



Modern biomedical
testing technology

现代生物医学 检测技术

武会娟 伦永志 主编



北京科学技术出版社

现代生物医学检测技术

武会娟 伦永志 主编

 北京科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代生物医学检测技术/武会娟, 伦永志主编. —北京: 北京科学技术出版社, 2016. 12

ISBN 978 - 7 - 5304 - 8556 - 9

I. ①现… II. ①武… ②伦… III. ①生物工程 - 医学检验
IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 266933 号

现代生物医学检测技术

主 编: 武会娟 伦永志

责任编辑: 王 藏 李 鹏

责任校对: 贾 荣

责任印制: 吕 越

封面设计: 耕者设计工作室

出 版 人: 曾庆宇

出版发行: 北京科学技术出版社

社 址: 北京西直门南大街 16 号

邮政编码: 100035

电话传真: 0086 - 10 - 66135495 (总编室)

0086 - 10 - 66113227 (发行部) 0086 - 10 - 66161952 (发行部传真)

电子信箱: bjkj@bjkjpress.com

网 址: www.bkydw.cn

经 销: 新华书店

印 刷: 廊坊市海涛印刷有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

字 数: 288 千字

印 张: 16.25

版 次: 2016 年 12 月第 1 版

印 次: 2016 年 12 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5304 - 8556 - 9/R · 2200

定 价: 88.00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。
京科版图书, 印装差错, 负责退换。

编 委 会

主 编 武会娟 伦永志

编 委 (按姓氏笔画排序)

马 凯	北京市理化分析测试中心
王 琦	首都医科大学附属北京地坛医院
王昕源	南京医科大学基础医学院
田彦捷	北京市理化分析测试中心
伦永志	莆田学院药学与医学技术学院
刘 旭	北京市理化分析测试中心
安云鹤	北京市理化分析测试中心
李 达	中国医科大学附属盛京医院
李 越	首都医科大学附属北京地坛医院
李欣悦	荷兰乌得勒支大学兽医学院
李宝明	北京市理化分析测试中心
李俊博	北京市理化分析测试中心
迟 庆	大连大学医学院
张小莉	北京市理化分析测试中心
武会娟	北京市理化分析测试中心
姚晓坤	大连大学医学院
钱嘉林	北京市理化分析测试中心
程 湛	北京市理化分析测试中心
程小艳	北京市理化分析测试中心
管 笛	北京市理化分析测试中心
潘志鹏	大连大学医学院
魏 玲	北京市理化分析测试中心
秘 书 迟 庆	大连大学医学院
潘志鹏	大连大学医学院

前 言

生物医学检测技术是现代生命科学与医学发展的重要手段和实验工具。尤其近几年，随着分子生物学、基因组学、免疫学和代谢组学等检测技术的不断进步，涌现出一大批灵敏度高、特异性强、耗时短、成本低的先进技术，不但大大拓展和丰富了原有的生物医学检测技术，同时极大推动了生命科学和医学的长足发展。

与生物医学检测技术快速发展相悖的是，目前众多科研和医疗工作者或者由于科研手段和仪器设备的限制，或者由于忙于临床治疗和教学工作，不能及时关注新检测技术的发展和应用，极大制约了新技术的推广应用。

作为一所北京市属集科研、服务和公益于一身的公益型科研机构，北京市理化分析测试中心具备本书中涉及的所有检测技术和平台，为首都科技条件平台的研发试验服务基地，是北京市唯一一家基因测序与功能分析工程技术研究中心。本书基于我们长期对外研发服务所积累的经验，在6年培训工作中了解到的诸多学员对新检测技术的需求而编写，其中有些篇章已经作为实验讲义用于培训班教学。我们有责任和义务推动现代生物医学检测技术的普及和应用，不辜负合作对象和学员们对我们工作的认可和殷切希望。

