

武丰龙,崔艳英,张志锋,等.生物标志物检测方法的研究进展[J].轻工学报,2022,37(5):50-60.

WU F L, CUI Y Y, ZHANG Z F, et al. Research progress of methods for biomarker detection[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(5): 50-60. DOI: 10. 12187/2022. 05. 006



# 生物标志物检测方法的研究进展

武丰龙<sup>1</sup>, 崔艳英<sup>2</sup>, 张志锋<sup>1</sup>, 王丹丹<sup>2</sup>

1. 郑州轻工业大学 软件学院, 河南 郑州 450001;
2. 郑州轻工业大学 计算机与通信工程学院, 河南 郑州 450001

**摘要:**综述了基于遗传物质(RNA和DNA)、免疫学(抗原/抗体)及结合微芯片技术的生物标志物检测方法的应用研究进展,指出:基于遗传物质的检测方法直接作用于靶标物质,准确性和灵敏度高,但其检测步骤繁多,对检测环境要求高;基于免疫学的检测方法操作简单、便携性高、能实现即时检测但准确性稍低,适用于快速、大规模的病毒筛查;结合微芯片技术的检测方法更加多元化,并能在短时间内实现靶标物质的检测,精确性、自动化程度得到提高,在病毒筛查、疾病诊断等方面表现出巨大的发展潜力。未来生物标志物检测技术可就优化免疫催化反应物、加大核酸提取物纯化程度、提高检测设备自动化程度、构建多重检测系统、实现检测设备微型化及检测信息可视化等方面开展进一步研究,以提高检测准确性、设备便携性,从而实现该技术的持续发展。

**关键词:**生物标志物;检测方法;遗传物质;免疫学;微芯片技术

**中图分类号:**TS207.4; R318 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2022)05-0050-11

## 0 引言

生物标志物是衡量生物体是否发生或存在某种疾病的依据,是反映生物系统、器官、组织、细胞结构功能改变的生化指标。它可以是核酸、蛋白质、酶、糖类、活性分子,也可以是特定的细胞、基因(产物)等其他广泛的生化实体<sup>[1-3]</sup>。生物标志物检测是指通过特定的方法使标志物与生物个体发生反应,直接标定生物体内的靶细胞,灵敏便捷<sup>[4]</sup>。目前,生物标志物的检测方法主要分为基于遗传物质的检测方法和基于免疫学的检测方法,前者通过检测靶标物质的主要组成成分(DNA、RNA)证明其是否存在,后者则利用机体内抗原或抗体进行的免疫反应

确定病毒或疾病是否存在。然而,这些传统的生物标志物检测方法受限于各自的目标靶点,导致其发展方向比较分散,聚力不明显。尤其当病毒大流行的时候,基于遗传物质的检测方法准确性高,但实时性较低;基于免疫学的检测方法在检测实时性方面效果突出,但容易产生假阳性或假阴性。结合微芯片技术的检测方法使检测手段趋于多元化,可弥补使用单一检测方法的不足。鉴于此,本文拟对基于遗传物质、免疫学及结合微芯片的生物标志物检测方法的研究现状进行梳理,并尝试结合现代光学、电学和磁学技术,从高灵敏度、高安全性、设备微型化、方法多元化、信息可视化等方面展望生物标志物检测方法的发展趋势,为各种生物标志物检测方法的发展提供聚

收稿日期:2021-06-11;修回日期:2022-01-20

基金项目:国家自然科学基金面上基金项目(61975187)

作者简介:武丰龙(1976—),男,河南省南阳市人,郑州轻工业大学讲师,主要研究方向为智能信息检测与信息计算。E-mail: wufenglong1112@163.com

通信作者:张志锋(1978—),男,河南省周口市人,郑州轻工业大学教授,主要研究方向为光谱诊断技术、深度学习、智能信息。E-mail: zhangzhifeng@zzuli.edu.cn

力效应,为突破病毒快速检测方法的技术障碍或瓶颈,同时也为生物标志物检测方法在病毒筛查、疾病诊断、食品安全控制等领域的应用提供依据和支撑。

## 1 基于遗传物质的检测方法

作为病毒遗传物质的核酸分为两类:一类是常见的生物和病毒遗传物质 DNA,比如乙肝病毒;另一类是特殊的具有强致病性的病毒遗传物质 RNA,比如新冠病毒<sup>[5-6]</sup>。核酸分离纯化是把样品中的核酸与其他物质裂解、分离的过程<sup>[7]</sup>,提取物的纯化程度与检测的准确性呈正相关。传统的液相抽取法耗时费力,提取结果为大量核酸粗品,且在一定程度上会对人体健康造成危害。固相提取法中的磁珠吸附法因步骤简单、易制备而备受业界青睐,其主要利用磁珠表面的硅羟基与核酸进行反应形成复合物,经过施加外磁场,将被吸附的核酸与其他物质分离,实现纯化<sup>[8]</sup>。该方法采集样品中的病毒遗传物质含量通常较低,需进行指数扩增使之达到一定的含量,便于后续检测。

### 1.1 聚合酶链式反应(PCR)技术

PCR是一种在体外模拟细胞内DNA复制的基因扩增技术,多数情况下仅用一个试管便可实现基因的大量复制。标准的PCR过程分为三步:高温变性、低温配对、适温延伸。随着PCR循环次数的增加,DNA含量也会成倍增加<sup>[9-10]</sup>。

