

# 基于磁免疫微流控芯片对肺炎链球菌的快速检测

高菊逸 邵奕霖 吴传安 杨伟康 罗裕旋 徐小平

作者单位: 518110 广东深圳, 深圳市龙华区妇幼保健院检验科(高菊逸、吴传安、杨伟康、罗裕旋)

518053 广东深圳, 香港大学深圳医院(邵奕霖、徐小平)

通信作者: 徐小平, Email: 245765608@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.002

**【摘要】** 目的 分析基于免疫磁珠技术研制的磁免疫微流控芯片快速检测肺炎链球菌的优势, 探讨将其用于细菌性脑膜炎(BM)临床早期诊断和治疗的可行性。**方法** 以聚二甲基硅氧烷(PDMS)为原材料, 结合免疫磁珠技术, 使用Pro/Engineer辅助软件设计并制作磁免疫微流控芯片, 筛选最佳进样流速及进样时间, 向芯片内通入免疫磁珠溶液预处理, 再通过免疫荧光法对肺炎链球菌进行捕获检测实验。比较不同浓度菌悬液通过磁免疫微流控芯片的捕获率, 分析该方法的特异度和重复性。**结果** 确定最佳进样流速为5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 进样时间为20 min。磁免疫微流控芯片对肺炎链球菌(浓度 $\geq 1.5 \times 10^3$  cfu/mL)的捕获率达到90%以上, 对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的捕获率均为0, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 特异度为100%, 同批检测变异系数为1.1%, 可重复性较好。**结论** 磁免疫微流控芯片制作简单, 检测时间较短, 可实现快速检测。此方法对肺炎链球菌具有较高的捕获率, 解决了因磁场介入导致芯片设计复杂的问题, 为临床病原菌检测提供了一种快速准确的方法。

**【关键词】** 磁免疫; 微流控芯片; 肺炎链球菌; 快速检测; 捕获

**基金项目:** 广东省深圳市卫生计生系统科研项目(SZFZ2017047)

## Rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* based on magnetic immunity microfluidic chip

Gao Juyi, Shao Yilin, Wu Chuan'an, Yang Weikang, Luo Yuxuan, Xu Xiaoping. Department of Laboratory, Shenzhen Longhua District Maternity & Child Hospital, Shenzhen 518110, Guangdong, China (Gao JY, Wu CA, Yang WK, Luo YX); Shenzhen Hospital, Hong Kong University, Shenzhen 518053, Guangdong, China (Shao YL, Xu XP)

Corresponding author: Xu Xiaoping, Email: 245765608@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To analyze the advantages of microfluidic chip based on immunomagnetic bead technology for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* and its application in early diagnosis and treatment of bacterial meningitis (BM). **Methods** Using polydimethylsiloxane (PDMS) as the raw material, combined with immunomagnetic bead technology, the magnetic immunomicrofluidic chip was designed and fabricated using Pro/Engineer auxiliary software. The best injection flow rate and injection time were screened. Immunomagnetic bead solution was passed through the chip for pretreatment, and then *Streptococcus pneumoniae* was detected by immunofluorescence. The capture rates of *Streptococcus pneumoniae* with different concentration by magnetic immunity microfluidic chip were compared, and the specificity and repeatability were analyzed. **Results** The optimal injection flow rate was 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  and the injection time was 20 min. The capture rate of *Streptococcus pneumoniae* (concentration  $\geq 1.5 \times 10^3$  cfu/mL) by magnetic immune microfluidic chip was more than 90%, and the capture rates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were both 0, with significant difference ( $P < 0.01$ ), the specificity was 100%. The coefficient of variation of the same batch was 1.1%, with good repeatability. **Conclusions** The magnetic immune microfluidic chip is simple to fabricate and the detection time is short, fast detection can be realized. This method has a high capture rate for *Streptococcus pneumoniae*, can solve the problem of complex chip design due to magnetic field intervention and provide a fast and accurate method for clinical pathogen detection.

