基于微流控荧光定量 PCR 的 MRSA 快速检测技术研究

李阳[1]　朱灵[1,2]　朱灿灿[1]　赵树弥[1]　张龙[1]　邓国庆[1,2]　刘勇[1,2]　王安[1]

（1.中国科学院 安徽光学精密机械研究所，安徽合肥　230031；2.中科院皖江新兴产业技术发展中心，安徽铜陵　244000）

[摘　要] 针对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）检测的问题，发展一种基于微流控荧光定量 PCR 的致病菌快速检测新技术。采用光刻法制作了微流控 PCR 芯片，研制了集成高性能温度控制模块和高灵敏度荧光检测模块的微流控荧光定量 PCR 分析系统。通过检测特异性基因 femA 和 mecA 对 MRSA 进行快速鉴别。实验结果表明，使用微流控 PCR 芯片可以成功实现 MRSA 特异性基因的快速检测，相对传统的管式 PCR，芯片使用 6 μL 试剂在 56 min 完成了 MRSA 特异基因的检测，不仅节约了反应试剂，而且极大提高了检测速度。该技术可扩展到其他致病菌的检测，具有良好的应用前景。

[关键词] 微流控芯片；荧光定量 PCR；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌；快速检测

中图分类号：TB99　R378.1　文献标识码：A　文章编号：2055-5200（2014）02-006-03

DOI：10.11876/mimt201402002

Rapid detection of MRSA using microfluidic real-time PCR　*LI Yang*[1]，*ZHU Ling*[1,2]，*ZHU Can-can*[1]，*ZHAO Shu-mi*[1]，*ZHANG Long*[1]，*DENG Guo-qing*[1,2]，*LIU Yong*[1,2]，*WANG An*[1].（1.Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China；2.Wanjiang Center for Development of Emerging Industrial Technology, Chinese Academy of Sciences ,Tongling 244000, China）

[Abstract] For Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) identification, a new rapid detection technology of pathogenic bacteria was developed using microfluidic real-time PCR. The detection was conducted on a microfluidic chip fabricated through soft lithography method. A microfluidic real-time PCR analysis system，which integrated a high-performance temperature control module and a high-sensitivity fluorescence detection unit，was developed. Specific genes femA and mecA are amplified on a microfluidic chip for fast identification of MRSA. The experimental results showed that the microfluidic PCR chip could achieve rapid detection of specific MRSA genes in 56 min with 6 μL reagent. Comparing with the traditional tube PCR, this microfluidic PCR technology is reagent saving and greatly improving the speed of the detection. The system presented here can be extended to other pathogens' detection and will lead to a promising application prospect.

[Key words] Microfluidic chip；Real-time PCR；MRSA；Rapid detection

基金项目：中科院战略性先导科技专项（项目编号：XDA08040109）、中国科学院合肥物质科学研究院院长基金（项目编号：Y23J321121）。

作者简介：李阳，硕士，研究方向：生物医学光学，E-mail:leon545657@gmail.com。

通讯作者：刘勇，博士，研究方向：检测技术与自动化装置，E-mail: liuyongcas@gmail.com。

前 言

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus, MRSA）是引起院内感染的主要病原菌之一，MRSA具有耐药性和致病能力强的特点易引起交叉感染，极大地增加了临床治疗难度[1]。MRSA检测的常用方法有纸片扩散法、琼脂稀释法、PCR扩增电泳法等[2-4]，但是这些方法耗时长、需要样本量多、实验成本高、操作复杂。因此，研究针对MRSA的快速、准确检测方法具有重要意义。

研究发现，femA基因是金葡菌携带的特异性基因，而MRSA的耐药性是由于其携带的mecA基因编码对β-内酰胺类抗菌药物低亲和力的青霉素结合蛋白（PBP2a）而产生的。使用PCR方法同时检测femA和mecA基因可提高MRSA鉴别的特异性[5]。管式荧光定量PCR方法进行金葡菌的检测需要2个多小时的时间[6-7]，微流控技术通过微加工工艺在芯片上制作微型PCR反应腔，可极大减少PCR反应体系，节约试剂，提高升降温速度，从而实现快速检测[8-9]。

本文采用光刻法制作了PDMS微流控PCR芯片，在自主研发的集成高性能温度控制模块和高灵敏度荧光检测模块的微流控荧光定量PCR分析系统上实现了MRSA的快速检测。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

实验所用的仪器及试剂：匀胶机(中科院微电子所 KW-4A型)；紫外曝光机（美国Uvitron International公司 INTELLI-RAY 400型）；微电脑加热板（PERSDER公司）；SU8 2150光刻胶（美国MicroChem公司）；等离子体清洗机（美国Harrick Plasma公司 PDC-32G型）；PDMS（Dow Corning公司 Silgard 184）；TEC (富连京公司 FPH1-19912ACS1型)；MRSA试剂盒（宁波基内公司）。