近30年来,PCR技术持续不断地改进,实时荧光定量PCR(qPCR)、逆转录-实时荧光定量PCR(RT-qPCR)、数字PCR(dPCR)等衍生技术在病毒基因检测、食品安全控制等领域均有广泛应用<sup>[11-17]</sup>。qPCR在PCR的基础上加入荧光染料或探针,通过荧光信号反映PCR的实时过程,能实现定量、快速检测。何久香等<sup>[11]</sup>根据非洲猪瘟病毒的保守区域设计特异性引物,通过荧光染料TB Green qPCR方法筛选出最佳引物对,提高了检测灵敏性。RT-qPCR通过荧光信号的强弱对靶标物质进行定量分析,诊断耗时短,检测样本多且成本低<sup>[13]</sup>。四川大学华西医院研发的具有特异性引物的多重荧光RT-PCR新型冠状病毒检测试剂盒,对病毒核酸的检测灵敏度达到200 copy/mL<sup>[14]</sup>。dPCR技术灵敏

度高,由于其监测下限可低至单拷贝,对痕量样品检测尤为重要<sup>[15]</sup>。J. Q. Chen等<sup>[16]</sup>运用新发现的基因靶标,通过qPCR、dPCR技术对食品和环境中的李斯特菌进行活性检测,能有效监控食品安全和环境污染。苗小草等<sup>[17]</sup>建立了多重PCR体系,能同时快速检测乳制品中的沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、克罗诺杆菌4种食源性致病菌,为食品中这4种目标菌的检测提供了有效途径。然而PCR技术操作复杂,对仪器和人员的要求较高,不适合基层或现场快速诊断。

### 1.2 环介导等温扩增(LAMP)技术

PCR技术要经历高温、去火等步骤<sup>[18]</sup>,而LAMP技术仅在等温条件下即可实现扩增,对仪器要求较低,且在1h内即可实现 $10^9$ 倍的扩增效率,扩增效果是PCR技术的数倍,在即时检测方面意义重大。

在食品病原菌检测中,S. J. Oh等<sup>[19]</sup>设计了一种离心微流控装置,该装置针对大肠杆菌O157:H7的基因组DNA设置特定的引物,可实现对多种食源性病原菌的检测,且此装置高敏感、高通量,便于肉眼直观检测。S. A. Besuschio等<sup>[20]</sup>在检测人体血液克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)DNA时,利用钙黄绿素与LAMP反应体系中的 $Mg^{2+}$ 结合会使颜色由黄变绿的特点进行检测,简单便捷。雅培公司的ID NOW检测SARS-CoV-2工具采用LAMP技术,可在单一恒温条件下快速即时地扩增病毒RNA目标序列,然而近期有研究发现,由于样本运输条件和样本处理不当,该方法会产生12%~48%的假阴性率<sup>[21]</sup>。LAMP技术在实际应用中易受假性污染的影响,只有防止假性污染才能得到准确可靠的检测结果。

### 1.3 核酸恒温扩增实时荧光检测(SAT)技术

SAT是我国自主研发的综合qPCR和LAMP的一种新型核酸检测技术。该技术运用特异性靶标捕获技术对靶标核酸进行提取后,在M-MLV逆转录酶、T7RNA聚合酶联合作用下实现核酸扩增<sup>[22]</sup>。特异性靶标捕获核酸保证了检测结果的高准确性,有效避免了假阳性、假阴性结果。

在1180例儿童支原体肺炎(MPP)中,J. Li

等<sup>[23]</sup>利用 SAT 技术诊断 MPP,其敏感性、特异性分别为 97%、95.1%。M. Tang 等<sup>[24]</sup>用 SAT 技术、胶体金法、酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 MPP 发病期的阳性率,结果显示 SAT 的阳性率(29.9%)高于胶体金法(16.63%)和 ELISA(20.07%),胶体金联合 SAT 是早期 MPP 的可靠检测方法。此外,SAT 技术检测的靶标核酸是 RNA,基于 RNA 易降解的特性,检测结果可作为区分死菌、活菌的依据,更有利于 MPP 康复治疗的监测。由于 SAT 仅需恒温反应条件,可在一定程度上降低对检测仪器的要求,利于更广泛的推广应用。

#### 1.4 基因检测技术

全基因组测序是作用于病毒核酸整个序列的检测技术,全面但昂贵耗时。纳米孔测序(NTS)技术整合了全基因组测序和 RT-PCR 的优点,先扩增靶标基因序列,再进行测序。此技术依赖一种特殊的纳米孔,当待测核酸单链通过此纳米孔时,化学碱基会被转换为电信号,根据不同碱基产生的不同电流,对电信号进行收集、整理、转化后通过检测器,即可获得详细的核酸序列信息<sup>[25]</sup>。

2020年6月,M. Wang 等<sup>[26]</sup>基于 NTS 同时检测 SARS-CoV-2 和其他 5 种呼吸道病毒,其中对 SARS-CoV-2 的特异性达到 100%。K. Tafess 等<sup>[27]</sup>利用 NTS 技术对临床结核病人的双歧杆菌耐药基因进行分析后发现,平均临床敏感性和临床特异性分别高达 94.8% 和 98.0%,整个测序仅需 15 h。R. Liu 等<sup>[28]</sup>对比分析了基于 NTS 和成簇的规律间隔短回文重复序列相关蛋白(CRISPR/Cas 系统)的方法快速检测 SARS-CoV-2 病毒的可行性,发现灵敏度高、综合性强、成本低的 NTS 更具优势。