**【Key words】** Magnetic immune; Microfluidic chip; *Streptococcus pneumoniae*; Rapid detection; Capture

**Fund program:** Shenzhen Health and Family Planning System Research Project of Guangdong Province (SZFZ2017047)

引起细菌性脑膜炎 (bacterial meningitis, BM) 的主要病原菌包括肺炎链球菌、脑膜炎双球菌和流感嗜血杆菌等<sup>[1]</sup>, 其中肺炎链球菌可以穿过血脑屏障侵入中枢神经系统造成感染, 病死率高达 16%~37%, 而且存活着中有 30%~50% 的患者发生神经系统后遗症<sup>[2]</sup>。尽管目前临床已采取抗菌药物治疗及疫苗接种的措施, 但 BM 仍然具有较高的发病率和病死率。实验室检测方法对肺炎链球菌的检出率较低, 常造成结果报告不及时导致患者病情延误。因此, 研制一种可快速检测肺炎链球菌的方法对于临床早期用药和早期治疗是非常必要的。

随着现代医学技术的发展, 临床上对人体生化指标检测的要求也越来越高。微型化、智能化和集成化将成为分析仪器发展的主流方向<sup>[3-5]</sup>。微流控芯片技术的发展应用在病原微生物检测方面有一定意义, 因此本研究研制一种简易化磁免疫微流控芯片, 探讨其对肺炎链球菌的检测效果, 现报告如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验菌株** 肺炎链球菌 ATCC 49619、大肠埃希菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 均由深圳市龙华区妇幼保健院检验科微生物室提供。

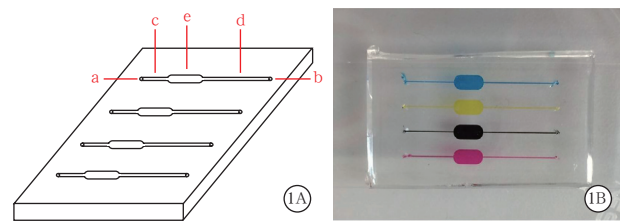
**1.2 仪器与试剂** 倒置荧光显微镜 (日本尼康仪器有限公司), 高速摄像荧光电荷耦合器件 (charge coupled device, CCD, 英国 Andor Zyla 公司), 注射泵 (美国 Kd Scientific 公司), 匀胶机 (美国 Laurell 公司), 对准型光刻机 (韩国 MIDAS 公司), 等离子清洗机 (美国 Harrick 公司); 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS), 亲和素化磁珠 (美国 Thermo Fisher 公司), 聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS, 美国 Dow Corning 公司), 光刻胶 SU8-3050 (美国 Microchem 公司), Hoechst 33342 荧光染色剂 (上海碧云天生物技术有限公司), 生物素化抗肺炎链球菌抗体 (英国 Abcam 公司), 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)。

### 1.3 磁免疫微流控芯片的制作方法

**1.3.1 微流控芯片的设计** 根据研究对象的形态学特征, 使用 Pro/Engineer 辅助软件设计芯片大小为 40 mm×20 mm (如图 1A 所示), 其中 a、b 分别为进、出样孔, 直径为 0.5 mm; c 为进样微通道, 宽 0.2 mm, 长 10 mm; d 为出样微通道, 宽 0.2 mm, 长 15 mm; e 为检测区域, 宽 1.4 mm, 长 3.2 mm, 高 3 mm。

**1.3.2 磁免疫微流控芯片的制作** 根据设计图形制作掩膜备用, 将硅片置于匀胶机上, 以 500 r/min 旋

转 15 s, 接着以 3 500 r/min 旋转 50 s, 在硅片上均匀悬涂一层 SU-8 负光刻胶, 95 °C 加热 10 min, 通过前烘使光刻胶固化; 将处理好的硅片置于紫外光刻机上, 与掩膜贴合曝光 10 s; 再经过后烘、显影和腐蚀, 制作阳膜。使用显微镜观察通道及进、出样口。之后将配制好的 PDMS 混合液 (PDMS 基质: PDMS 预聚物=5:1 或 10:1) 浇铸在阳膜上, 使其均匀平铺, 真空抽气后置于 80 °C 电热干燥箱中烘烤, 将最后固化好的 PDMS 从阳膜上剥离并切割, 再使用显微镜观察进、出样孔是否准确。最后将制作好的 PDMS 盖片 (检测芯片) 和洁净的玻璃片一起放入等离子清洗机, 抽真空后等离子清洗 30 s, 取出后将两者不可逆封接, 芯片制作完成。最后将可食用性染料通入芯片, 用于验证芯片的实用性, 结果见图 1B。



注: 1A 为磁免疫微流控芯片的设计图 (其中 a、b 分别为进、出样孔, c 为进样微通道, d 为出样微通道, e 为检测区域); 1B 为磁免疫微流控芯片的实物图

