

纸基微流体技术在即时检测中的应用

徐佳素, 张雅, 苏晓崧, 张师音, 葛胜祥

厦门大学 公共卫生学院, 福建 厦门 361102

徐佳素, 张雅, 苏晓崧, 等. 纸基微流体技术在即时检测中的应用. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1283–1292.

Xu JS, Zhang Y, Su XS, et al. Application of paper-based microfluidics in point-of-care testing. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1283–1292.

摘要: 即时检测 (Point-of-care testing, POCT) 是在采样现场或病人旁边进行的一种检测方式, 它利用便携式分析仪器及配套试剂进行检测, 能快速得到结果, 被广泛应用于体外诊断行业。其中纸基微流体检测技术以其成本低廉、操作简单、检测快速、设备便携、应用不受场所限制等优点在发展现场 POCT 技术中具有非常大的潜力。近年来, 纸基微流体技术的发展及其与各种新技术、新方法的融合推动了 POCT 技术和方法的实质性发展。文中简要概括了纸的分类与特性, 介绍了基于纸基微流体技术发展而来的样本前处理方法、反应过程中的液流控制方式、反应后检测结果的读取与分析手段, 综述了近年来在面向 POCT 应用中各类基于纸基微流体的分析装置 (Microfluidic paper-based analytical devices, μ PADs) 的研究进展, 最后对纸基微流体技术在 POCT 应用中存在的问题进行了讨论, 并对未来前景作了展望。

关键词: 纸基微流体, 即时检测, 体外诊断

Application of paper-based microfluidics in point-of-care testing

Jiasu Xu, Ya Zhang, Xiaosong Su, Shiyin Zhang, and Shengxiang Ge

School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

Abstract: Point-of-care testing (POCT) is a test method performed on the sampling site or patient bedside. Accurate results can be achieved rapidly by the application of portable analytical instruments and compatible reagents. It has been widely used in the field of *in vitro* diagnosis (IVD). Paper-based microfluidics technology has great potential in developing POCT due to its advantages in low cost, simple operation, rapid detection, portable equipment, and unrestricted application conditions. In recent years, the development of paper-based microfluidic technology and its integration with various new technologies and methods have promoted the substantial development of POCT technology and methods. The classification and characteristic of the paper are summarized in this review. Paper-based microfluidic sample pretreatment methods, the flow control in the

Received: November 19, 2019; **Accepted:** March 17, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81871505), National Scientific and Technological Major Projects in Infectious Disease (No. 2018ZX107302101-001), Science and Technology Development Project of Fujian Province (No. 2017J05136).

Corresponding author: Shengxiang Ge. Tel: +86-592-2188381; E-mail: sxge@xmu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81871505), 传染病重大专项 (No. 2018ZX107302101-001), 福建省自然科学基金 (No. 2017J05136) 资助。

网络出版时间: 2020-03-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200325.0746.001.html>

process of reaction and the signal detecting and analyzing methods for the testing results are introduced. The research progress of various kinds of microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) toward POCT in recent years is reviewed. Finally, remaining problems and the future prospects in POCT application of paper-based microfluidics are discussed.

Keywords: paper-based microfluidics, point-of-care testing, *in vitro* diagnosis

医学诊断对临床的决策具有重要影响,然而在医学辅助手段有限的情况下,诊断往往是基于临床经验,存在较大的主观性。医学检验实验室能通过相关检测试剂盒对特定生物指标进行准确检测,辅助医学诊断。但由于此类检测需依赖于实验室基础设施和专业人员的操作,限制了其在中心实验室以外使用。与标准实验室检测相比,即时检测(Point-of-care testing, POCT)对实验室基础设施的依赖程度较低、检测快速、操作简单、对专业人员要求低,可在中心实验室以外使用。