CRISPR/Cas 系统利用自身的特殊机制对靶标基因作出响应,即当感受到病毒的攻击时,CRISPR/Cas 系统会适应并记录此病毒到间隔区,待此病毒再次入侵时,Cas 蛋白在向导 RNA 的引导下会特异性地识别并裂解靶标 RNA,使其无法完整地复制和表达。张锋团队<sup>[29]</sup>利用这一特性开发的高灵敏核酸检测系统,可以有效预防入侵者的攻击,积极遏制流行病毒的爆发。M. Fareh 等<sup>[30]</sup>发现 CRISPR-Cas13b 系统能够识别并切割 SARS-CoV-2 病毒,阻

止其在人体细胞中的增殖。S. K. Bose 等<sup>[31]</sup>利用 CRISPR 技术将小鼠模型 DNA 中突变的腺嘌呤转换成鸟嘌呤纠正贺勒氏症(一种先天性代谢紊乱疾病)的碱基突变,该结果表明利用 CRISPR 技术有望治疗产前和产后的贺勒氏症。

NTS 和 CRISPR/Cas 系统是相对较新的基因检测技术。NTS 技术可实现单分子测序,具有高通量和高灵敏度,可实时完成数据的读取,但目前该技术还不成熟,准确度有待提高。CRISPR/Cas 系统因合成使用方便、特异性高、安全性好等特点而具有较大潜力,但其受伦理因素制约,且其编辑精确度、脱靶效应等问题仍亟待解决。

## 2 基于免疫学的检测方法

基于免疫学的检测方法对实验条件要求偏低,有利于大规模的筛查,常用方法主要有 ELISA、电化学发光免疫法(ECLI)、免疫层析(ICA)技术、磁免疫技术等。

### 2.1 ELISA

ELISA 是一种利用特定抗体(或抗原)在样本中捕获目标抗原(或抗体),通过酶与底物发生反应进行靶标分子检测的方法,在疾病治疗、病毒检测方面应用广泛。布鲁氏菌病是一种世界性较为严重的人畜共患疾病,因 ELISA 具有简单、快速响应等优点,使用该方法诊断布鲁氏菌病已获得全球普遍认可<sup>[32]</sup>。作为核酸检测的辅助手段,ELISA 对病毒疫苗研发具有重要的参考价值。使用 ELISA 与横向流动免疫层析技术结合的方法对 SARS-CoV-2 抗体进行检测,可有效监测病毒感染,预测病毒趋势<sup>[33]</sup>。

随着 ELISA 的发展,双抗体夹心法(DAS)逐渐为人们所熟知,该方法将能识别靶标基因表位的抗体固定于微孔板载体上并与靶标基因结合,再加入另一个由酶标记的特异性抗体,形成双抗体夹心复合物,通过酶催化底物形成的有色产物进行分析检测。T. Xiang 等<sup>[34]</sup>构建了一种新的双抗体夹心-横向流动免疫分析法(DAS-LFIA),用于检测人血清或血浆中的抗-HCV(丙型肝炎病毒)抗体,实验结果表明该方法的敏感性和特异性均为 100%。DAS 使酶的敏感性和抗原抗体反应的特异性得到双重保

障,但只有拥有两个以上抗体结合部位的抗原才能用此方法检测。ELISA 特异性好、灵敏度高,但通常需依赖昂贵的仪器设备和专业操作人员,检测周期长,不适于对偏远地区的即时检测。

## 2.2 ECLI

ECLI 是基于化学发光免疫分析(CLIA)并加以改进的方法,通过在电场中施加一定电压使电子发生转移,从而产生化学发光现象。钌联吡啶( $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ )是常见的电化学发光剂, $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ 与激发态三丙胺(TPA)发生氧化还原反应, $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ 在反应过程中会释放能量从而发光,整个反应过程可以不断循环,测定信号不断放大,从而使检测灵敏度大幅度提高<sup>[35-36]</sup>。

L. Chang 等<sup>[37]</sup>对比分析了 1029 例 HIV(艾滋病病毒)样本,ECLI 相比大多数的 ELISA 试剂盒有更高的特异性(99.0%)和准确性(93.8%),拓宽了血液筛查的途径。由于 TPA 存在生物毒性高、背景信号强等问题,D. Pan 等<sup>[38]</sup>开发了一种氧化钨( $WO_{3-x}$ )纳米点新型共反应剂,其动物毒性是 TPA 的 1/300,且与 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 联用时的效率不亚于 TPA。Y. Nie 等<sup>[39]</sup>利用非酶催化发夹组装和杂交链式反应成功设计了一种多功能、超灵敏的电化学发光传感平台用于监测乳腺癌生物标志物,有效避免了单个发光体的干扰,提高了检测的准确性。ECLI 不仅继承了 CLIA 的优点,能控制待检物质的氧化还原能力,而且可以调节发光的时间和空间,有利于可逆物质的循环利用。

## 2.3 ICA 技术

ICA 技术结合了免疫学原理和层析原理。在毛细管作用下,待测样品在硝酸纤维膜上移动至固定抗体的特定区域时,抗原与抗体发生特异性结合,在短时间内显示出特殊颜色,据此对待测样品进行分析<sup>[40]</sup>。ICA 技术拥有周期短、成本低、仪器设备简单、无人员要求等特点,在即时检测方面发挥着重要作用,其中胶体金 ICA(GICA)就是一种经典的标志物检测技术。