图 1 磁免疫微流控芯片的设计图及实物图

**1.3.3 磁珠的制备** 首先将 40  $\mu$ L 亲和素化磁珠 (直径为 2.8  $\mu$ m) 加入到含有 1 mL PBS (pH 7.2) 的离心管中, 轻摇洗涤后于磁力架上静置 3~5 min 至液体澄清, 吸出上清液, 重复操作 3 次。然后加入 1 mL PBS, 再加入 1  $\mu$ L 生物素化抗肺炎链球菌抗体 (4 g/L), 置于摇床 (25 °C, 100 r/min) 孵育 2 h 后将离心管置于磁力架上至液体澄清, 吸出上清液, 加入 1 mL PBS, 摇晃、洗涤后置于磁力架上至液体澄清, 吸出上清液, 重复操作 3 次, 洗涤完成后加入 1 mL PBS, 再加入 2  $\mu$ L 5 mg BSA, 混匀后置于摇床 (25 °C, 100 r/min) 孵育 30 min。最后将离心管置于磁力架上至液体澄清, 吸出上清液, 加入 1 mL PBS, 摇晃、洗涤后置于磁力架上至液体澄清, 用移液器吸出清液, 重复操作 3 次, 加入 0.5 mL PBS 重悬备用, 保存于 4 °C 冰箱。

### 1.4 检测方法

**1.4.1 菌株制备** 肺炎链球菌于营养肉汤培养基培养 24 h 后取 0.2 mL 加入无菌生理盐水配制成浓度为  $1.5 \times 10^5$  cfu/mL 的初始菌液, 经平板菌落计数确定浓度。使用同样方法将大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌配制成  $1.5 \times 10^5$  cfu/mL 的菌悬液备用。

**1.4.2 选择最佳进样流速和时间** 根据本实验组之前的研究数据<sup>[6-8]</sup>,选择 4 个进样流速(1、5、10、15  $\mu\text{L}/\text{min}$ )分别进样并进行调试对比,直至 60 min,计算细菌捕获率。

**1.4.3 磁免疫微流控芯片检测** 首先,取出制作好的芯片,磁铁位置对应芯片检测区,与注射泵连接,从进样口通入 1% BSA 溶液,流速 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,反应 10 min,对芯片通道封闭处理。紧接着通入结合有肺炎链球菌抗体的免疫磁珠溶液,流速 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,反应 10 min,用 PBS 清洗通道,除去通道中未被固定的免疫磁珠。然后以最佳进样流速和时间将浓度范围在  $1.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^5$  cfu/mL 的肺炎链球菌菌悬液通入芯片。最后通入 Hoechst 33342 荧光染色剂,避光染色 30 min 后置于倒置荧光显微镜下观察并用 CCD 拍照记录。

**1.4.4 芯片的特异度和可重复性** 将制备好的浓度为  $1.5 \times 10^5$  cfu/mL 的肺炎链球菌 ATCC 49619、大肠埃希菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 菌悬液分别以最佳进样流速和时间通入芯片内,以 PBS 作为阴性对照,在显微镜下观察并记录数据。采用 SPSS 20.0 软件对结果进行独立样本 *t* 检验,确定该微流控芯片的特异度。相同条件下,取浓度为  $1.5 \times 10^5$  cfu/mL 的肺炎链球菌菌悬液,重复检测 10 次,确定芯片可重复性。

## 2 结果

**2.1 成功制作磁免疫微流控芯片** PDMS 的硬度是制作芯片的关键,不同 PDMS 基质和 PDMS 预聚物混合配制比例制作的 PDMS 具有不同硬度,实验证明,当比例为 5:1 时,配制的 PDMS 会出现芯片破裂的现象,出现的碎屑会堵塞进样口且不易清理;当比例为 10:1 时,配制的 PDMS 无芯片破坏的现象且使用胶布能很好地清理打孔碎屑。本研究根据实验结果选用制作 PDMS 的比例为 10:1,成功制作磁免疫微流控芯片。见图 1B。

**2.2 确定最佳进样流速及时间** 进样流速越快,检测所用时间越短,芯片对细菌的捕获率越低;相反进样速度越慢,所用时间越长,捕获率越高,主要原因可能是进样速度太快产生的高流体剪切力使已经结合的细菌脱离下来,导致捕获率下降。因此本研究选择 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  作为最佳进样流速,进样时间为 20 min。见表 1。

表 1 不同进样流速下磁免疫微流控芯片的捕获率

进样流速( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	捕获率(%)	进样完成时间(min)
1	99.8	60
5	98.1	20
10	87.7	10
15	65.2	6

**2.3 不同浓度肺炎链球菌菌悬液通过磁免疫微流控芯片的捕获率比较** 被捕获的肺炎链球菌在荧光显微镜下观察荧光信号清晰可见,而阴性对照无荧光。见图 2。当样本菌悬液浓度  $\geq 1.5 \times 10^3$  cfu/mL 时,芯片捕获率可达到 90% 以上,样本菌悬液浓度  $\leq 1.5 \times 10^2$  cfu/mL 时,芯片捕获率降至 9%。见图 3。

