

流式荧光技术又称液态芯片技术(Luminex xMAP 技术),其整合了荧光编码微球、激光分析、应用流体学及高速数字信号处理等多项最新科技,是美国 Luminex 公司于上世纪末开发出的新一代高通量发光检测技术。目前该技术已被广泛应用于免疫分析、核酸研究、酶学分析、受体和配体识别等领域,并得到各权威机构和医学界的高度认可。2005 年,该技术荣获 Frost&Sullivan 颁发的“年度国际临床诊断技术革新大奖”。目前,由 Luminex 技术平台获得实验数据发表的科研文献已超过 12000 篇。每年有数千篇引用流式荧光技术的文献,其中数百篇为 Pubmed 收录的高质量研究文献。

我国也已有不少厂家将先进的流式荧光技术平台用于临床检验领域高端的体外诊断试剂开发和生产,如国内的透景生命(股票代码:300642)、益善生物及协和洛克等。其中,透景生命是国内最早引入流式荧光技术的体外诊断试剂公司,也是 Luminex 公司在国内最大的开发型合作伙伴,在国内最早获得 CFDA 批准将流式荧光技术用于临床检验试剂的生产。

流式荧光技术特点及原理

流式荧光平台的突出特点在于其可进行高速高效的多指标联检、既可对蛋白也可对核酸进行分析、既适用于临床检验也适用于科研、高灵敏度荧光发光可进行定性或定量分析,而且检测时对样本需求量极少,特别适合一些珍贵样本的多指标分析。此外,平台具有极佳的开放性和拓展性,用户可根据自己的需求来设计和实现针对不同目标分子的联合检测。

该技术是以直径 5.6 μm (约为头发丝直径的十五分之一)、大小均一的荧光微球作为免疫或核酸杂交反应的载体,微球表面包被有特异性抗体或核酸探针,可与样本中待检分子特异性结合。微球经两种荧光染料染色编码,可获得 100 种不同特征荧光光谱的微球,不同荧光编码微球连接不同抗体或核酸探针并可在同一反应体系内进行反应。当微球逐颗经过仪器检测时,检测仪发射红色激光识别微球的荧光编码以确定检测项目类型,发射绿色激光读取待检物荧光信号强度进行定性或定量分析。直径 5.6 μm 的微球具有极大的比表面积,可长时间悬浮于液体中进行高效均匀的拟液相动力学反应。同一反应体系内不同编码微球各自反应、互不干扰,从而实现一次检测获得 100 种检测结果,实现多指标的高通量联合检测。由于微球的羧基化表面可与任意蛋白或核酸探针的氨基发生共价交联,因此可根据实验需要对各种不同蛋白及核酸等目的分子进行检测,或进行新项目的开发及个体化检测试剂的定制。

流式荧光技术的广泛应用

流式荧光技术作为开放型的多功能检测技术平台,在临床诊断检测、新药的高通量筛选以及生命科学基础研究领域均有重要而广泛的应用:

流式荧光——临床应用多面手

流式荧光技术具有成熟的临床应用,是同时兼顾免疫和核酸检测的双栖检验平台。由于其高通量的联合检测优势,尤其适合于诸如肿瘤标志物及 HPV 基因分型等临床多指标项目的检测。

肿瘤标志物(TM)是肿瘤辅助诊断、预后判断、疗效观察和复发检测的重要指标。单个的 TM 指标灵敏度和特异性较差,目前临床推荐使用几项合适的 TM 组合进行联合检测,从而提高指标的应用价值,如 EGTM 推荐的肺癌检测黄金组合 3 项——CYFRA21-1, NSE, CEA。流式荧光平台尤其适合于肿瘤标志物的多项联合检测。一方面,流式荧光法免疫检测具有与化学发光法媲美的检测性能:董振南等[1]在对平台上多肿瘤标志物的检测方法学评价中,显示

与化学发光法相关性良好,对AFP、CYFRA211、CEA及NSE的检测相关系数分别为0.9760、0.9268、0.9727及0.8990。徐京昕等[2]及张玥等[3]同样进行了TM检测性能验证,流式荧光平台适合于临床检测推广。北京市体检中心[4]使用流式荧光平台,对当地23 566名健康人群血清AFP、CEA进行研究分析,显示出在不同年龄层和性别间的显著差异性,与在化学发光平台上的检测结果一致。另一方面,流式荧光平台由于其联检优势,检测效率可达化学发光法的数倍,如涵盖中国85%以上高发恶性肿瘤的精选7项组合检测速度达840T/h,而化学发光法为200T/h。此外,平台上的所涵盖的18项TM指标,还可根据用户需要,灵活组合后进行联合检测。

HPV 是一种常见的嗜上皮性病毒,其型别众多,依据致病能力的不同,分高危型和低危型。高危型 HPV 的持续感染是导致宫颈癌发生的明确诱因,低危型 HPV 感染与生殖器疣密切相关。目前明确的 HPV 高危型有十四种型别之多,且不同型别的致癌性也有不同,检测中进行具体分型可明确感染型别,判断致病风险,同时也是流行病学调查及指导疫苗的研发的重要依据。基于流式荧光平台的一次检测可同时对 27 种 HPV 亚型进行具体分型。Lu 等[5]和 You 等[6]均使用该平台,完成对江苏和山东地区的流行病学调查,Li 等[7,8]同样基于流式荧光技术,对我国西部地区 5702 例宫颈癌及癌前病变患者的 27 型 HPV 感染进行具体分型。Li 等[9]在流式荧光平台上,揭示了云南地区 10 个不同地区,13 个临床中心的 HPV 感染率和型别分布,样本量达 28457。此外,Wang 等[10]在对我国 37 个省份 12 万宫颈癌筛查女性的 HPV 感染调查研究也是使用的该技术平台。

