯片之间添加一层石蜡膜,用于底部密封。

[0092] 如图3所示,将2 μ L 300X浓度溶于丙酮溶液的荧光染料SYBR Green I (SGI)添加至纸芯片圆形加样区,丙酮挥发后SGI保留在加样区纤维素纸空隙之中。

[0093] 如图4所示,采用3D打印技术打印一块透明塑料外壳。该外壳上设置有与纸芯片加样区和检测区位置相匹配的凹槽,在凹槽内设置有与加样区对应的倒置漏斗状结构。漏斗的小开口为连通PCR管和加样区的管路管口,其直径为5mm。漏斗的大开口直径为6mm,漏斗的高度为0.6mm。塑料外壳上带有PCR管接口与直径为1mm的管路,其主要用于连接含有扩增试剂的PCR管与纸芯片。

[0094] 如图4和图5所示,将塑料外壳附在塑封纸芯片的上表面,使凹槽结构对应纸芯片上的加样区和检测区,并且保证漏斗结构倒扣在圆形加样区边缘的石蜡疏水边缘上。使得漏斗的内部与圆形加样区的上表面之间形成相对封闭的空间。再采用透明胶带将塑料外壳和纸芯片粘合在一起,以保证塑封纸芯片和外壳之间的密封性。

[0095] 1.2 FINDR一体机的制造

[0096] 图6示出了本发明FINDR一体机的主要结构。FINDR一体机由主要分为两个功能模块:等温加热模块与光照观测模块。等温加热模块使用Arduino Nano电路板控制的电加热模块,电加热板上附着一块24孔(3 \times 8)加热块,可同时插入24个PCR管加热。加热板温度由埋入加热板的K型热电偶进行测量,热电偶信号由热电偶至数字输出转换器(MAX31855)转化为数字信号输出至Arduino板后,通过预编程代码判断温度高低,当温度超过阈值(65 $^{\circ}$ C),Arduino板通过继电器(SRD-05VDC-SL-C)关闭加热板并激活两个冷却风扇对芯片降温,如未达到65 $^{\circ}$ C则继续加热,直至加热至65 $^{\circ}$ C处于恒温加热模式。加热时长与温度会实时显示在LCD显示屏上,是否执行扩增反应由控制开关进行控制。光照观测模块由LED矩阵与滤镜构成。8个蓝光LED组成2 \times 4矩阵,对应上方4块芯片插槽位置。LED光通过柔光罩转化为均匀的面光源保证光照均一性。在芯片插槽正上方设置有观测窗口,并附有一块亚克力材质滤光片,以降低背景蓝光使SGI绿色荧光与背景区分出来。当FINDR芯片插入插槽后,打开LED灯,光从芯片下方照射,通过观测窗口可观测结合了SGI的扩增子在检测区的移动距离。

[0097] 核酸移动距离可通过人肉眼观测,或使用可拍照电子设备,如智能手机进行图像采集用于记录和后续数据处理。全部组件由3D打印外壳进行包装后制作成一台便携式一体机,使用内置的可充电锂电池供电。FINDR一体机的尺寸12.8 \times 15.6 \times 13cm,重量0.5kg。FINDR一体机与FINDR芯片相结合能实现现场不开盖核酸检测,满足了在资源受限区域的现场检测。

[0098] 1.3 FINDR核酸检测系统的使用方法

[0099] 如图7所示,FINDR核酸检测系统的具体运转过程如下:

[0100] 步骤1、提取待检测样品的核酸,然后将核酸与LAMP反应溶液混合均匀,缓慢加入PCR管的底部,再依次加入硅油和pH4.0的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液。调整总反应液体体积至10 μ L。

[0101] 步骤2、将PCR管通过FINDR芯片外壳上的管路密闭连接到芯片外壳上。

[0102] 步骤3、将PCR管插入FINDR一体机中的加热块的孔洞中,开启FINDR一体机,通过等温加热模块控制LAMP的反应温度为65 $^{\circ}$ C,进行LAMP反应。