研究中使用的PCR平台是自主研制的微流控荧光定量PCR系统，该系统的结构原理图如图1所示。系统包括温度控制模块、荧光检测模块和计算机。温度控制模块由半导体制冷片、散热器及风扇组成，结构如图2所示。半导体制冷片（Thermoelectric Cooler，TEC）具有加热和制冷两种功能，热管鳍片式高性能散热器以及风扇是将TEC 产生的热量充分散发至周围环境中，通过优化设计后的温度控制算法可实现温度的精确控制[10]。

荧光检测模块利用LED作为激发光源，通过CCD（ICX412,SONY公司）对PCR过程所发出的荧光信号进行收集，传输到计算机中进行分析处理。

1.2 芯片结构与加工

微流控芯片如图3所示包含两层结构，上层是通过光刻方法制作的PDMS基片，利用氧等离子体与下层的玻璃板键合。硅片上阳模板的制作：2英寸的硅片利用等离子体清洗后涂以光刻胶，先500 r/min匀胶10 s，再1700 r/min匀胶30 s；前烘过程的温度设置为65 ℃→95 ℃→65 ℃，三个阶段的时间分别为8 min，80 min和10 min；在紫外曝光机中曝光15 s；后烘的温度设置为65 ℃→95 ℃→65 ℃，时间为5 min，25 min和5 min；硅片与显影液（丙酮）中超声显影15 min，显影后晾干备用。

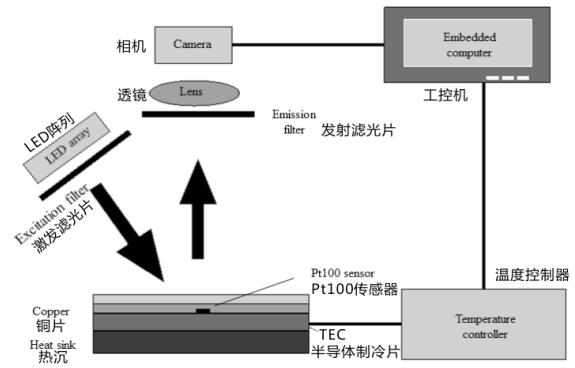

图1 微流控荧光PCR平台结构图

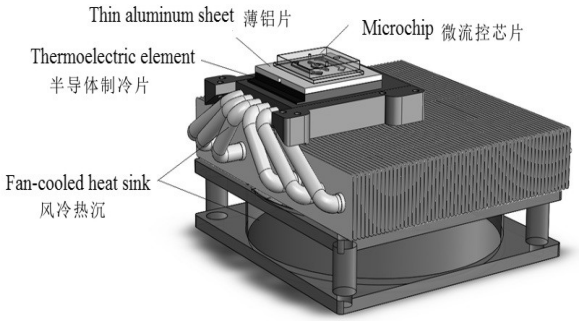

图2 温度控制结构图

将PDMS与固化剂按照质量比10:1进行混合，搅拌均匀，经抽真空后倒在微流控芯片模板上，置于微加热板上85 ℃固化1h；自然冷却后，将PDMS基片从模板上剥离下来，在反应腔的两端引流通道打孔；将打孔后的PDMS基片与玻璃基板用等离子体进行键合；键合好的芯片进行高温高压灭菌处理，再烘干。

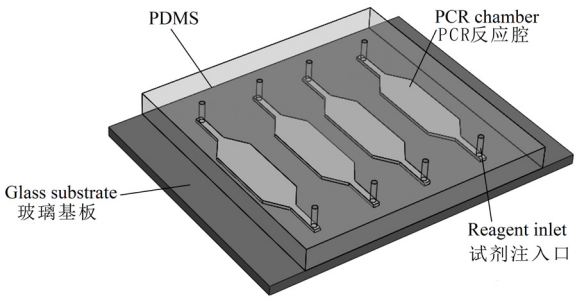

图3 微流控芯片结构图

1.3 微流控 PCR 实验

PCR反应试剂按照PCR试剂盒说明进行配制。20.2 μL的反应体系包括18 μL的MRSA耐药基因核酸

荧光PCR检测混合液与0.2 μL酶（Taq+UNG）以及2 μL的DNA模板（浓度为0.4 ng/μL）。从20.2 μL的体系中抽取6 μL注入微流控芯片中，密封芯片。在微流控荧光PCR平台上进行PCR反应。条件设置如下：37 ℃运行2 min，94 ℃预变性2 min；然后进行PCR扩增，93 ℃变性12 s，60 ℃延伸45 s，循环40个周期。

2 结果与讨论

我们对PCR循环过程中微流控芯片反应腔内部的温度和TEC的温度进行了测定，所得到的结果如图（4）所示。从图中可以看出，TEC通过分段超前校正算法进行控制，从而使芯片中的PCR试剂能够实现快速的升降温。目前，平均升降温速率达到7.48 ℃/s，其中升温速率为11.25 ℃/s，降温速率为5.08 ℃/s。管式荧光定量PCR仪，其负载的升降温速率为2℃/s，单次实验需要2h以上才能完成整个PCR反应。本研究利用微流控荧光PCR的方法，56 min就完成了MRSA的检测，反应时间缩短至1h以内，主要原因在于快速的升降温速度使得PCR循环中各个温区之间切换时间大大缩短。