其中,微流体技术在 POCT 相关诊断中得到了广泛的应用^[1-2],该技术通过构建微流体通道系统对微量流体进行复杂、精确的操纵,在满足上述 POCT 优势的前提下,对样本/试剂的需求量少,能进行更为复杂的检测。目前多数微流体技术采用硅、玻璃、聚合物等材料制成微流控芯片,依赖复杂的芯片制造工艺,并且需要与不同的功能单元(如泵、阀门和反应器)耦合^[3]。相比之下,纸材料便宜、来源广泛、制造工艺相对简单、可降解、生物相容性好^[4-5],其特殊的自身结构具有毛细运输、过滤、试剂储存、样本浓缩等功能^[6],在发展基于纸基微流体的分析装置(Microfluidic paper-based analytical devices, μ PADs)中无需进一步耦合不同功能单元、对设备依赖性小,更能满足 POCT 的需求(基于芯片和纸的微流体技术的详细比较见表 1)。

因此,本文主要围绕纸基微流体技术在 POCT 中的应用研究展开综述,文中首先对纸的分类及特性进行了基本介绍,之后根据医学诊断顺序依次对纸基微流体技术应用于检测反应前的样本前处理方法、反应中的液控制方式以及反应后的结果读取与分析手段进行了相应的阐述,综述了各类 μ PADs 的研究进展,最后就目前纸基微流体技术应用于临床 POCT 方面的挑战进行了探讨,并对其发展趋势及前景作了展望。

1 纸的分类及特性

纸(包括膜)是一种可用于替代硅、玻璃、聚合物等微流控芯片衬底的便宜材料,近年来被广泛开发并应用于 POCT 领域,分为纤维素类和非纤维素类。

1.1 纤维素类

纤维素是由葡萄糖以糖苷键组成的长链大分子化合物^[13],具有亲水性、可降解性和生物相容性^[4-5],纤维素类纸的多孔结构结合亲水性能形成毛细作用,无需额外动力便能输送液体,是尿液分析试纸条^[14]和 μ PADs^[15-16]等 POCT 产品的主要材料。纤维素发生酯化作用后可得硝酸纤维素,硝酸纤维素膜表面光滑、孔径均一、具有疏水性、与蛋白有较强的结合能力^[17],是侧向层析检测试纸条(Lateral flow assays, LFAs)^[18-20]等 POCT 产品的主要材料(纤维素与硝酸纤维素的具体比较见表 2)。

表 1 基于芯片与纸的微流体技术比较

Table 1 Comparison of chip-based and paper-based microfluidics

Comparison	Chip-based	Paper-based	References
Materials	Glass, silicon, polymer, etc	Paper, membrane	[3]
Cost	Expensive	Cheap	[7]
Craftsmanship	Complex and time-consuming	Simple	[3,7]
Driving force	External equipment	Capillary action	[8-9]
Result interpretation	Reading device	Naked eye, reading device	[10-12]

表 2 纤维素与硝酸纤维素的比较

Table 2 Comparison of cellulose and nitrocellulose

Comparison	Cellulose	Nitrocellulose	References
The rate of liquid flow	Slow	Rapid	[25]
The distance of liquid flow	Short	Long	[25]
Wettability	Hydrophilic	Hydrophobic	[26]
Application	FTA card, dipstick, μ PADs	LFAs	[14-15, 18]

1.2 非纤维素类

非纤维素类纸目前使用较少,但亦表现出特殊的优越性能,有望将来大规模应用于 POCT 领域。如玻璃滤纸具有单分散直径,接触液体时不会膨胀^[6],流体运输速度快^[21];聚醚砜 (Poly-Ether-Sulfone, PES) 膜具有耐热性^[22],可应用于对反应温度要求较高的检测实验。

此外,纸还可以与其他材料集成,形成结合了不同材料优点的装置。例如,聚二甲基硅氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS) 基底通常需要额外复杂的表面化学修饰以用于固定生物分子,在 PDMS 微通道内引入具有不同功能的纸可以为固定各种生物分子提供简单有效的策略,无需繁琐的表面化学修饰^[4,23]。文中接下来将对纸基结合微流体技术在检测各过程中发挥的作用进行详细介绍。