[0103] 步骤4、操作人员手持LAMP反应完成的FINDR芯片,甩动芯片使LAMP反应液与柠檬

酸/柠檬酸钠缓冲液混合,然后依次通过连接芯片和PCR管的管路、漏斗状结构进入FINDR芯片上的圆形加样区,使扩增子与荧光染料SGI充分结合,水平静置10min,待溶液通过毛细作用从加样区渗透入检测区。

[0104] 步骤5、将芯片水平放置于芯片架的插槽中,静置后开启LED灯,通过观察窗观测带有荧光标记的扩增子的移动距离。

[0105] 步骤6、对扩增子的移动距离检测结果进行分析,获得检测样品的检测结果。

[0106] 实施例二结核分枝杆菌菌株H37Rv基因组的检测

[0107] 2.1便携式核酸检测系统对H37Rv基因组的检测

[0108] (1)构建LAMP反应体系的配制

[0109] 按照以下操作配制LAMP反应体系(2 μ L):

[0110] WarmStart®LAMP mix 2x (NEB) 1 μ L;

[0111] 引物混合液:0.2 μ L;

[0112] H37Rv基因组DNA:0.4 μ L;

[0113] ddH₂O:0.4 μ L;

[0114] 其中,引物混合液中各引物(见表1)在LAMP反应体系中的终浓度分别为:FIP1.2 μ M、BIP 1.2 μ M、LF 0.4 μ M、LB 0.4 μ M、F30.4 μ M、B30.4 μ M。

[0115] H37Rv在LAMP反应体系中的终浓度为10³copies/reaction至1copies/reaction(拷贝/每次反应)。

[0116] 表1LAMP扩增反应中的引物信息

序列名称	序列信息	序列编号
[0117] F3	ACTAGCCGAGACGATCAA	SEQ ID NO:1
B3	GTGAGTCCGGAGACTCTC	SEQ ID NO:2
FIP	TCGCCGCAGTACTGGTAGACATCGAGGATGTCGAGTTG	SEQ ID NO:3
[0118] BIP	ACTCGAGGCTGCCTACTACGTGATCTGAGACCTCAGCC	SEQ ID NO:4
LF	CGATGGTTGAACCAGTCGA	SEQ ID NO:5
LB	CTCAACGCCAGAGACCAG	SEQ ID NO:6

[0119] (2)LAMP反应

[0120] 将(1)中的LAMP扩增反应溶液加入200 μ LPCR管中,然后依次加入5 μ L的AS100硅油(Merck)和8 μ L缓冲液(pH4.0柠檬酸缓冲液,内含0.1%(v/v)的Tween-20),从而在PCR管中形成水-油-水分层结构。然后将PCR管安装至FINDR芯片上,再将PCR管插在FINDR仪器的加热块上,在65 $^{\circ}$ C下加热反应25min。负对照的反应体系采用与H37Rv基因组DNA等体积的去离子水代替H37Rv基因组DNA,其余反应条件同H37Rv基因组DNA的LAMP反应。

[0121] (3)荧光检测

[0122] 将完成LAMP扩增反应的FINDR芯片立刻从仪器上取下,用手捏住芯片,将PCR管对着手心,甩动芯片5次让PCR管中的溶液混合并通过FINDR芯片外壳上的管路流入FINDR芯片中的纸基芯片的加样区。然后将FINDR芯片水平静置10min,使结合了荧光染料的LAMP扩增

子沿FINDR芯片中的纸基芯片的检测区流动,再将FINDR芯片插入FINDR仪器的检测区,打开LED灯,通过仪器上的观察窗口肉眼读取FINDR芯片上的荧光长度,或者使用带摄像头的智能设备进行图像数据采集,使用双尾学生t检验进行计算检测数据,结果见图8和图9。

[0123] 由图8和图9可以看出,H37Rv基因组DNA浓度分别为 10^3 copies/reaction、 10^2 copies/reaction、 10^1 copies/reaction时,H37Rv基因组的检测结果与负对照(N.C)的p值均 <0.0001 ,差异极显著;而H37Rv基因组DNA浓度为1copies/reaction时,H37Rv基因组的检测结果与负对照(N.C)的p值=0.4985,差异不显著。说明采用本发明的便携式核酸检测系统对于H37Rv基因组DNA的检测浓度能低至 10^1 copies/reaction。检测时间短,检测技术稳定、可靠。

