

• 综 述 •

分子生物学技术在生物战病原微生物检测中的应用*

刘 玮¹综述,路 颖²,于庆潭^{1△} 审校

1. 海军青岛特勤疗养中心检验科,山东青岛 266071;2. 中国人民解放军海军第 971 医院检验科,山东青岛 266071

摘 要:随着未来战场上生物战暴发的可能性不断增大,结合现代分子生物学发展现状,以分子生物学最常用的核酸探针技术、聚合酶链反应、微流体技术、基因芯片技术及下一代测序技术作为研究对象,对未来生物战相关病原微生物的检测方法进行剖析,为我军对生物战相关病原微生物的检测检疫提供方法指导。

关键词:生物战; 病原微生物; 核酸探针技术; 聚合酶链反应; 基因芯片技术; 下一代测序技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.23.023

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)23-2927-04

文献标志码:A

Application of molecular biology technology in the detection of pathogenic microorganisms in biological warfare*

LIU Wei¹, LU Ying², YU Qingtan^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Naval Special Forces Recuperation Center of Qingdao, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Department of Clinical Laboratory, 971 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Qingdao, Shandong 266071, China

Abstract: With the increasing possibility of future biological warfare broke out on the battlefield, combining with the current situation of the development of modern molecular biology, take the most commonly used nucleic acid probe technology, polymerase chain reaction, microfluidic technology, gene chip and next-generation sequencing technology in molecular biology as the research objects, analyze the detection methods of future biological warfare related pathogenic microorganisms, and provide guidance for the detection and quarantine of pathogenic microorganisms related to biological warfare.

Key words: biological warfare; pathogenic microorganisms; nucleic acid probe technology; polymerase chain reaction; gene chip technology; next-generation sequencing technology

生物战是指在战争场景中故意使用生物制剂(如细菌、病毒、立克次体、衣原体、真菌和毒素)作为武器,生物战病原微生物可能比其他常规武器系统更致命,很小的数量也可能造成大规模伤亡^[1]。生物武器是指装有生物战病原微生物及传播媒介的各种施放装置的总称,最初的生物战病原微生物多为细菌,随着科技的进步,生物战病原微生物发展为多种病原微生物及毒素。生物战以其较低的经济成本、大规模的效应面积、难以预估的心理负面效应,很有可能成为未来战争的主要方式。从 2003 年严重急性呼吸综合征冠状病毒及 2012 年中东呼吸综合征冠状病毒的暴发可以明显看出,传染病病原体的敏感、特异和快速诊断对于确定阳性病例、追踪其接触者、发现病毒来源及最终使控制感染的措施合理化至关重要^[2]。回顾我国抗击新型冠状病毒肺炎(COVID-19)阻击战的经验教训,及早确诊和隔离是制胜的关键,更是充分说明了病原微生物的早期检测和鉴定对于打赢生物

战的重要性。2020 年新型冠状病毒的全基因组测序使科学家们在短期内就设计出了检测方案来检测受感染人群中的病原体,并且为病毒的系统发育研究提供了参考,使研究者对病毒的传播途径有了快速、准确的判断^[3-4]。随着全球生物安全态势的不断变化,如果未来生物战中使用类似病原微生物来作为武器将造成非常严重的后果。

1 分子生物学技术在生物战病原微生物检测中的技术优势

传统微生物检测方法费时、费力,无法满足快速检测的需求,随着以基因诊断为基础的各种分子生物学技术的发展,现代分子生物学对微生物的认识,从对微生物外部结构、生物特性的研究和分析继而转向对微生物内部基因的探究。现代分子生物学通过利用核酸探针技术、聚合酶链反应(PCR)、基因芯片技术、下一代测序技术等遗传物质 DNA 和 RNA 分子水平对微生物进行检测,已经成为一种重要的微生

* 基金项目:中国人民解放军海军青岛特勤疗养中心立项课题(TLKY10)。

△ 通信作者, E-mail: QingtanYu2021 @163.com。

本文引用格式:刘玮,路颖,于庆潭. 分子生物学技术在生物战病原微生物检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(23): 2927-2930.