2 μ PADs 上样本前处理的实现

2.1 血液样本前处理

血液样本多数情况下需将血浆与红细胞 (Red blood cell, RBC) 分离用于下游分析,离心是常用的方法。然而离心机成本高昂、需外部供电、体积大、不便于携带,限制了其在中心实验室以外使用,且其不适合处理微体积样本。利用纸的多孔结构以及毛细作用能实现血浆分离。纸具有多孔结构,孔径尺寸在 5–50 μm 之间,将该特性与其特有的毛细作用相结合,能够自动过滤全血中体积大于纸孔径的物质。因此当 RBC 直径小于纸的孔径时,RBC 能顺利从纸上通过 (图 1A),当 RBC 直径大于纸的孔径时,RBC 会被拦截在纸上 (图 1B),从而实现 RBC 与血浆的分离^[24]。然而纸

的孔径越小,血浆流动速度越慢,且随着被拦截的 RBC 增多,纸上小孔被不断堵塞,阻止了血浆的进一步通过。可在此基础上利用纸的多孔结构储存抗 RBC 抗体 (抗-A, 抗-B) 辅助血浆分离。抗 RBC 抗体能够促进血液中 RBC 聚集,聚集后的细胞群体积大,可被孔径较大的纸拦截,血浆在大孔径的纸中流动速度更快,且细胞群被拦截在纸上的同时不会完全堵塞小孔,保证血浆向下游流动 (图 1C)^[24]。然而大多数抗红细胞抗体仅能促进 A 型、B 型和 AB 型血中 RBC 的聚集,不能促进 O 型血中 RBC 的聚集,因此使用该方法前需额外进行血型鉴定以确定抗红细胞抗体是否能够诱导 RBC 聚集,操作较为繁琐。可进一步利用纸的多孔结构存储化学试剂提供渗透压辅助血浆分离。Nilghaz 和 Shen^[27]据此开发

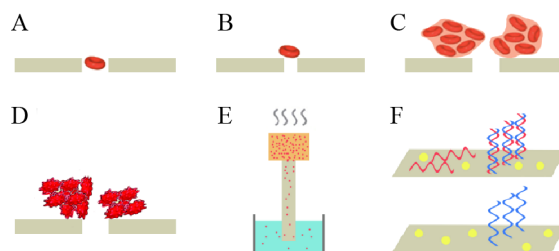


图 1 μ PADs 上样本前处理示意图 (A: RBC 顺利通过大孔径的纸^[24]; B: RBC 被小孔径的纸拦截^[24]; C: 抗红细胞抗体促进 RBC 凝集^[24]; D: 高渗溶液诱导 RBC 聚集; E: 非特异性浓缩方法^[29]; F: 特异性浓缩方法^[30])

Fig. 1 Schematic diagram of sample pretreatment on μ PADs. (A) RBC passes through large aperture paper smoothly^[24]. (B) RBC is intercepted by small aperture paper^[24]. (C) Anti-erythrocyte antibody promotes RBC agglutination^[24]. (D) Hypertonic solution induces RBC aggregation. (E) Method of non-specific concentration^[29]. (F) Method of specific concentration^[30].

了一种对所有血型均适用的 RBC 聚集方法,解决了上述不能诱导 O 型血 RBC 聚集的问题,该方法先在纸上添加高盐溶液并干燥保存,全血在加入后产生渗透压梯度,渗透压差随后诱导 RBC 失水、褶皱和聚集,从而被拦截而实现血浆分离(图 1D)。

2.2 非血液样本前处理

常见的非血液样本有尿液、痰液、精液等,样本类型多、黏度范围大。根据 Lucas-Washburn 定律^[28],溶液的流动速度随着黏度的增大而减慢,因而不同粘性的样本在纸上的流动速度不同,从而使 μ PADs 上纸的长度设计受限。根据目前研究,对于粘度较高的标本,如痰液和粪便等,可以通过稀释来减小粘度,或者缩短其在纸上移动的距离;相反,对于粘度较低的样本,如尿液和唾液等,可以通过适当浓缩或者改变液流速度实现合理的 μ PADs 设计。浓缩也可用于富集样本,提高检测的灵敏度,主要包括非特异性浓缩方式和特异性浓缩方式。溶剂去除技术为常用的非特异性浓缩方式,该技术通过各种手段去除溶剂,达到浓缩待测物的效果,例如通过局部加热湿润纸通道的末端,利用纸的毛细作用使溶剂连续流动至加热位置蒸发,再利用纸的多孔结构承载溶质(图 1E),从而实现分析物浓缩^[29]。目标捕获技术可针对特定待分析物质进行浓缩,如 Rohrman 等^[30]利用纸具有固定生物分子的能力设计了一种增加靶核酸初始浓度的核酸捕获纸带,其原理如图 1F 所示,该纸带包被有与目标核酸互补的寡核苷酸,能在样本流经时捕获目标核酸,而其余无关核酸和蛋白质等杂质则被传递到下游,最后通过洗脱获得该目标核酸以进行后续的分析检测。