[0124] 2.2qLAMP对H37Rv基因组的检测

[0125] (1)构建qLAMP反应体系的配制

[0126] 按照以下操作配制qLAMP反应体系(25 μ L):

[0127] Isothermal Mastermix(OptiGene,UK) 15 μ L;

[0128] 引物混合液5 μ L;

[0129] H37Rv(10^0 ng/ μ L- 10^{-6} ng/ μ L) 2 μ L(1微升的1ng/ μ LH37Rv中含21万个拷贝的DNA,即1ng/ μ L等于 2.1×10^5 copies/ μ L);

[0130] ddH₂O 3 μ L。

[0131] 其中,引物混合液中各引物在LAMP反应体系中的终浓度分别为:

[0132] 在qLAMP反应体系中各个引物终浓度为:FIP 1.6 μ M、BIP 1.6 μ M、LF 0.6 μ M、LB 0.6 μ M、F30.2 μ M、B30.2 μ M。

[0133] (2)qLAMP反应

[0134] 将(1)中的qLAMP扩增反应溶液加入200 μ LPCR管中,然后使用CFX96荧光定量PCR仪(BioRad,USA)进行扩增与检测。qLAMP反应条件为:95 $^{\circ}$ C,30s;60 $^{\circ}$ C 40s,40个循环;95 $^{\circ}$ C 15s。然后降至60 $^{\circ}$ C后每5s上升0.5 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C完成反应。实验结果见图10。

[0135] 由图10可以看出,qLAMP最低能检测出 10^{-5} ng/ μ L(2.1copies/reaction)的H37Rv基因组DNA。另外,由于N.C.曲线与 10^{-6} ng/ μ L相互重合,图中未显示。

[0136] 将实验2.1和2.2的实验结果采用热图进行比较,结果见图11。

[0137] 由图11可以看出,FINDR纸芯片最多可检测至1copies/reaction,在最低检出线上优于qLAMP检测结果。

[0138] 2.3便携式核酸检测系统稳定性测试

[0139] 以实验2.1的H37Rv基因组(1ng/ μ L)和负对照为靶标核酸,重复10次实验2.1,实验结果见图12和图13。

[0140] 由图12和图13可以看出,H37Rv基因组DNA的10次移动检测距离之间差异小,检测结果重复性高,本发明的便携式核酸检测系统运行稳定。

[0141] 实施例三便携式核酸检测系统对结核患者痰液样本的检测

[0142] 3.1FINDR系统对结核患者痰液样本DNA的检测

[0143] 具体实验过程如图14所示。

[0144] (1)核酸样本预处理

[0145] 提取80个痰液样本(59个结核患者和21个健康)中的DNA,然后使用NanoDrop分光

光度计(Thermo Fisher Scientific,US)对总核酸量进行定量,再使用去离子水统一稀释至10ng/ μ L浓度。

[0146] (2)构建LAMP反应体系的配制

[0147] LAMP反应体系同实验2.1中的反应体系,唯一不同是将H37Rv替换为痰液DNA提取样本。其中,59例结核病人痰液中DNA和21份健康人痰液中DNA(10ng/ μ L)。

[0148] (3)LAMP反应和荧光检测

[0149] 将(2)中的LAMP扩增反应溶液加入200 μ LPCR管中,其余检测步骤与实验2.1相同。结果见图15、图16和图17。

[0150] 由图15可以看出,将全部80个痰液样本(59个感染和21个健康)中核酸扩增子在芯片上移动长度作接受者操作特性曲线(ROC),曲线下面积为0.99,证明了FINDR核酸检测系统的分辨力高。使用ROC曲线计算,在特异性100%时芯片上最小移动长度为11.8mm,因此将11.8mm设定为在FINDR芯片上检测为阳性的阈值。

[0151] 由图16和图17可以看出,在59个结核病人痰液样本中,有57个样本的核酸扩增子移动距离大于检测线,仅有2个样本(23号和47号)的核酸扩增子移动距离小于检测线。说明FINDR监测系统能够用于浓度为10ng/ μ L的核酸样本检测,检测灵敏度高。