本书对每个技术的论述不但涉及基本概念和原理，而且对技术本身的发展和更新做了简要介绍，最后对技术本身的应用和要点进行总结，力求使各位读者能够全面、完整地理解每个技术，真正做到不仅“知其然”而且“知其所以然”。

本书可供医药、卫生、生物等相关领域的科研、教学、技术人员和在读研究生使用。

本书各篇章内容均几易其稿，虽经再三斟酌与审校，但限于编者的学识水平，难免有疏漏和不足之处，在此敬请广大读者不吝指正。

编 者

2016. 10. 21

目 录

第一章 微滴式数字 PCR 技术	1
第一节 基本概念与原理	1
一、琼脂糖电泳 PCR	1
二、实时荧光定量 PCR	1
三、数字 PCR	2
第二节 发展历史与前景	3
第三节 应用举例与要点	4
一、突变位点检测	4
二、保守基因分析	5
三、基因表达及无标准品的核酸定量分析	6
四、与高通量测序技术的配套应用	8
五、微生物学研究	8
六、产前诊断	9
第二章 重组酶聚合酶扩增技术	11
第一节 基本概念与原理	11
一、RPA 的基本概念	11
二、RPA 技术扩增原理	11
三、RPA 引物设计及探针设计	13
四、RPA 技术的优点	13
第二节 发展历史与前景	14
第三节 应用举例与要点	18
一、RPA 技术快速检测沙眼衣原体	18
二、RPA 技术检测结核分枝杆菌	19
三、RPA 技术检测冠状病毒	19

第三章 基因芯片检测技术	20
第一节 基本概念与原理	21
一、基本概念	21
二、基因芯片的分类	21
三、基因芯片的原理及核心技术	23
第二节 发展历史与前景	31
一、基因芯片的发展历史	31
二、基因芯片的国内外研究现状	33
三、基因芯片的应用前景	35
第三节 应用举例与要点	36
一、基因差异表达分析和基因鉴定	37
二、疾病诊断	37
三、药物筛选	38
四、个体化用药	39
五、环境监测	39
六、法医鉴定	40
第四章 微流控芯片技术	41
第一节 基本概念与原理	41
一、微流控芯片的基本概念	41
二、微流控芯片的特点	42
三、微流控芯片的原理	42
四、微阵列芯片	43
五、微流控芯片的类型	43
六、微流控芯片的制作	44
七、微流控芯片的检测方法	53
八、微流控芯片的测试	56
第二节 发展历史与前景	58
一、微流控的发展历史	58
二、微流控芯片的展望	59
第三节 应用举例与要点	59
一、PCR-CE 微流控芯片技术	60
二、微流控芯片技术在 DNA 分析及测序中的应用	62
三、微流控芯片在基因诊断中的应用	64

第五章 转录组测序	70
第一节 基本概念与原理	70
一、RNA-seq 技术简介	70
二、RNA-seq 技术的分析方法	71
三、RNA-seq 技术的分析内容	72
第二节 发展历史与前景	75
一、传统测序技术	75
二、二代测序技术	76
三、第三代测序技术简介	78
第三节 应用举例与要点	81
第六章 Small RNA 测序	84
第一节 基本概念与原理	84
第二节 发展历史与前景	97
第三节 应用举例与要点	98
一、Small RNA 测序在发现生物标志物方面的应用	98
二、Small RNA 测序在靶基因功能研究方面的应用	100
三、Small RNA 测序在生命活动调节方面的应用	102
四、Small RNA 测序在生长发育和致病机制研究方面的应用	103
五、Small RNA 测序在药物开发方面的应用	105
六、Small RNA 测序在鉴定微生物病原体方面的应用	105
七、Small RNA 测序发现新的非编码小 RNA	106
八、Small RNA 测序的注意事项	106
第七章 甲基化测序	109
第一节 基本概念与原理	109
一、基本概念	109
二、第二代测序技术平台的原理	110
三、基于二代测序的 DNA 甲基化测序方法原理	113
第二节 发展历史与前景	116
一、二代测序技术的发展	116
二、甲基化测序技术发展	116
第三节 应用举例与要点	118