GICA 技术省去了 ELAS 繁琐的步骤,避免了放射性同位素、有毒底物等的使用<sup>[41]</sup>,操作简便,适于野外或临床的现场应用。张稳健等<sup>[42]</sup>对新冠疑似

群体使用 GICA 技术进行检测,对患者 IgM/IgG 抗体呈阳性的符合率为 96.1%,健康人和其他发热病人的 IgM 和 IgG 检测特异性分别为 99%和 98%。谢艳君等<sup>[43]</sup>利用 GICA 技术制备了用于检测中药材中黄曲霉毒素 B1 的胶体金试纸条,证明粒径为 17.4 nm 的胶体金灵敏度最高,检测限为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,检测时间为 17 min,有利于大批量中药材的快速筛查。但 GICA 技术是凭借颜色信号通过视觉观察来判断检测结果的,只有表层约 10  $\mu\text{m}$  的信号可以被检测到,这就使得整个检测膜内部产生的信号容易丢失,导致灵敏度降低。

以  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒(MNPs)作为标记物并以磁信号作为检测指标的磁纳米免疫层析技术可以避免视觉观察降低灵敏度的问题,能够对整个 NC 膜上(约 150  $\mu\text{m}$  厚)MNPs 的磁场进行定量<sup>[44]</sup>,其检测灵敏度比传统的标记物效果提高了 10~100 倍。MNPs 产生的磁信号不随时间的延长而衰减<sup>[45]</sup>,使测量结果可以很好地保存,且磁性检测背景信号干扰小、磁信号稳定、灵敏度高,可以实现快速检测。

S. Xia 等<sup>[46]</sup>以金磁性双功能纳米粒(GMBN)作为新型标记物制备霍乱沙门氏菌免疫层析试纸条用于食源性病原菌的快速检测,其中对霍乱猪链球菌的捕获率为 82.4%,检测灵敏度为  $5 \times 10^5$  CFU/mL,在食品样品(全脂牛奶)中完成全部步骤的检测时间为 20 h,提高了食源性病原微生物检测的敏感度。张博<sup>[47]</sup>制备了以多包裹磁纳米球为标记物的双模态联检免疫层析试纸条,对乳腺癌、急性心肌梗塞相关标志物的检测灵敏度分别为 0.06 ng/mL、0.049 ng/mL,提高了检出率。新型材料 MNPs 的使用提高了 ICA 技术的检测灵敏度,无需专业人员的操作、昂贵的设备和复杂的样本前处理,可快速判读结果,在即时检测方面发展潜力较大。然而由于功能纳米颗粒制备、表面修饰等技术较为复杂,且功能性表面修饰对保存环境要求较高,目前使用该技术的成本仍较高。

## 2.4 磁免疫技术

磁免疫技术采用 MNPs 作为示踪检测物,通过检测标记物响应的磁信号获取标记物信息<sup>[48]</sup>,主要

类型包括磁电阻(MR)传感器、磁粒子光谱(MPS)、核磁共振(NMR)等。

MR传感器将MNP的磁响应信号转化为可读的电信号进行病毒检测。在目前的研究中,MR分为巨磁电阻(GMR)和磁隧道结(MTJs)两种类型。GMR效应主要存在于铁磁性和非磁性金属交替重叠的多层结构中<sup>[49]</sup>。当两个相邻铁磁层的磁矩平行时,多层膜呈现低电阻状态;当磁矩反平行时,多层膜呈现高电阻状态。根据GMR传感器电阻或电压的变化,可定量检测待检生物分子的含量。MTJs类似于GMR自旋阀的堆叠结构,相邻的铁磁层被绝缘层隔开,其中绝缘层通常是一种氧化物( $\text{AlO}_x$ 或 $\text{MgO}$ )<sup>[50]</sup>。X. Sun等<sup>[51]</sup>使用GMR生物传感器检测大肠杆菌抗原,检测限为100 CFU/mL。P. P. Sharma等<sup>[52]</sup>利用微流控集成MTJs技术检测戊型肝炎病毒、单核增生李斯特菌和鼠伤寒沙门氏菌的致病性DNA,检测灵敏度高于电化学传感器。L. Li等<sup>[53]</sup>使用MTJs传感器检测HIV-1p24抗原的检测时间在10 min内,检测限为0.01  $\mu\text{g/mL}$ 。J. Choi等<sup>[54]</sup>研制了一种基于GMR生物传感器技术的便携式定量免疫分析平台,该平台可在15 min内实现多个生物定量检测结果的显示。

MPS是磁颗粒成像(MPI)的衍生技术,利用MNP的非线性磁响应可以构建三维层析图像<sup>[55]</sup>。在外部正弦磁场(激励磁场)作用下,激励磁场周期性地磁化MNP,根据电磁感应原理,通过记录探测线圈随时间变化的电压,即可对MNP的响应信号进行分析。布朗弛豫和尼尔弛豫的弛豫时间长短是生物免疫检测或病毒检测的基础。如果MNP表面结合有生物分子(如抗体、DNA、RNA和蛋白质),其水力学半径会变大,进而影响MNP在分散体系中的转动<sup>[56]</sup>,因此布朗弛豫被抑制,磁响应减弱,在MPS中可以观测到较低的谐波振幅。提取具有特征频率的幅值信息能够实现对生物样品中参与反应的物质的检测。K. Wu等<sup>[57]</sup>利用MNP偶联H1N1核蛋白抗体,将7组不同浓度的偶联复合体实验组与2组阴性结果对比,发现不同浓度谐波振幅具有明显差异,据此完成了H1N1核蛋白抗体的免洗检测。赵兴一<sup>[58]</sup>设计了一种磁免疫测量系统,实现了