[0152] 3.2qPCR对结核患者痰液样本DNA的检测

[0153] (1)核酸样本预处理

[0154] 将实验3.1中的59个结核病人的痰液中的核酸样本均使用NanoDrop分光光度计(Thermo Fisher Scientific,US)对总核酸量进行定量,并稀释至1ng/ μ L浓度。

[0155] (2)构建qPCR反应体系的配制

[0156] 按照以下操作配制反应体系(20 μ L):

[0157] ChamQ SYBR Color qPCRMaster Mix 2x 10 μ L;

[0158] 正向引物F3 0.4 μ L;

[0159] 负向引物B3 0.4 μ L;

[0160] ddH₂O 7.2 μ L;

[0161] 结核病人痰液DNA(1ng/ μ L) 2 μ L。

[0162] 其中,F3和B3在反应体系内的终浓度均为0.2 μ M。

[0163] (2)qPCR反应

[0164] 将(2)中的qPCR扩增反应溶液加入200 μ LPCR管中,然后使用CFX96荧光定量PCR仪(BioRad,USA)进行扩增与检测。qPCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C,30s;95 $^{\circ}$ C10s,60 $^{\circ}$ C30s,40个循环;95 $^{\circ}$ C15s。然后降至60 $^{\circ}$ C后每5s上升0.5 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C完成反应。

[0165] 3.3qLAMP对结核患者痰液的检测

[0166] (1)核酸样本预处理

[0167] 具体步骤与实验2.2相同。

[0168] (2)构建qLAMP反应体系的配制

[0169] 按照以下操作配制反应体系(25 μ L):

[0170] Isothermal Mastermix(OptiGene,UK) 15 μ L;

[0171] 引物混合液5 μ L;

[0172] 结核病人痰液DNA(1ng/ μ L) 2 μ L;

[0173] ddH₂O 3μL。

[0174] 其中,引物混合液中各引物在qLAMP反应体系中的终浓度分别为:FIP1.6μM、BIP 1.6μM、LF 0.6μM、LB 0.6μM、F30.2μM、B30.2μM。

[0175] (3)qLAMP反应

[0176] 将(2)中的qLAMP扩增反应溶液加入200μLPCR管中,然后使用CFX96荧光定量PCR仪(BioRad,USA)进行扩增与检测。qLAMP反应条件为:95℃,30s;60℃40s,40个循环;95℃15s。然后降至60℃后每5s上升0.5℃至95℃完成反应。

[0177] 将实验3.1、实验3.2和实验3.3的核酸样本检测结果采用热图进行比较,结果见图18。

[0178] 由图18可以看出,qPCR作为金标准方法对结核病人痰液中的核酸样本进行检测,全部59个结核样本都能检测出来。FINDR检测结果与qPCR检测结果相近。但qLAMP检测结果中有23个结核样本检测为假阴性。说明qLAMP检测效果劣于FINDR检测结果。

[0179] 使用图15中ROC曲线求得的检测线将实验3.1和实验3.2中的59个结核病人痰液中核酸的检测结果采用混淆矩阵进行对比分析,结果见图19。

[0180] 由图19可以看出,与qPCR金标准检测结果对比,FINDR检测方法的灵敏度为96.6%,特异性为100%。说明本发明的便携式核酸检测系统能够用于浓度为10ng/μL的核酸样本检测,检测灵敏度高。