第八章 外显子组测序	122
第一节 基本概念与原理	122
一、外显子组测序	122
二、外显子组序列捕获	123
三、生物信息学分析	125
第二节 外显子测序的发展历史和前景	125
第三节 应用举例与要点	127
一、外显子组测序在孟德尔遗传病中的应用	127
二、外显子组测序在复杂疾病中的应用	127
第九章 宏基因组测序	129
第一节 基本概念与原理	130
一、扩增子测序	130
二、鸟枪法测序	139
第二节 发展历史与前景	145
第十章 染色质免疫共沉淀测序	148
第一节 基本概念与原理	148
一、ChIP-Seq 的概念	148
二、ChIP-Seq 的原理	149
三、ChIP-Seq 与 ChIP-Chip 技术的特点对比	151
四、ChIP-Seq 数据分析管道	152
五、ChIP-Seq 数据的初步处理及基本分析	152
六、ChIP-Seq 数据的后续分析	155
第二节 发展历史与前景	157
一、ChIP 技术	157
二、ChIP-Chip 技术	158
三、ChIP-Seq 技术	159
四、双末端标记测序系统 (PET) 技术的产生	160
第三节 应用举例与要点	162
一、转录因子结合位点的研究	162
二、组蛋白修饰的研究	164
三、核小体定位的研究	165
四、DNA 甲基化的研究	166

五、其他方面的研究	168
第十一章 超顺磁性免疫层析技术	169
第一节 基本概念与原理	169
一、概述	169
二、超顺磁性微球	170
三、超顺磁性的检测	173
四、免疫层析检测方式	174
五、检测结果的判定	175
第二节 发展历史与前景	175
第三节 应用举例与要点	176
一、检测病毒抗原	176
二、检测体内标记物	178
三、检测黄体生成素	179
第十二章 免疫生物传感器	180
第一节 基本概念与原理	180
一、传感器	180
二、生物传感器	181
三、免疫传感器	184
第二节 发展历史与前景	188
第三节 应用举例与要点	191
一、表面等离子体共振免疫传感器	191
二、压电晶体免疫传感器	193
三、电化学免疫传感器	195
第十三章 流式细胞术	198
第一节 基本概念与原理	198
一、流式细胞术的概念	198
二、流式细胞仪工作原理	198
第二节 发展历史与前景	207
一、发展历史	207
二、发展前景	209
第三节 应用举例与要点	212

一、血液学应用	212
二、免疫学应用	214
三、肿瘤学应用	216
四、微生物学应用	219
五、流式微球分析技术的应用	221
第十四章 激光共聚焦技术	222
第一节 基本概念和原理	222
一、基本概念	222
二、激光扫描共聚焦显微镜的原理和组成	222
三、激光扫描共聚焦显微镜的优势	223
第二节 发展历史和前景	225
一、发展历史	225
二、发展前景	225
第三节 应用举例与要点	227
一、图层处理功能	227
二、在细胞及分子生物学研究中的应用	228
三、在临床研究和诊断中的应用	233
第十五章 代谢组学技术概述	237
第一节 什么是代谢组学	238
第二节 系统生物学时代的代谢组学	238
第三节 代谢组学的研究方法	239
第四节 代谢组学的分析技术	240
第五节 代谢组学中的生物信息学	242
第六节 代谢组学的应用	242
一、疾病诊断	242
二、医疗应用	243
三、在药物毒理研究中的应用	243
四、在中医药研究中的应用	244
第七节 展望	244
参考文献	245

第一章 微滴式数字 PCR 技术

与传统 PCR 技术相比,“数字 PCR”(Digital PCR, dPCR) 技术具有极高的灵敏度、特异性和精确性,但截至目前,“数字 PCR”对广大科研工作者仍然是一种全新的检测方法。本章将从原理、发展及应用三个角度对“数字 PCR”进行描述。