此外,流式荧光技术在 ToRCH 检测、HLA 分型、自身免疫抗核抗体、胃肠道病原体、呼吸道病毒及心脏标志物等诸多项目领域均有重要的临床应用。

流式荧光高通量筛选加速新药研发

Li 等人[11]利用 Luminex 平台高通量筛选治疗激素抵抗性前列腺癌的药物,建立了一套基于基因组的表型筛选方法,发现一种强心苷——黄夹次苷可有效抑制癌细胞对雄性激素的敏感性和抗性,且不会引发严重的细胞毒性,研究成果发表在 PNAS 上。

Feng 等[12]人同样使用 Luminex 平台进行抗多骨髓瘤药物的高通量筛选。他们分析了 1120 种化合物,对这些药物抑制多骨髓瘤相关细胞因子和生长因子的能力进行评估,发现四环素衍生物可有效抑制骨髓瘤细胞生长和破骨细胞分化因子的活性而不损伤细胞活力。

流式荧光助推生命科学基础研究

流式荧光平台的应用还可延伸到基因表达分析、基因分型、蛋白表达分析、动物模型血清轮廓分析、蛋白互作分析等诸多生命科学基础研究领域。Dacic 等[13]基于流式荧光平台,对不同突变类型(EGFR 阳性、KRAS 阳性及 EGFR/KRAS 阴性)肺癌中的 miRNA 表达情况进行研究,发现某些 miRNA 的表达在不同突变型中差异很大。同样,Lu 等[14]基于该平台,对几十种人类癌症样本的 217 种 miRNA 的表达进行研究,获得了不同谱系、不同分化状态下 miRNA 表达的丰富信息,有望后续用于不同肿瘤亚型的鉴别和预后评估中。Mayer 等[15]在巴贝西虫病犬模型中,利用流式荧光平台对不同患病状态下的趋化因子和细胞因子进行检测,认为 KC 和 IL-8 是重要的病理因素。

总结与展望

流式荧光技术是继生物芯片技术、化学发光技术之后开发出的新一代高通量分子诊断技术

平台。该技术不仅是后基因时代科学研究的强大技术支持，更在临床诊断和新药的开发研究等领域大放异彩。流式荧光技术多重联检的技术特色，为医疗改革“降本增效”大背景下降低试剂及耗材成本，推进医疗资源结构优化提供了一大有效途径。目前平台总装机数超过了13782台，年装机量更是逐年上升，流式荧光技术必将迎来愈加广阔的发展前景。

参考文献

- [1] 董振南, 贾兴旺, 田亚平. 流式荧光法检测多肿瘤标志物的方法学评价[J]. 分析仪器, 2008(1):22-25.
- [2] 徐京昕, 鲁劲松, 张宏印. 流式荧光免疫法检测多肿瘤标志物的方法学评价[J]. 检验医学, 2010, 25(3):167-170.
- [3] 张玥, 董振芳, 鞠琪,等. 流式荧光发光分析仪开放式系统检测肿瘤标志物的性能验证[J]. 中国医药, 2017, 12(3):452-456.
- [4] 刘宏涛, 柴秀华, 孙琰. 流式荧光发光法检测北京市23566名健康人群血清AFP、CEA结果分析[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(5):400-400.
- [5] Lu J F, Shen G R, Li Q, et al. Genotype distribution characteristics of multiple human papillomavirus in women from the Taihu River Basin, on the coast of eastern China[J]. BMC Infectious Diseases, 2017, 17(1):226.
- [6] You W, Li S, Du R, et al. Epidemiological study of high-risk human papillomavirus infection in subjects with abnormal cytological findings in cervical cancer screening[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2018.
- [7] Li K, Yin R, Wang D, et al. Human papillomavirus subtypes distribution among 2309 cervical cancer patients in West China[J]. Oncotarget, 2017, 8(17):28502-28509.
- [8] Li K, Yin R, Li Q, et al. Analysis of HPV distribution in patients with cervical precancerous lesions in Western China[J]. Medicine, 2017, 96(29):e7304.
- [9] Li Z, Liu F, Cheng S, et al. Prevalence of HPV infection among 28,457 Chinese women in Yunnan Province, southwest China.[J]. Scientific Reports, 2016, 6:21039.
- [10] Wang R, Guo X, Wisman G B A, et al. Nationwide prevalence of human papillomavirus infection and viral genotype distribution in 37 cities in China[J]. BMC Infectious Diseases, 2015, 15(1):257.
- [11] Li H, Fu X D. Versatile pathway-centric approach based on high-throughput sequencing to anticancer drug discovery[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(12):4609-4614.
- [12] Feng R, Rios J A, Onishi T, et al. Cell-based and cytokine-directed chemical screen to identify potential anti-multiple myeloma agents[J]. Leukemia Research, 2010, 34(7):917-924.
- [13] Dacic S, Kelly L, Shuai Y, et al. miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status[J]. Modern Pathology An Official Journal of the United States & Canadian Academy of Pathology Inc, 2010, 23(12):1577.
- [14] Lu J, Getz G, Miska E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043):834-8.
- [15] Mayer I, Bendelja K, Brkljačić M, et al. Serum levels of the chemokines keratinocyte chemoattractant and interleukin-8 in dogs naturally infected with Babesia canis canis.[J]. Veterinarski Arhiv, 2015, 85(4):369-383.