[0181] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

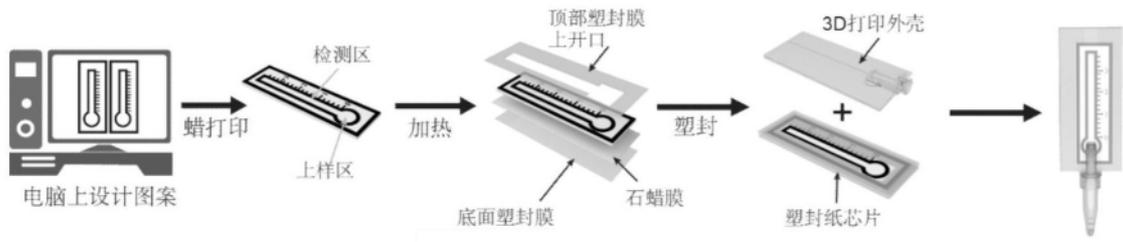


图3

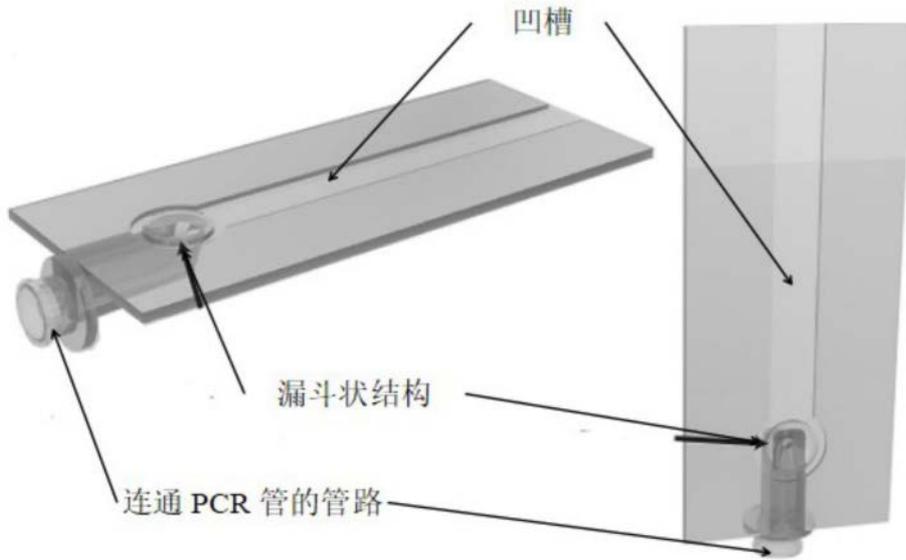


图4