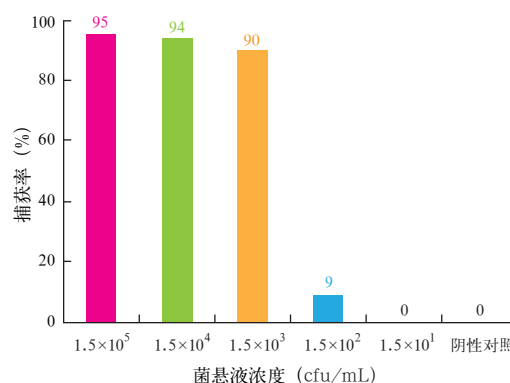
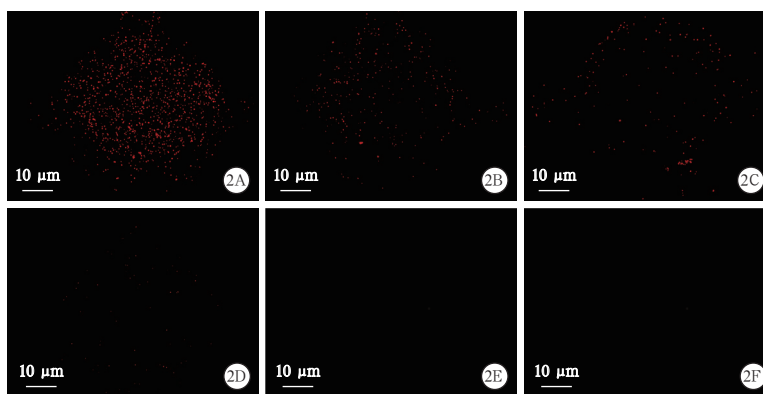


图 3 磁免疫微流控芯片对不同浓度肺炎链球菌捕获率比较

**2.4 磁免疫微流控芯片的检测特异度和可重复性** 此芯片对肺炎链球菌的捕获率为 95%,对大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌均无检测信号,捕获率为 0,检测捕获率比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明此磁免疫微流控芯片在检测过程中具有良好的特异度。同批检测的变异系数(CV)为 1.1%,证明此方法具有较好的可重复性。



注: 2A 为  $1.5 \times 10^5$  cfu/mL, 2B 为  $1.5 \times 10^4$  cfu/mL, 2C 为  $1.5 \times 10^3$  cfu/mL, 2D 为  $1.5 \times 10^2$  cfu/mL, 2E 为  $1.5 \times 10^1$  cfu/mL, 2F 为阴性对照; 使用 Andor Zyla 相机在 40 倍显微镜下观察,曝光 100 ms 拍摄

图 2 磁免疫微流控芯片对不同浓度肺炎链球菌菌悬液的反应区荧光信号



### 3 讨论

**3.1 研究意义** 肺炎链球菌不仅是引起 BM 的主要致病菌,也是引起细菌性肺炎的首位病原菌,由于抗菌药物的广泛应用,使其临床治疗遇到了用药瓶颈期。冒山林等<sup>[9]</sup>报道肺炎链球菌是导致急诊社区发生血流感染的主要致病菌之一,且耐药率呈上升趋势。目前,实验室常用检测方法最快需要 48 h,耗时较长,不能及时有效地协助临床早期诊断。因此,亟需一种快速且准确的肺炎链球菌检测方法。