物检测方法^[5]。如果在未来的生物战过程中应用现代分子生物学技术进行检验检疫,将极大地缩短检验时间,并能明显提高检验精度。

2 分子生物学技术在生物战病原微生物检测中的应用

2.1 核酸探针技术 随着分子生物学和基因工程技术的不断进步,发展出了灵敏度高、特异性好、方便快捷的核酸探针技术。核酸探针技术也称为基因诊断技术,该技术是利用微生物基因中 DNA 或 RNA 的碱基互补原理,利用生物标记的特异核苷酸序列的单链 DNA 或 RNA 片段作为探针,通过核酸杂交技术对病原微生物核酸、蛋白质分子进行快速检测,从而达到快速鉴定相关病原微生物的目的^[6]。目前常用的探针杂交方法主要有:DNA 印迹杂交、RNA 印迹杂交和蛋白质印迹杂交,用于检测标本中的 DNA、RNA 或相关蛋白质分子的基因,从而对感染性病原体进行检测^[7]。核酸杂交技术可一次性对多种基因的多个位点进行快速基因型鉴定,具有检测信息量大的特点,在未来生物战病原微生物检测中应用前景极大。

2.2 PCR PCR 是在聚合酶的催化下由特定引物(寡核苷酸)介导的特异性基因片段体外酶促的扩增技术。在过去一个世纪里,很少有发明能与 PCR 的重要性相提并论,因为它彻底改变了生物和遗传研究。PCR 作为传染病诊断工具的有用性在 1987 年的检测中得到证明,并在后来临床上被广泛应用于检测病毒和细菌感染的微生物学领域^[8]。

反转录-PCR(RT-PCR)是一种高度特异和敏感的传染病检测诊断方法,由于这种方法是基于核酸的检测,在抗击 COVID-19 阻击战中发挥了重要作用,它能够通过检测患者标本中的新型冠状病毒核糖核酸来早期诊断 COVID-19^[9]。目前,COVID-19 的确诊主要依靠新型冠状病毒核酸检测试剂盒荧光定量 PCR,该试剂盒采用多重 PCR 与 RT-PCR 相结合的方法,对新型冠状病毒感染疑似病例的鼻咽拭子、口咽拭子及痰液标本中新型冠状病毒的相关基因进行检测^[10]。随着疫情的发展,发现一种简单方便的收集患者标本的方法取代痛苦的鼻咽拭子收集过程,降低卫生从业人员在标本收集过程中感染的风险,是临床一线医务人员的迫切需要。在这种情况下,罗格斯临床基因组实验室提出了开发一个基于 RT-PCR 的想法,他们开发了一种检测试剂盒,该试剂盒可以检测唾液中新型冠状病毒的核糖核酸^[11]。

针对生物战中多样化的生物战病原微生物,现代分子生物学 PCR 能够满足各种病原微生物的快速检测需求。

2.3 基因芯片技术 基因芯片技术又称为 DNA 微阵列或 DNA 芯片,它是在基因探针的基础上研制出来的,根据碱基互补的原理,利用基因探针到基因混合物中识别特定基因。利用显微点样或原位合成技术,将大量 DNA 探针按照指定顺序和密度固定在载体(如硝酸纤维素膜、尼龙膜、塑料片等)的表面,然后

与荧光染料或生物素标记的核酸分子进行杂交,并分析获取标记物的荧光或生物信号,从而获得待测样品中相关基因的表达信息^[12]。

目前,基因芯片技术分为传统芯片和可视化芯片两大类。传统基因芯片具有高通量、同步检测大量样品,核素、荧光或生物素标记的放大效应及减少外界因素干扰等优点;可视化基因芯片灵敏度高、操作简单,能够更明显地提高病原微生物的检测速度和效率^[13]。基因芯片技术在生物战病原微生物检测中能快速高通量检测病原微生物的核酸,在病原微生物基因诊断研究中意义重大。

2.4 微流体技术 以 RNA 为遗传核心物质的病毒可导致埃博拉、丙型肝炎、流行性感、严重急性呼吸综合征和脊髓灰质炎等疾病。冠状病毒是包膜的单链 RNA 病毒,可导致人类和动物疾病,曾导致了 3 次流行病大暴发:2002—2003 年的严重急性呼吸综合征冠状病毒,2012 年的中东呼吸综合征冠状病毒,以及 2019 年的新型冠状病毒^[14]。由于 RNA 病毒的高效传染性,未来不排除以 RNA 病毒作为生物战病原微生物进行大规模生物战的可能。

采用快速定量 PCR 检测 RNA 病毒是常规做法,RT-PCR 由于其具备灵敏度高、特异性好和通量高的特点,现已成为大流行暴发时主要的病毒检测技术,但其需要配套的生物安全实验室作为技术平台,无法实现便携、可移动及现场快速检测的要求^[15]。一种更快速、易于使用和廉价的诊断方法——微流体技术,能够在 30 min 内完成检测,有望成为未来 RNA 病毒类病原体检测的新方法。