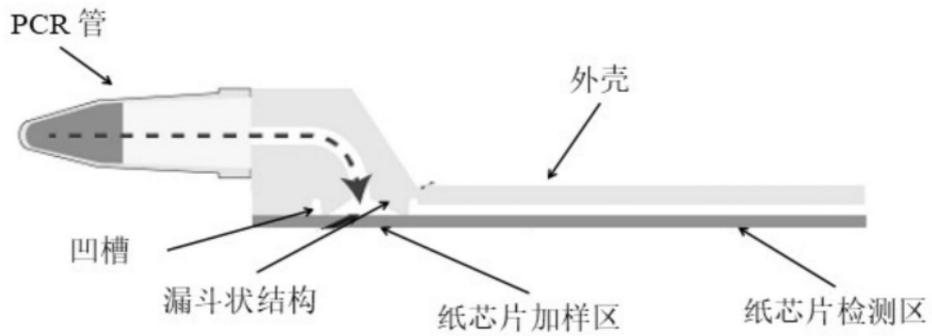


图5

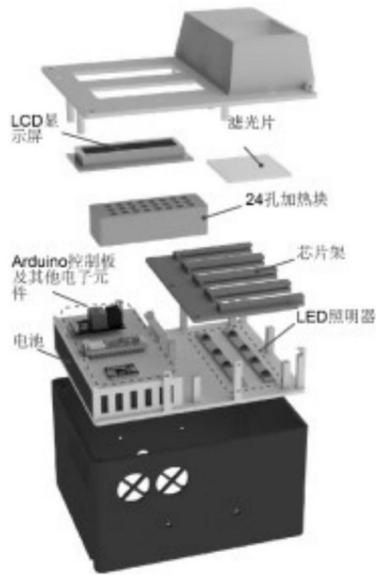


图6

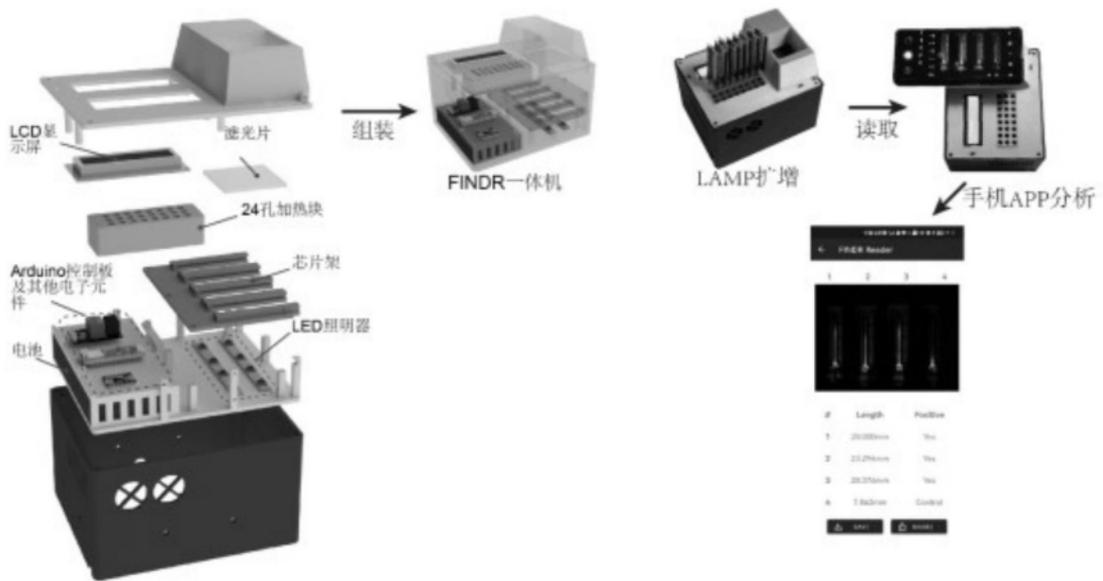


图7

1000 - 1 拷贝/每次反应 N.C.