对具有不同水力学半径MNP磁化强度的测量,达到了生物免疫检测的目的。

NMR通过测量样品溶液中氢质子的进动信号检测MNP靶标样品。MNP比表面积大,由MNP的局部磁场不均匀性可引起周围数百万个水质子的进动频率发生变化。由于单分散的MNP在与目标生物分子结合反应后聚集,团簇可使周围水分子转动时的相位差发生变化,从而减少T2弛豫时间,通过T2弛豫时间的变化可表征诸如蛋白质、抗体、多肽、核酸等生物分子是否存在<sup>[59]</sup>。此外,NMR可将检测信号放大,使灵敏度提高。M. Liong等<sup>[60]</sup>报道了基于磁条形码对分枝杆菌进行的核酸检测,使用NMR技术能够检测被MNP标记的分枝杆菌。NMR技术被用于评估人工设计的寡肽与埃博拉病毒VP24的结合能力,对抑制埃博拉病毒VP24与人核蛋白的交互,从而降低埃博拉病毒的毒性有积极作用<sup>[61-62]</sup>。

磁免疫技术的优势在于生物检测环境的无磁性,即“磁透明”(相对磁导率近似等于1),受检测环境和检测样本影响较小,背景噪声较低,可用于非透明和未经处理的样本。此外,超顺磁性的MNP具有高磁化率、生物兼容性好等特性。然而,仪器缺乏便携性、设备成本高等因素限制了磁免疫技术的快速发展。

### 3 结合微芯片技术的检测方法

为进一步提高检测结果的精确性,生物标志物检测方法要尽可能多元化。将各种检测技术与微芯片(微流控芯片、生物芯片)相结合,是目前生物标志物检测方法的发展趋势。微芯片技术将样品的制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块芯片上,加入少量的样本,在短时间内即可自动分析出结果<sup>[63-64]</sup>。

与PCR技术、SAT、ELISA结合的微流控芯片技术常运用于临床诊断、食品安全控制等领域。朱灿灿<sup>[65]</sup>提出了多重巢式固相PCR扩增新方法,与微流控芯片技术结合,建立了一体化微流控核酸分析芯片,并与国际先进仪器设备进行HPV对比检测,准确性达100%,可在1 h内完成5种基因分型的鉴

定,大大降低了试剂成本和检测时间。A. A. Sayad 等<sup>[66]</sup>使用微流控恒温扩增芯片对沙门氏菌进行检测,在食品中的检测限为 $5 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,一次加入样品,经过全自动流程在 70 min 内即可完成检测。王艺蓓<sup>[67]</sup>运用微流控芯片与 ELISA 构建微液滴技术的球刷—酶信号放大系统,该系统具有极强的荧光信号放大能力,检测灵敏度较高。ECLI 在微芯片应用中也有较多研究。与纸基微流控结合的电化学生物传感器、数字微流控电化学生物传感器已广泛应用于病毒检测、疾病治疗等研究中,在即时检测方面有很大的发展潜力<sup>[68-69]</sup>。基于自身独特的化学和物理性能,MNPs 结合生物芯片有一定的应用前景。K. Petkovix 等<sup>[70]</sup>开发了一种使用 MNPs 进行免疫检测的集成芯片装置,对于检测亨德拉(Hendra)病毒效果好,15 min 内检测限约为 0.48 ng/mL。微芯片技术易与其他现代检测技术相结合,具有试剂消耗低、分析时间短、灵敏度高等优点,有利于高通量、低消耗的即时检测。

## 4 结语与展望

本文综述了基于遗传物质、免疫学及结合微芯片技术的生物标志物检测方法的研究现状,目前生物标志物检测方法向纳米尺度转变,在便携性、实时检测、检测灵敏度方面有了一定的提高,然而这些方法仍存在一定的局限性。基于遗传物质的生物标志物检测方法不适用于现场检测。PCR、LAMP 实现快速检测仍需在核酸提取、扩增等方面进行优化;SAT 能够最大限度地去除杂质,同时在核酸扩增阶段也摆脱了传统 PCR 技术对大型仪器的依赖,极大提升了检测的灵敏度和特异性,但如何降低 SAT 酶的成本、提升酶的运输保存稳定性、优化引物设计等仍需进一步深入研究;NTS 灵敏度高但准确率稍低。基于免疫学的检测方法操作简单、成本低廉,适用于生物标志物现场快速筛查。ELISA 特异性好、灵敏度高但检测过程较繁琐且难以同时检测多种成分;ECLI 通过电信号表征检测信息,避免了干扰因素,提高了准确性;ICA 操作方便且能实现快速检测;磁免疫技术灵敏度高但便携性差。随着抗原种类和数量的不断增多,针对不同的抗原制备高质量的靶标