第一节 基本概念与原理

多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction) 简称 PCR 技术,由美国科学家 Kary Mullis 于 1985 年发明。在 PCR 技术出现之前,人们为了从生物材料中获得某一特定的 DNA 序列或对其进行分析、鉴定,需要按照传统的方法进行大量烦琐、耗时的步骤才能完成,而 PCR 技术可在数小时内对目的基因进行百万倍级别的放大。PCR 技术已经成为生命科学研究领域中常规的实验方法之一。

PCR 技术就是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核苷酸存在的条件下依赖于 DNA 聚合酶的酶促合成反应,分为变性 (denaturation)、退火 (annealing) 和延伸 (extension) 三个步骤。

PCR 的发展经历了三个主要阶段。

一、琼脂糖电泳 PCR

琼脂糖电泳 PCR 是最传统的“第一代 PCR”,存在着操作烦琐、只适用于定性研究、交叉污染风险大等不足。

二、实时荧光定量 PCR

“第二代 PCR”是实时荧光定量 PCR (real time quantification PCR, qPCR),最早出现于 1992 年。通过实时收集 PCR 扩增过程中反应体系内

的荧光信号，再利用荧光信号 - Cq 值 - 靶基因的起始浓度的数学关系确定靶基因的拷贝数或表达水平，其中 Cq 值的获得是整个技术的核心。

但是，直到目前，过分依赖于 Cq 值仍然是 qPCR 最大的技术瓶颈，尤其是在低拷贝靶分子、细微模板浓度差异（如 3 个和 4 个拷贝）的情况下，获得的 Cq 值与真实值之间的偏差，以及不同批次、不同实验室在重复实验中的偏差，使得检测的灵敏度、精确度都受到了限制。

三、数字 PCR

数字 PCR 属于“第三代 PCR”，由美国约翰·霍普金斯大学 Ludwig 中心的 Bert Vogelstein 和 Ken Kinzler 于 1999 年最早提出。其核心设计目的就是为了突破 qPCR 在检测灵敏度、精确度方面的限制，本质上是把弱信号从噪声信号中展示出来（图 1-1）。

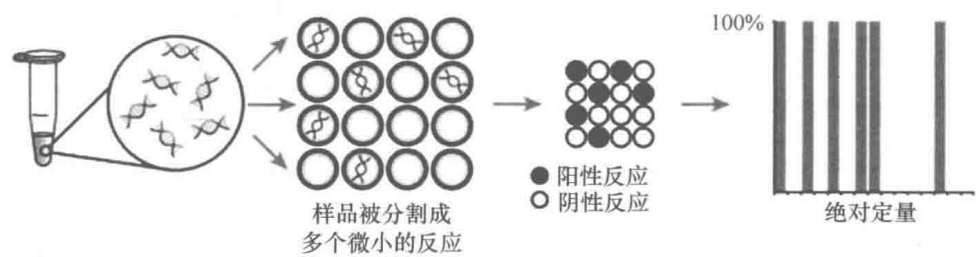


图 1-1 数字 PCR 原理模式简图

(图片来自 <http://www.thermofisher.com/cn/zh/home/life-science/pcr/digital-pcr.html>)

只要看过单一反应的 DNA 测序图的研究人员都会注意到，在绝大多数情况下，最终确认的显著信号峰下都存在表示其他碱基读取的小突起（突变信号），因为占比太低而通常被认为是“噪声信号”。但如果将这些分子稀释并将其分布于足够多的多重反应中，突变信号必然成为某一个反应的“显著信号”。这个多重分布方案的本质其实就是数字 PCR 采用的“逐个突破”策略。