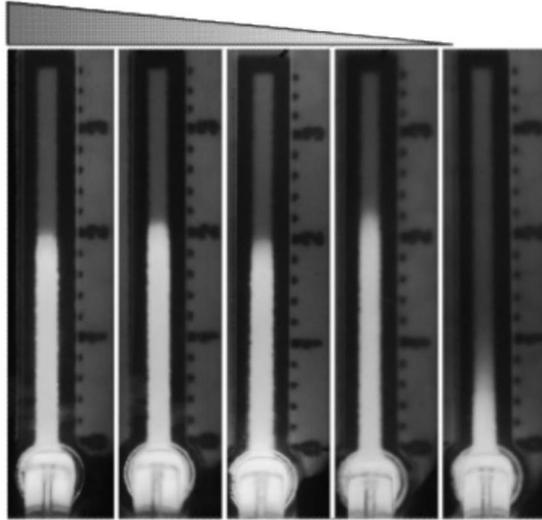


图8

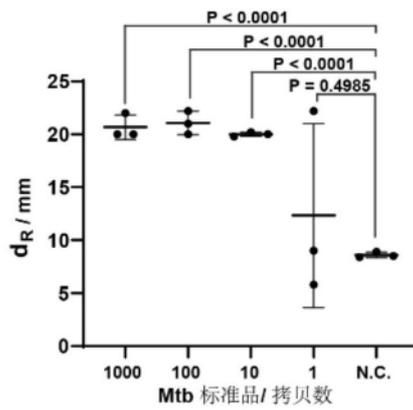


图9

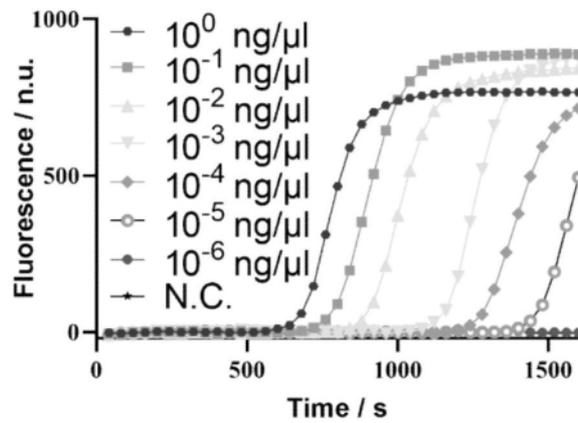


图10

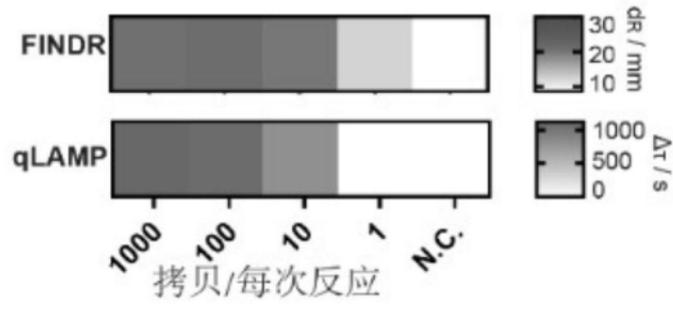


图11

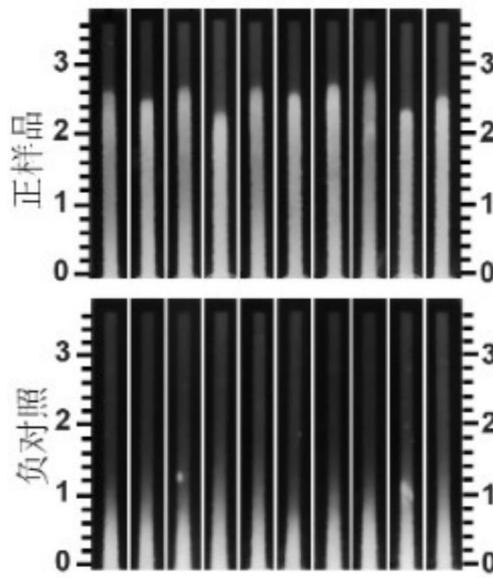


图12

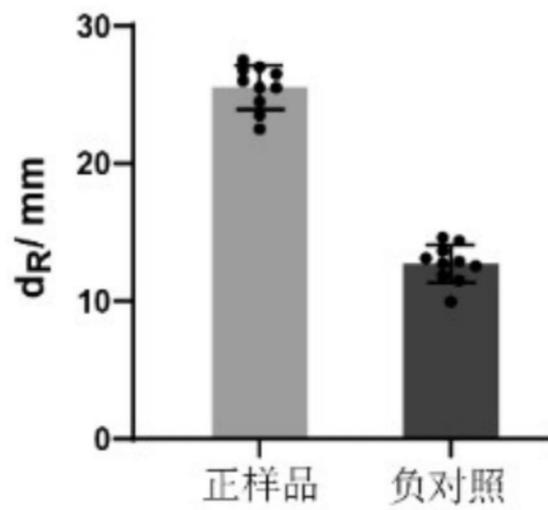


图13