微流体技术以前曾用于检测甲型流感病毒 H1N1、寨卡病毒、甲型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒和诺如病毒等核糖核酸病毒,结果令人满意。据报道,在集成有可控微磁场的微流控芯片上进行核酸杂交是一种同时检测和分型多种流感病毒的快速方法,甲型流感病毒 H1N1、H3N2 和 H9N2 亚型可在 80 min 内同时检测,检测限分别约为 0.21、0.16 和 0.12 nm^[16]。因此,微流体技术可以成为一个可靠的技术平台,具有快速诊断和分型病毒的能力。病毒抗体检测常用的酶联免疫吸附试验(ELISA)通常需要几个小时才能完成,但将这种方法与微流体系统相结合,可以实现高效快速的诊断。有研究使用 ELISA 微流控系统在 60 min 内完成亨德拉病毒 IgG 抗体检测;在另一项研究中,在基于 ELISA 的微流控平台的帮助下,检测禽流感病毒仅需 1.5 h;基于夹心免疫测定的微流体装置也被应用于流行性感冒的快速检测^[17-19]。目前,主要应用的有基于纸张和基于通道的两种不同的微流体装置:纸张工具由一系列亲水性纤维素或硝化纤维制成,通过吸收引导纸张中的液体;基于通道的微流体装置可以使用 4 种主要方法来制造,包括层压、模制、3D 打印和纳米制造^[20]。

微流体系统为许多诊断测试提供了一个平台,包括 RT-PCR、巢式 PCR、核酸杂交、ELISA 等,有望成

为更快、更便宜、更易于使用、灵敏度更高的检测方法。因此,微流体设备很有可能成为传统检测病毒 RNA 的替代方法,在未来生物战 RNA 类病毒病原体检测中,微流体系统将发挥巨大作用。

2.5 下一代测序技术 过去 20 年高通量 DNA 测序方法发展迅速,新方法不断商业化,以较低成本对大基因组进行高通量测序的需求引发了下一代测序技术,下一代测序技术是一种允许数百万个 DNA 或 RNA 序列同时测序的技术^[21]。与传统测序法比较,下一代测序技术的优势包括样品复用的更高吞吐量、检测低频变异的更高灵敏度、高样品量的更快周转时间和更低的成本。

下一代测序技术也称为大规模并行测序或高通量测序,“下一代”一词意味着 DNA 测序技术的下一步发展,主要包括第 2 代和第 3 代测序方法^[22]。第 2 代测序方法可分为两大类,即杂交测序法和合成测序法,第 2 代测序反应通常在小室中的纳米体、微粒体上并行运行,因此,每对基因测序的成本比较低廉,同时技术的不断改进和检测仪器的小型化正在进一步降低其成本。第 3 代测序以单分子测序和纳米孔测序为主,不需要进行核酸扩增,读长明显优于第 2 代测序,与第 2 代测序方法相比,第 3 代测序方法旨在对长 DNA 和 RNA 分子进行测序^[23]。

下一代测序技术相对于经典 Sanger 测序的主要优势是:(1)高通量能力,可以并行完成数亿个测序反应,使整个细菌基因组的完全测序只需一两次仪器运行;(2)单一方案可适合于所有微生物的鉴定和基因分型;(3)在无细胞系统中,完全依赖于文库的制备,消除了 DNA 克隆;(4)不需要关于特定基因/基因组序列的先验知识,因为高温超导可以读取随机分布在基因组中的 DNA 模板,然后可以应用从头基因组组装;(5)不需要分离和培养感兴趣的微生物,这是一个特别关键的方面,因为许多菌株不能在培养基中生长,这使能够鉴定以微量存在的微生物及那些以前用常规方法未检测到的微生物;(6)成本和周转时间减少。下一代测序技术的主要缺点与数据存储需要内存空间大、生物信息学分析技术复杂、需要专门学校或由专业人士进行有关^[24]。

生物战病原微生物可以包括许多常见和不常见的病原体,从病毒到细菌、真菌和寄生虫,假设使用常规的分子检测,如 PCR 可以针对许多特定目标生物体的单独检测,但可能遗漏罕见的病原体或使用与所涉及的病原体不匹配的引物,因而降低了检测的灵敏度和检出效率^[25]。而下一代测序技术不仅可以高通量对多种可能的病原微生物进行检测,同时还可以通过测序读数的计数提供关于样品中生物体水平的定量或半定量数据,这对于生物战病原微生物种类的确非常有帮助。同时,随着 DNA 测序技术的进步,未来将更快、更准确地进行测序,测序平台较小、需要较少的动力、较少的试剂和维护,有利于将测序技术应用于未知生物体的检测和生物战病原微生物的研究工