原理方面，数字 PCR 就是将含有核酸分子的反应体系处理为成千上万个纳升级的微滴，使每个微滴或者不含待检靶分子，或者含有一个至数个待检靶分子。将每个微滴都作为一个独立的 PCR 反应器，经 PCR 扩增后采用微滴阅读仪对每个微滴进行逐个检测，并以终点信号的“有”或“无”（all-or-none end point）作为判断标准，有荧光信号的微滴判读为 1；没有荧光信号的微滴判读为 0。最后，根据泊松分布原理以及阳性微滴

的比例,再通过分析软件计算给出待检靶分子的浓度或拷贝数,获得最终结果。这里提到的泊松分布是一个较为复杂的统计学概念,用于描述单位时间(或空间)内随机事件发生的次数,这里不详细叙述其原理和推导公式,有兴趣的读者可以翻阅统计学和数学教材进一步学习。

数字 PCR 是一个全新的绝对定量方式,其结果的精确度、准确性和灵敏度不再依赖于 C_q 值,最终结果将直接给出靶序列的起始浓度,并能够将误差控制在 5% 以内,从而实现真正意义上的绝对定量。这一技术在核酸定量技术史上将具有革命性的积极意义。

第二节 发展历史与前景

与每一项技术革新类似,数字 PCR 也经历了不断发展的过程。

1999 年, Kinzler 和 Vogelstein 在一项检测和量化直肠癌患者粪便样品中的 K-RAS 突变的研究中首次完成了最为原始的“数字 PCR”设计。他们通过纯手工操作将基因组 DNA 稀释并等分至 384 孔微量滴定板的各个孔中,然后通过扩增包含所寻找的突变热点的基因区域,结果显示仅有超过 100 个孔具有基因组 DNA,其中有 4 个显示出突变。这一结果证实,他们设想的这种 PCR 在稀有突变检测方面具有强大优势,但是异常烦琐的操作不可能让它得到推广。此后,研究人员从操作简化及检测方面等多个方面进行了系统优化,其中关注的核心是“样品分散(divide)”环节,典型的模式主要包括以下三种。

(1) 磁珠模式:在尝试使用 96 孔板、384 孔板甚至 1536 孔板作为分散反应的载体后,2008 年, Kinzler 创立的 Inostics 公司推出了类似流式技术的磁珠乳液扩增方法, BEAMing dPCR (BEAMing - Beads, Emulsion, Amplification, Magnetics) 检测服务,该方法利用“珠子、乳化、扩增和磁力吸附”的原理,通过乳化 PCR 过程将模板、引物、PCR 试剂和磁珠的混合物分至小滴中进行 PCR 反应;反应完成后,扩增产物会通过生物素-亲和素铰链于磁珠上,乳化物被打散后珠子就能通过与检测寡核苷酸和流式细胞仪的杂交物所读取。遗憾的是,这些方法无论在分散程度和数据群体的体量上都无法达到更加精细的要求,时间和耗材成本严重限制了 dPCR 技术的发展。

(2) 微滴模式: 近年来, 随着纳米制造技术和微流体技术 (nanofabrication and microfluidics) 的发展, 特别是随着二代测序技术发展起来的“油包水 PCR”技术, 可以一次性生成数万乃至数百万个纳升甚至皮升级别的单个微滴, 使得数字 PCR 技术在瓶颈环节获得了突破性进展。Bio - Rad、RainDance 和 Life - technologies 是微滴模式的核心推动者, 在当前数字 PCR 设备市场份额中占有相当比例, 因此数字 PCR 通常被称为微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)。

最早出现的相对成熟的微滴式数字 PCR 平台是 QuantaLife 公司开发并推入市场的。2011 年, Bio - Rad 公司收购了 QuantaLife 公司后, 其微滴式数字 PCR 仪产品更名为 QX100, 继续在市场上销售。2013 年, QX100 型仪器升级为 QX200 型。

2012 年, RainDance 公司推出 Raindrop 型设备。Raindrop 整合了二代测序文库制备平台技术, 可以将每个标准反应体系分割成包含 100 万至 1000 万个皮升级别微滴的反应乳液, 从而获得超高的微滴数目。