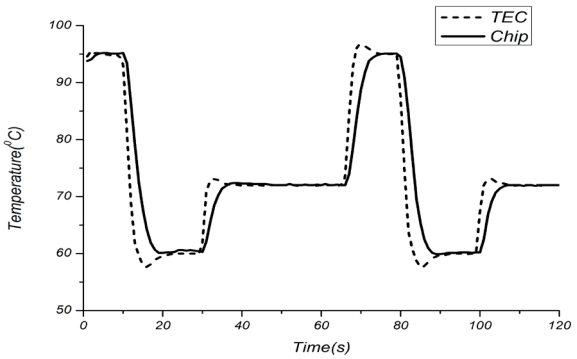

图4 PCR温度循环中芯片内部温度和TEC的温度曲线

将浓度为0.4 ng/μL的MRSA基因工程菌加入6 μL微流控芯片，进行了5次PCR实验 ，扩增曲线如图（5）所示，两个基因片段的Ct值分别为13.48和18.60，被测基因femA和mecA都有明显的扩增，可以确认待测样品即为MRSA阳性样品。相对于试剂盒推荐使用的40 μL PCR反应体系，微流控芯片的试剂量缩小至原来的1/6。本研究采用的PDMS芯片制作简单、成本较低，而且具有很好的生物兼容性，这使得MRSA检测成本大大降低。同时，针对不同的待测样本量，使用光刻法可以制作不同通量的微流控PCR芯片，既可对单个样本进行检测，又可以同时检测多个待测样本，而且通过改变PCR反应腔的大小，甚至能够实现纳升乃至皮升体积的微流体PCR反应。

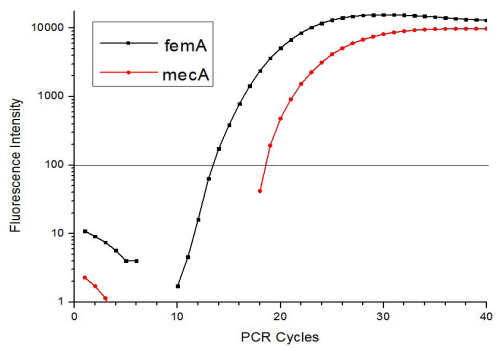

图5 PCR扩增曲线图

3 结论

本研究将微流控芯片和荧光定量PCR技术相结合，实现了MRSA的快速检测。芯片采用高性能温度控制模块进行加热，该温度控制模块有较快的升降温速率，可以减少微流控芯片在升降温过程中消耗的时间，加快PCR反应速度。微流控PCR芯片反应腔体积和反应腔形状可以根据实际样本检测的需要进行个性化设计，通过MEMS技术PCR反应腔可以缩小至微升级乃至纳升级，在同样大小芯片上可以刻上更多的反应腔，从而提高检测通量。本方法不仅可以用于致病菌的快速检测，在其他病原体基因检测中也有着广泛的应用。

参 考 文 献

[1] 杨清宇 , 刘荣森 . 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究 [J]. 中华医院感染学杂志 ,2004, 14(4):478-480.

[2] 晏群 , 邬靖敏 , 李军 , 等 . 6 种检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌方法的应用评价 [J]. 中国现代医学杂志 ,2012,22(026):65-69.

[3] 张凤笑 , 石磊 .PCR 技术在金黄色葡萄球菌中的研究进展 [J]. 现代食品科技 . 2008,24(10):1042-1047.

[4] 牟晓峰 , 赵自云 . 实时荧光定量 PCR 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌方法的建立与应用评价 [J]. 中华医院感染学杂志 .,2011,21(19):4185-4187.

[5] 陈智鸿 , 范昕建 , 吕晓菊 . mecA,femA 基因 PCR 联合扩增法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 [J]. 四川大学学报 (医学版): 2003,34(4):663-666.

[6] 朱以军 , 李向阳 . 荧光实时 PCR 法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究 [J]. 中华医院感染学杂志 ,2007,17(7):898-900.

[7] 姚李英 , 陈涛 , 王升启等 . 高聚物基 PCR 微流控芯片技术 [J]. 中国生物工程杂志 ,2004,24(3):90-93.

[8] Ramalingam N,Rui Z,Liu HB,et al. Real-time PCR-based microfluidic array chip for simultaneous detection of multiple waterborne pathogens[J]. Sensors and Actuators B: Chemical. 2010,145(1):543-552.

[9] Qiu X,Mauk MG,Chen D,Liu C,Bau HH. A large volume,portable,real-time PCR reactor[J]. Lab Chip. 2010,10(22):3170-3077.

[10] 刘勇 , 高娜 , 李志刚 , 等 . 基于分段式超前校正的微流控 PCR 温度控制器 [J]. 传感器与微系统 ,2012,31(9):93-95.