作中。

3 各种分子生物学技术对比分析

生物战病原微生物普遍具有高传染性,能形成突发大规模疫情,对比 2020 年 10 月 17 日通过、自 2021 年 4 月 15 日起施行的《中华人民共和国生物安全法》,生物安全已经不仅仅局限于生物战等特殊战场,更是上升到了国家安全的层面。因此,对于未来可能出现的威胁国家安全和战场胜利的生物战病原微生物早期、快速、准确的检测显得尤为重要。下面将对上述分子诊断技术——核酸探针技术、PCR、微流体技术、基因芯片技术及下一代测序技术在生物战病原微生物检测中应用的优缺点进行总结和比较:核酸探针技术具有可一次性对多种基因的多个位点进行快速基因型鉴定,具有特异性强、检测速度快、检测信息量大的特点;核酸探针技术检测时存在耗时长、成本高、操作烦琐、工作量大等缺点,限制了其在生物战病原微生物检测中的应用,目前核酸探针技术主要被广泛应用于产前诊断过程中。

PCR 不仅具有较高的灵敏度和特异度,还能区分病原微生物的类型和亚型,适合于多种类型的病原微生物;其缺点在于仅适合于已知的病原微生物,对于新发和未知的病原微生物没有办法设计相应的引物,一般在基因测序技术明确了生物战病原微生物的种类和基因序列之后,可以作为大规模筛查的工具。

基因芯片技术在生物战病原微生物检测中的应用优势在于能够快速高通量检测病原微生物的核酸,并且操作简单、自动化程度高;其缺点在于目前制作基因芯片成本高、价格昂贵、对操作人员的技术要求较高,并且具有重复性差的缺点,使其应用范围受到很大的限制。由于基因芯片技术的上述优点和缺点,在未来生物战病原微生物检测中,基因芯片不能作为常规检测方法,但是可作为科研的研究手段对生物战病原微生物的生物性状、基因特点进行深入分析。

微流体技术以其小型化、便携式装置非常适合在生物战病原微生物检测中发挥作用,因为这些自动化的、精确的和成本有效的微流体技术诊断设备不需要受过专业训练的医疗专家,并且可以由一般军队医疗人员在现场使用;但微流体技术目前主要应用于病毒的检测方面,应用范围比较窄,并且其对专业技术的要求比较高,需要医务人员和工程师的全力配合。因此,微流体技术以其快速、简便、高效的检测能力,在未来生物战病原微生物的检测过程中可以选择性应用于病毒检测方面。

下一代测序技术在新发病原体检测方面的优势是可以快速、经济、精确、高通量对多种可能的病原微生物进行检测,并对新发的病原微生物进行鉴定,为临床筛查、诊治赢得了宝贵时间;下一代测序技术的缺点是检测样品中存在的微生物污染物、用于处理的试剂残留或实验室环境的影响,这可能使结果的分析 and 解释变得复杂。在临床标本的常规采集过程中,即使对身体中可能无菌的部位进行活组织检查也会被

无意污染,包括采样过程中皮肤菌群的污染或口腔菌群的污染^[26]。因此,需要严格遵守试剂和工作流程的质量控制程序,以保持尽可能无菌和无核酸的测试环境,使用阴性质控品、试剂评估和定期刷检来确保实验室和样品交叉污染不会产生假阳性结果。

目前,国内外均在积极研制简便、实用、可携带的便携式生物战病原微生物检测箱,主要集中在实用新型发明专利中,但其核心还是检测技术的更新,如何将更快、更便捷、更准确、更经济的检测技术应用于生物战病原微生物的检测是未来的研究方向。随着现代分子生物学诊断技术的发展,技术不断成熟,核酸探针技术、PCR、微流体技术、基因芯片技术及下一代测序技术等分子生物学技术已经在临床诊治中得到广泛应用,如果能够正确将各种不同的分子生物学技术加以合理应用,分子生物学技术将在未来生物战病原微生物的检测检疫中发挥十分重要的作用。