(3) 芯片模式: 早在 1997 年, Kalinina O、Brown J 和 Silver J 便使用纳升级芯片进行单克隆模板 PCR 扩增。2013 年, Life - technologies 充分整合了微滴式数字 PCR 和芯片理念, 推出了 QuantStudio 3D 数字 PCR 系统。该系统可以使样本均匀分配至 20000 个完全单独隔离的反应孔中, 能够在尽可能简化操作步骤的同时有效防止交叉污染。此外, 芯片设计还避免了微滴式系统可能面临的管路堵塞问题。

第三节 应用举例与要点

微滴式数字 PCR 的诸多优点, 使得它在生物医学领域有着广泛应用。近年以它为核心技术平台的报道越来越多, 笔者在 Pubmed 数据库中以“Digital PCR”作为自由词检索后统计, 2013 年度以前发表的论著数目为 690 篇, 2013 年度为 154 篇, 2014 年度为 240 篇, 2015 年度为 304 篇, 不仅在数量上呈明显增长趋势, 其涉及学科领域越来越广, 高影响因子论著也越来越多。本章将对其中几个主要领域的应用情况进行介绍。

一、突变位点检测

从分子水平上看, 基因突变是指基因在结构上发生碱基对组成或排列

顺序的改变。随着个体化治疗理念的深入推进,对分子靶向药物及与其密切相关的基因突变检测的研究在肿瘤药物开发和临床治疗领域也越来越深入,其中,如何灵敏地检测到突变基因的存在以及如何确定包含了突变位点的癌细胞比例是技术研发层面关注的热点。

表皮生长因子受体(EGFR)突变在非小细胞肺癌(NSCLC)的发生发展机制中发挥着重要作用。既往大量研究证实,EGFR基因的突变会导致肺癌的发生,或使肺癌生长得更快。上皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(tyrosinekinas inhibitor, TKI),如吉非替尼(gefitinib, Iressa, 易瑞沙)、厄洛替尼(erlotinib, Tarceva)等,是EGFR靶向药物,它们的出现为EGFR基因突变的晚期非小细胞肺癌患者提供了比化疗更有效、耐受性更好的靶向药物治疗方案。遗憾的是,几乎所有接受治疗的患者均会产生针对这一类药物的耐药性,而EGFR的T790M突变被认为是耐药性产生的重要原因。Oxnard等对9名接受厄洛替尼一线治疗的非小细胞肺癌患者进行血浆游离肿瘤DNA(ctDNA)监测后发现,6名患者血浆中都能检测到T790M突变,随着治疗周期延长,其浓度会呈递增趋势,在时间上可以比影像学确认的肿瘤恶化提前16周。另一项研究表明,通过dPCR可以高效检出癌组织、复发肿瘤组织以及血清游离DNA中的T790M突变,结果证实,复发灶T790M突变阳性患者其原发灶突变频率远高于阴性患者。

在黑色素瘤方面,Reid等采用dPCR研究了恶性黑色素瘤患者循环肿瘤细胞中BRAF基因V600E和V600K突变,结果表明dPCR在灵敏度上高于qPCR 200倍,检测下限为0.0005%,展示了dPCR高灵敏度检测的强大优势。

伊马替尼(imatinib)是一种Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂,可以用于Bcr-Abl阳性慢性粒细胞白血病的分子靶向治疗。Moris等人研究发现,利用dPCR可以非常有效地预测伊马替尼治疗后复发概率。

二、保守基因分析

食品安全领域中,保守基因分析是一项核心的检测项目,如真假牛羊肉的检验、“地沟油”的鉴定分析等,都涉及以“物种保守序列定性和定量”为基础的分析工作。目前,国际通行鉴定标准大致都是以荧光定量PCR作为技术平台。

王珊等建立一种定量检测羊肉制品中羊源性和猪源性成分的微滴式数