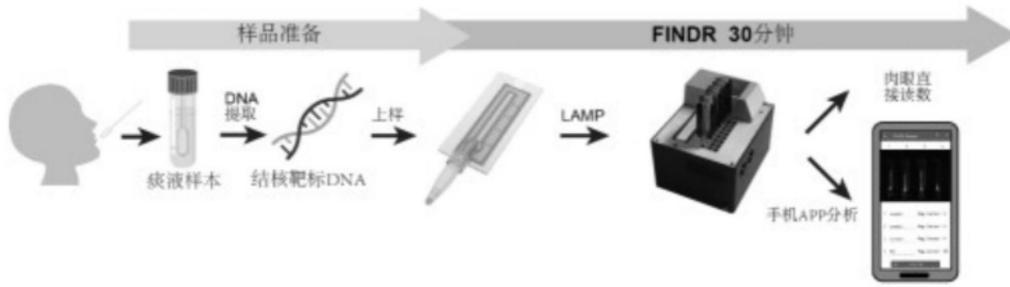


图14

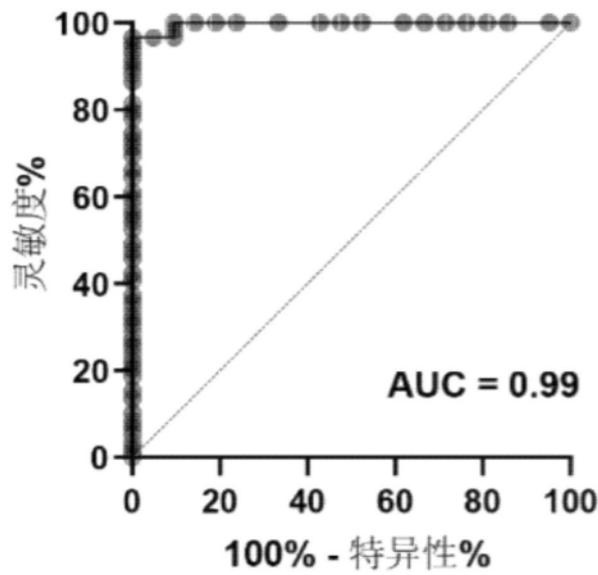


图15

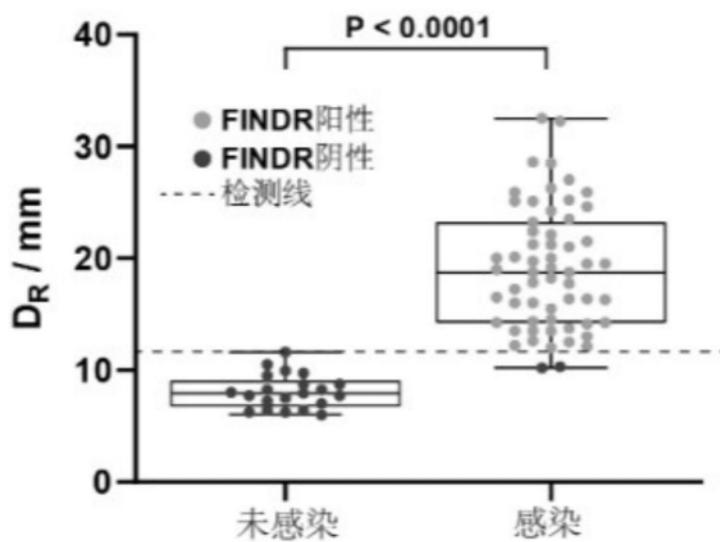


图16

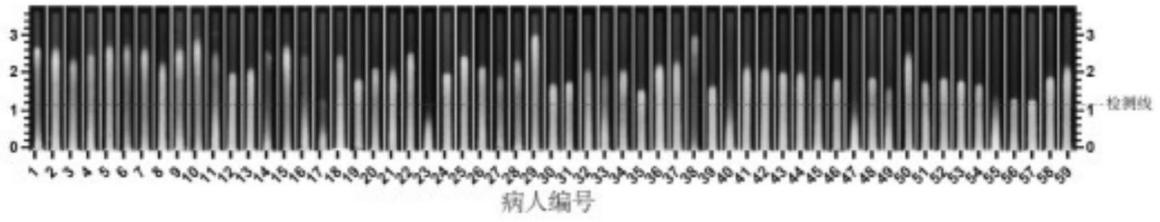


图17

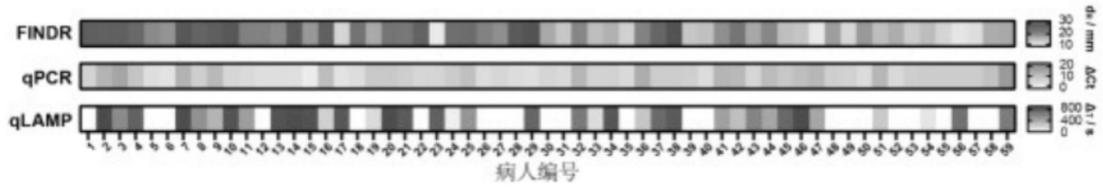


图18

	qPCR	
	+	-
FINDR	+	0
	2	21
	96.6%	100%
	灵敏度	特异性

图19