抗体也是一大难点,基于免疫反应的检测方法不能做到严格的定量检测。但 LAMP 与 ICA 结合使用的方法不仅能满足一定程度的定量检测,而且操作简单,已在基因检测领域崭露头角。结合微芯片的检测方法在检测灵敏度、检测实时性上比传统的 PCR、LAMP 更胜一筹;微芯片技术集成到电化学传感器、磁免疫传感器的微型检测设备也已广泛应用到病毒、疾病等的检测;微芯片与纳米材料结合,提高了检测效率,为研发高性能便携式设备奠定了基础。结合微芯片的检测方法有望满足高便携性、高通量、低消耗、低污染等的需求。

综上所述,生物标志物检测技术仍需不断融合现代新技术以实现可持续发展:1) 优化免疫催化反应物实现信号放大,加大核酸提取物纯化程度实现特异性检测,开发诸如核酸适配体、MIP(分子印迹聚合物)等新型合成受体代替单一抗体,以最大限度提高检测灵敏度,使检测结果准确性更高;核酸技术与免疫学技术联合使用的新型核酸试纸条,将快速高效地实现靶标物质的检测,提高检测设备自动化程度,降低检测人员的安全风险隐患。2) 与纳米微型相机、纳米太阳能芯片等各种纳米产品结合使用的检测设备将会更趋于微型化,为户外、经济欠发达地区提供更大的检测便利性。3) 加强多组分免疫传感分析研究,开发检测方法联合使用的多重检测系统,层层筛查靶标物质,减少假阳性、假阴性的发生概率,提高检测准确性。4) 开发与智能检测设备(智能手机、微电子设备)集成使用的智能化生物标志物检测方法,结合特殊的算法(如深度卷积神经网络)将检测信号(光、电、磁信号)转换为数字信号,对检测过程及结果进行严格的实时监测,并实现智能检测设备的直观显示,有利于预测及控制疾病发展动态。未来高灵敏度、高安全性、检测设备微型化、检测方法多元化、检测结果信息可视化的检测技术将成为生物标志物检测方法的发展趋势,为疾病诊断、病毒预防、食品安全等提供强有力的检测手段。

## 参考文献:

[1] XIE V. Effective biomarker measurement is key

- for biotherapeutic development [J]. *Bioanalysis*, 2022, 14(8):451-453.
- [2] JAYANTHI V S A, DAS A B, SAXEBA U. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 91:15-23.
- [3] HUANG L Y, WU H W, HSIEH K, et al. Microfluidic platforms for discovery and detection of molecular biomarkers [J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2014, 16(5):941-963.
- [4] LIU R T, YE X Y, CUI T H. Recent progress of biomarker detection sensors [J]. *Research*, 2020, 2020:1-26.
- [5] CHAN J F W, YUAN S F, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: A study of a family cluster [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223):514-523.
- [6] ORAN D P, TOPOL E J. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A narrative review [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 173(5):362-367.
- [7] TANACAN A, EROL S, TURGAY B, et al. The rate of SARS-CoV-2 positivity in asymptomatic pregnant women admitted to hospital for delivery: Experience of a pandemic center in Turkey [J]. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2020, 253:31-34.
- [8] CHEN Z, WU Y Q, CHEN H, et al. Design and application of automatic and rapid nucleic acid extractor using magnetic nanoparticles [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2016, 16(7):6998-7004.
- [9] TANG C I, HE Z Y, LIU H M, et al. Application of magnetic nanoparticles in nucleic acid detection [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, 18:1-19.
- [10] AI T, YANG Z L, HOU H Y, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A report of 1014 cases [J]. *Radiology*, 2020, 296(2):E32-E40.
- [11] 何久香, 丁晓艳, 周晓杨, 等. 一种快速灵敏的非洲猪瘟病毒荧光定量PCR检测方法的建立 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(5):497-501, 508.
- [12] KILANI M M, ODEH M M, SHALABI M, et al. Clinical and laboratory characteristics of SARS-CoV2-infected paediatric patients in Jordan: Serial RT-PCR testing until discharge [J]. *Paediatrics and International Child Health*, 2021, 41(1):83-92.
- [13] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR [J]. *Eurosurveillance*, 2020, 25(3):2000045.
- [14] 钟慧钰, 赵珍珍, 宋兴勃, 等. 新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验 [J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(5):523-526.
- [15] FALZONE L, MUSSO N, GATTUSO G, et al. Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2020, 46(3):957-964.
- [16] CHEN J Q, HEALEY S, REGAN P, et al. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2017, 6(2):39-59.
- [17] 苗小草, 陈万义, 施春雷, 等. 乳品中4种常见致病菌多重PCR检测方法的建立 [J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2018, 39(1):63-71.
- [18] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects [J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1):1-5.
- [19] OH S J, PARK B H, JUNG J H, et al. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric

- ric foodborne pathogen detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 75:293–300.
- [20] BESUSCHIO S A, LLANO MURCIA M, BENATAR A F, et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017, 11(7): e0005779.
- [21] BASU A, ZINGER T, INGLIMA K, et al. Performance of Abbott ID Now COVID-19 rapid nucleic acid amplification test using nasopharyngeal swabs transported in viral transport media and dry nasal swabs in a New York City academic institution[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(8): e01136-20.
- [22] 岳晓红, 宋银森, 葛丽丽, 等. 实时荧光核酸恒温扩增检测技术、胶体金法、酶联免疫法在检测儿童肺炎支原体感染中的应用比较[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(16): 1965–1969.
- [23] LI J Q, SUN L, WU X R, et al. Early diagnosis of mycoplasma pneumonia in children: Simultaneous amplification and testing (SAT) is the key[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2019, 7: 441.
- [24] TANG M Y, WANG D, TONG X, et al. Comparison of different detection methods for Mycoplasma pneumonia infection in children with community-acquired pneumonia[J]. *BMC Pediatrics*, 2021, 21(1): 1–8.
- [25] 刘宁, 王超, 王芳芳, 等. DNA 分析技术在单基因遗传病产前诊断中的研究进展[J]. *中国计划生育学杂志*, 2021, 29(9): 2007–2012.
- [26] WANG M, FU A S, HU B, et al. Nanopore targeted sequencing for the accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses[J]. *Small*, 2020, 16(32): 2002169.
- [27] TAFESS K, NG T T L, LAO H Y, et al. Targeted-sequencing workflows for comprehensive drug resistance profiling of *Mycobacterium tuberculosis* cultures using two commercial sequencing platforms: Comparison of analytical and diagnostic performance, turnaround time, and cost[J]. *Clinical Chemistry*, 2020, 66(6): 809–820.
- [28] LIU R, FU A S, DENG Z X, et al. Promising methods for detection of novel coronavirus SARS-CoV-2[J]. *View*, 2020, 1(1): e4.
- [29] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [30] FAREH M, ZHAO W, HU W X, et al. Reprogrammed CRISPR-Cas13b suppresses SARS-CoV-2 replication and circumvents its mutational escape through mismatch tolerance[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4270.
- [31] BOSE S K, WHITE B M, KASHYAP M V, et al. In utero adenine base editing corrects multi-organ pathology in a lethal lysosomal storage disease [J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4291.
- [32] 朱珠, 陈安林, 彭丹, 等. 布鲁氏菌病的诊断及治疗方法研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(7): 104–107.
- [33] AMANAT F, STADLBAUER D, STROHMEIER S, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans[J]. *Nature Medicine*, 2020, 26(7): 1033–1036.
- [34] XIANG T X, JIANG Z, ZHENG J, et al. A novel double antibody sandwich-lateral flow immunoassay for the rapid and simple detection of hepatitis C virus[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2012, 30(5): 1041–1047.
- [35] MADIYA M, SAGAR S, VISHWANATH S, et al. Comparing assay performance of ELISA and chemiluminescence immunoassay in detecting antibodies to hepatitis B surface antigen [J]. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2016, 10(11): DC22–DC25.
- [36] AFZAL N, TARIQ N, RAZA S, et al. Diagnostic



- accuracy of electro-chemiluminescence immunoassay anti-SARS-CoV-2 serological test [J]. *Cureus*, 2021, 13(1): e12588.
- [37] CHANG L, ZHAO J P, GUO F, et al. Comparative evaluation and measure of accuracy of ELISAs, CLIAs, and ECLIAs for the detection of HIV infection among blood donors in China [J]. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 2020, 2020: 2164685.
- [38] PAN D, FANG Z Z, YANG E L, et al. Facile preparation of  $WO_{3-x}$  dots with remarkably low toxicity and uncompromised activity as co-reactants for clinical diagnosis by electrochemiluminescence [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(38): 16747–16754.
- [39] NIE Y M, YUAN X D, ZHANG P, et al. Versatile and ultrasensitive electrochemiluminescence biosensor for biomarker detection based on non-enzymatic amplification and aptamer-triggered emitter release [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(5): 3452–3458.
- [40] 张来宾, 张珊珊, 杨文, 等. 胶体金免疫层析技术在食品检测中的应用 [J]. *吉林农业*, 2018(8): 88.
- [41] JU Y, HAO H J, XIONG G H, et al. Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2010, 133(2/4): 207–211.
- [42] 张稳健, 吕欣, 黄驰, 等. 胶体金免疫层析法检测新型冠状病毒 IgM/IgG 抗体的临床评价与应用 [J]. *病毒学报*, 2020, 36(3): 348–354.
- [43] 谢艳君. 胶体金试纸条现场可视化检测中药中黄曲霉毒素 B1 研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [44] HUANG Z, HU S, XIONG Y H, et al. Application and development of super paramagnetic nanoparticles in sample pretreatment and immunochromatographic assay [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 114: 151–170.
- [45] DOBSON J. Gene therapy progress and prospects: Magnetic nanoparticle-based gene delivery [J]. *Gene Therapy*, 2006, 13(4): 283.
- [46] XIA S Q, YU Z B, LIU D F, et al. Developing a novel immunochromatographic test strip with gold magnetic bifunctional nanobeads (GMBN) for efficient detection of *Salmonella choleraesuis* in milk [J]. *Food Control*, 2016, 59: 507–512.
- [47] 张博. 基于磁致荧光淬灭性能的双模态免疫层析检测技术初探 [D]. 天津: 天津大学, 2018.
- [48] 邵奕霖. 磁免疫微流控芯片的研制及其在肺炎链球菌检测中的应用 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [49] WIBOWO N A, JUHARNI J, ALFANSURI T, et al. Core-shell  $Fe_3O_4@Ag$  magnetic nanoparticles detection using spin-valve GMR sensing element in the wheatstone bridge circuit [J]. *Materials Research Express*, 2020, 7(12): 126102.
- [50] LOONG L M, LEE W, QIU X, et al. Flexible MgO barrier magnetic tunnel junctions [J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(25): 4983–4990.
- [51] SUN X C, LEI C, GUO L, et al. Separable detecting of *Escherichia coli* O157H: H7 by a giant magneto-resistance-based bio-sensing system [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2016, 234: 485–492.
- [52] SHARMA P P, ALBISETTI E, MASSETTI M, et al. Integrated platform for detecting pathogenic DNA via magnetic tunneling junction-based biosensors [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2017, 242: 280–287.
- [53] LI L, MAK K Y, ZHOU Y. Detection of HIV-1 antigen based on magnetic tunnel junction sensors [J]. *Chinese Physics B*, 2020, 29(8): 088701.
- [54] CHOI J, GANI A W, BECHSTEIN D J B, et al. Portable, one-step, and rapid GMR biosensor