近年来,越来越多的研究证明微流控芯片技术在此方面具有突出的优越性,它可实现在微米级通道内操控微量流体,通过微进样技术对微通道内流体进行控制,在显微镜下可观察到微通道内不同于宏观体系的现象。Nuchtavorn 等<sup>[6]</sup>设计的毛细管电泳微流控芯片,是通过激光诱导荧光检测大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌,与传统技术相比,纳米荧光检测的生物相容性更优,且光强度更高,但此方法制作芯片操作复杂,不适合批量生产。Suehiro 等<sup>[10]</sup>采用阻抗检测技术实现大肠埃希菌的定量分析,但操作也较为复杂,需要经预处理使细菌吸附在电极表面才能实现细菌的检测,不利于快速诊断。Zhu 等<sup>[11]</sup>将微流体芯片与电化学阻抗检测技术相结合,对大肠埃希菌等细菌进行快速鉴定,可在 2 h 内完成检测,检测限达  $10^3$  cfu/mL,但芯片结合电阻抗技术制作流程复杂,且操作繁琐。本研究团队此前以 PDMS、双面黏性薄膜和玻片为材料设计制作了一种简易型微流控芯片,经表面修饰后检测循环肿瘤细胞,捕获率达到  $(95 \pm 2)\%$ ,可在 30 min 内完成检测,但芯片通道高度为 50  $\mu\text{m}$ ,不适用于检测大小只有几微米的病原微生物<sup>[12]</sup>。相比上述研究,本研究实现了在芯片外进行预处理,将修饰好的磁珠通入芯片内,增大了芯片检测室的比表面积,提高抗原与抗体的结合效率,使抗体更加稳定、均匀地固定在芯片通道内,不仅简化了抗体修饰过程,而且适用于批量快速制作。利用此磁免疫微流控芯片检测肺炎链球菌,捕获率可达 95%,特异度为 100%,可重复性强,对临床早期诊断和治疗由肺炎链球菌引起的 BM 及肺炎具有一定的意义。

**3.2 磁免疫微流控芯片的优势** 本研究设计的微流控芯片选用免疫磁珠结合荧光抗体法,芯片设计简单,根据肺炎链球菌大小设计芯片尺寸,并且在芯片外实现磁珠的表面修饰,减少微流控芯片制作过程中繁琐的步骤,简化流程,缩短检测时间,提高抗

体结合率,实现 95% 的高捕获率。

**3.3 不足与展望** 磁免疫微流控芯片目前已实现对肺炎链球菌的高捕获率,是否能将芯片制作材料改进为环烯烃聚合物(cycloolefin polymer, COP)等新型高科技材料,从而利于批量生产还有待研究。本团队将以此为研究基础,优化实验方案,以实现同时检测几种引起 BM 的主要病原菌为最终目标。

综上所述,本研究研制的磁免疫微流控芯片结合抗原抗体特异性反应,极大提高了芯片检测的敏感度和特异度;利用外部磁场固定免疫磁珠,在芯片外完成磁珠表面抗体修饰,便于免疫芯片批量修饰制造;而且此方法操作简单,可适用于基层医院及社区健康医疗服务中心,市场应用前景较为广阔。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10 (1): 32-42. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70306-8.
- Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, et al. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2011, 24 (3): 557-591. DOI: 10.1128/CMR.00008-11.
- 林炳承,秦建华. 微流控芯片实验室[J]. 色谱, 2005, 23 (5): 456-463. DOI: 10.3321/j.issn:1000-8713.2005.05.005.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology [J]. *Nature*, 2007, 450 (7173): 1235-1239. DOI: 10.1038/nature06385.
- Lien KY, Chuang YH, Hung LY, et al. Rapid isolation and detection of cancer cells by utilizing integrated microfluidic systems [J]. *Lab Chip*, 2010, 10 (21): 2875-2886. DOI: 10.1039/c005178k.
- Nuchtavorn N, Bek F, Macka M, et al. Rapid separations of Nile blue stained microorganisms as cationic charged species by chip-CE with LIF [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33 (9-10): 1421-1426. DOI: 10.1002/elps.201100698.
- 高菊逸,吴传安,杨伟康,等. 新型环烯烃聚合物微流控芯片的设计及其在大肠埃希菌 O157:H7 快速检测中的应用 [J]. *检验医学*, 2020, 35 (2): 148-152.
- 高菊逸,吴传安,杨伟康,等. 基于微流控芯片对流感嗜血杆菌的快速检测 [J]. *实用检验医师杂志*, 2020, 12 (1): 51-54. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.01.015.
- 冒山林,葛梓,赵晖,等. 急诊社区发生血流感染的病原菌分布特点及耐药性分析 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (1): 67-72. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2019.01.014.
- Suehiro J, Ikeda N, Ohtsubo A, et al. Bacterial detection using a carbon nanotube gas sensor coupled with a microheater for ammonia synthesis by aerobic oxidation of organic components [J]. *IET Nanobiotechnol*, 2009, 3 (2): 15-22. DOI: 10.1049/iet-nbt.2008.0011.
- Zhu Y, Fang Q. Analytical detection techniques for droplet microfluidics—a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 787: 24-35. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.064.
- 高菊逸,杜晶辉,张望,等. 简易型微流控芯片捕获循环肿瘤细胞的研究 [J]. *化学学报*, 2014, 72 (1): 69-74. DOI: 10.6023/A13080902.

(收稿日期: 2020-03-16)

(本文编辑: 邵文 张耘菲)