参考文献

- [1] 张瑞萍. 防御生物、化学和放射性武器恐怖袭击的能力亟待加强[J]. 北京人民警察学院学报, 2004, 17(1): 20-22.
- [2] LOTFI M, HAMBLIN M R, REZAEI N. COVID-19: transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities[J]. Clin Chim Acta, 2020, 508: 254-266.
- [3] HANAEI S, REZAEI N. COVID-19: Developing from an Outbreak to A Pandemic[J]. Arch Med Res, 2020, 51(6): 582-584.
- [4] JABBARI P, JABBARI F, EBRAHIMI S, et al. COVID-19: a chimera of two pandemics[J]. Disaster Med Public Health Prep, 2020, 14(3): e38-e39.
- [5] 张俊岭. 分子生物学技术在病原微生物检验中的应用[J]. 临床医药文献杂志, 2018, 5(3): 182.
- [6] NAKAGAWA K, YAMAMOTO T, YASUDA A. Detection of the CLOCK/BMAL1 heterodimer using a nucleic acid probe with cycling probe technology[J]. Anal Biochem, 2010, 404(2): 165-170.
- [7] LI D, ZHANG J, LI J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging coronavirus SARS-CoV-2[J]. Theranostics, 2020, 10(16): 7150-7162.
- [8] KWOK S, MACK D H, MULLIS K B, et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection[J]. J Virol, 1987, 61(5): 1690-1694.
- [9] AFZAL A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges[J]. J Adv Res, 2020, 26: 149-159.
- [10] 李宝林, 吴刚, 曾章锐, 等. 15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本新型冠状病毒核酸检测结果比较[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(3): 239-244.
- [11] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. Euro Surveill, 2020, 25(3): 2000045.
- [12] 孙继勇, 鲁晓杰. 基因芯片核心技术及其最新进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 467-468.
- [13] 有小娟, 鲁珍. 基因芯片技术及其在微生物检测中的应用[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2017, 20(2): 94-96.
- [14] CORMAN V M, MUTH D, NIEMEYER D, et al. Hosts and sources of endemic human coronaviruses[J]. Adv Virus Res, 2018, 100: 163-188.
- [15] MOHAMED K, RODRIGUEZ-ROMAN E, RAHMANI F, et al. Borderless collaboration is needed for COVID-19-A disease that knows no borders[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2020, 41(10): 1245-1246.
- [16] ZHANG R Q, HONG S L, WEN C Y, et al. Rapid detection and subtyping of multiple influenza viruses on a microfluidic chip integrated with controllable micro-magnetic field[J]. Biosens Bioelectron, 2018, 100: 348-354.
- [17] GAO Y, PALLISTER J, LAPIERRE F, et al. A rapid assay for Hendra virus IgG antibody detection and its titre estimation using magnetic nanoparticles and phycoerythrin[J]. J Virol Methods, 2015, 222: 170-177.
- [18] WANG Y, RUAN Q, LEI Z C, et al. Highly sensitive and automated surface enhanced raman scattering-based immunoassay for H5N1 detection with digital microfluidics[J]. Anal Chem, 2018, 90(8): 5224-5231.
- [19] KIM Y, ABAFOGI A T, TRAN B M, et al. Integrated microfluidic preconcentration and nucleic amplification system for detection of influenza a virus H1N1 in saliva[J]. Micromachines (Basel), 2020, 11(2): 203-206.
- [20] MAHMUD M A, BLONDEEL E J M, KADDOURA M, et al. Features in microfluidic paper-based devices made by laser cutting: how small can they be? [J]. Micromachines (Basel), 2018, 9(5): 220-223.
- [21] BEHJATI S, TARPEY P S. What is next generation sequencing? [J]. Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2013, 98(6): 236-238.
- [22] 李琳, 钱四化, 吕天琦, 等. 新一代测序技术的文库制备方法研究进展[J]. 应用化学, 2021, 38(1): 11-23.
- [23] 刘婉彤, 童梅, 林福玉, 等. 分子诊断技术的临床应用进展[J]. 生物技术通讯, 2020, 31(2): 240-250.
- [24] OLIVEIRA M, MASON-BUCK G, BALLARD D, et al. Biowarfare, bioterrorism and biocrime: a historical overview on microbial harmful applications[J]. Forensic Sci Int, 2020, 314: 110366.
- [25] WILSON M R, NACCACHE S N, SAMAYOA E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing[J]. N Engl J Med, 2014, 370(25): 2408-2417.
- [26] SCHLABERG R, CHIU C Y, MILLER S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(6): 776-786.

(收稿日期: 2021-04-22 修回日期: 2021-08-26)