- platform with smartphone interface [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 85:1-7.
- [55] WU K, SU D Q, SAHA R, et al. Magnetic particle spectroscopy-based bioassays: Methods, applications, advances, and future opportunities [J]. *Journal of Physics D (Applied Physics)*, 2019, 52(17):173001.
- [56] UTKUR M, MUSLU Y, SARITAS E U. Relaxation-based viscosity mapping for magnetic particle imaging [J]. *Physics in Medicine & Biology*, 2017, 62(9):3422.
- [57] WU K, LIU J M, SAHA R, et al. Magnetic particle spectroscopy for detection of influenza A virus subtype H1N1 [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(12):13686-13697.
- [58] 赵兴一. 磁免疫测量机电系统研究与设计 [D]. 武汉:华中科技大学, 2019.
- [59] DASH A, BLASIAK B, TOMANEK B, et al. Validation of Inner, second, and outer sphere contributions to  $T_1$  and  $T_2$  relaxation in  $Gd^{3+}$ -based nanoparticles using  $Eu^{3+}$  lifetime decay as a probe [J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2018, 122(21):11557-11569.
- [60] LIONG M, HOANG A H, CHUNG J, et al. Magnetic barcode assay for genetic detection of pathogens [J]. *Nature Communications*, 2013, 4(1):1-9.
- [61] KUSUNOKI H, TANAKA T, KOHNO T, et al. NMR characterization of the interaction between Bcl-x<sub>L</sub> and the BH3-like motif of hepatitis B virus X protein [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 518(3):445-450.
- [62] DAPIAGGI F, PIERACCINI S, POTENZA D, et al. Computer aided design and NMR characterization of an oligopeptide targeting the Ebola virus VP24 protein [J]. *New Journal of Chemistry*, 2017, 41(11):4308-4315.
- [63] SAMIEI E, TABRIZIAN M, HOORFAR M. A review of digital microfluidics as portable platforms for lab-on a-chip applications [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(13):2376-2396.
- [64] 刘赵森, 杨洋, 杜宇, 等. 微流控液滴技术及其应用的研究进展 [J]. *分析化学*, 2017, 45(2):282-296.
- [65] 朱灿灿. 病原体核酸一体化并行检测微流控芯片研究 [D]. 合肥:中国科学技术大学, 2019.
- [66] SAYAD A A, IBRAHIM F, UDDIN S M, et al. A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2016, 227:600-609.
- [67] 王艺蓓. 基于微液滴的球刷-酶信号放大系统及其数字 ELISA 应用初探 [D]. 上海:上海交通大学, 2019.
- [68] BIAN M M, ZHANG Y, YUAN Y L. Research progress of electrochemical biosensing platform based on microfluidics [J]. *Journal of Analytical Science*, 2019, 35(5):657-664.
- [69] FARZBOD A, MOON H, et al. Integration of reconfigurable potentiometric electrochemical sensors into a digital microfluidic platform [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 106:37-42.
- [70] PETKOVIC K, METCALFE G, CHEN H, et al. Rapid detection of Hendra virus antibodies: An integrated device with nanoparticle assay and chaotic micromixing [J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(1):169-177.

## Research progress of methods for biomarker detection

WU Fenglong<sup>1</sup>, CUI Yanying<sup>2</sup>, ZHANG Zhifeng<sup>1</sup>, WANG Dandan<sup>2</sup>

1. College of Software Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Computer and Communication Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** The application research progress of biomarker detection methods based on genetic material (RNA and DNA), immunology (antigen/antibody) and combined with microchip technology was reviewed. It was pointed out that the detection method based on genetic material acted directly on the target substance, and had high accuracy and good sensitivity, but it had many detection steps and high requirements for the detection environment; The detection method based on immunology was simple to operate, had high portability, and could realize instant detection. However, the accuracy was slightly lower. It was suitable for rapid and large-scale virus screening; Combining with microchip technology made the detection method more diverse. It could realize the detection of target substances in a short time, and the accuracy and degree of automation have been improved. This method showed great development potential in virus screening and disease diagnosis. In the future, the detection technology of biomarkers could be further studied in terms of optimizing the catalyst of the reaction, increasing the degree of purification of nucleic acid extracts, improving the automation of detection equipment, building multiple detection systems, realizing the miniaturization of detection equipment and visualization of detection information, etc. to improve detection accuracy and equipment portability so as to realize the continuous development of this technology.

**Key words:** biomarker; detection method; genetic material; immunology; microchip technique

(责任编辑: 王晓波 王榕)