3 反应过程中的液流控制

将发展成熟的、但依赖大型仪器设备的检测手段应用于 POCT 上,最大的难点在于如何控制不

同试剂到达反应区的先后顺序及各反应时间,并实现自动化完成检测反应的多个步骤,以最大限度地减少对人员专业度的需求。前文提到,纸无需外接设备提供液流动力,该特性在自动化液体混合、运输等控制方面具有优势,目前对 μ PADs 上液流控制的研究主要围绕反应启停控制(相当于阀的功能)和液体流速控制(相当于泵的功能)两方面。

3.1 反应过程中液流的启停控制

对 μ PADs 上反应的启停控制可以通过以下多种方式实现:(1)通过折叠纸可以实现不同纸通道之间试剂的接触或分离,进而控制反应的开始或停止。例如 Böhringer 课题组^[31]提出的一种新型核酸纯化装置将相应的核酸纯化试剂放置于不同层,通过顺序折叠能实现不同层试剂的接触、混合,启动反应(图 2A);唐蕊华等^[32]对纸运输通道进行折叠,折叠的通道在无液体或者是液体尚未完全润湿管道前,与另一通道处于分离模式,在液体完全润湿后伸展并与另一管道接触,完成液体的运输,以启动下一反应(图 2B)。(2)纸具有可变形性,可通过改变纸的变形程度控制特定通道液体的流动^[33]。图 2C 展示了按压控制液流通过的原理图,图中黑色部分为固定材料、蓝色部分为流经液体的纸通道,灰色部分为未流经液体的纸通道。通过用触笔或圆珠笔手动按下设备中的“开”按钮,可以在两个垂直对齐的通道之间关闭单独的层中的间隙,实现上下两层纸的接触,从而允许流体从一个通道进入到另一个通道。(3)在两个纸通道之间插入一个可溶解的多孔桥可以阻断液流的流动^[34]。如图 2D 所示,该桥可由蔗糖、海藻糖、甘露糖等材料制成,在通过精确体积的流体之后溶解,阻断液流的进一步通过。通过的总体积可以使用若干实验参数进行调整,包括桥的横截面积、桥的组成成分以及纸通道材料的选择。将上述“阀”应用到 μ PADs 中可以实现多个反应启停的自动控制操作。

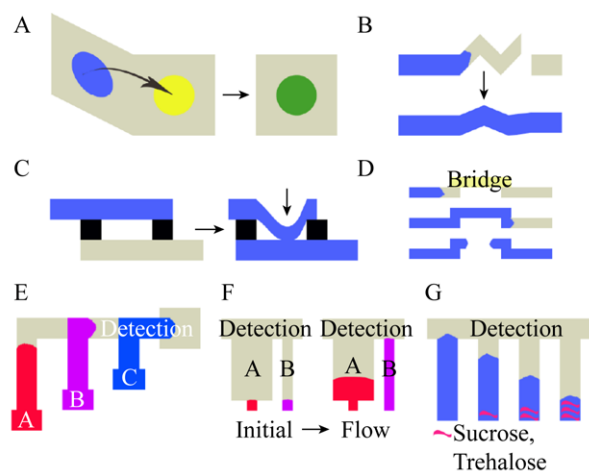


图 2 反应过程中液流控制示意图 (A: 折叠实现试剂的混合以启动反应; B: 液体通过折叠通道后伸展并与另一通道接触; C: 按压箭头所示位置使液流通过; D: 可溶桥在通过一定体积液体后溶解; E: 不同长度管道上液体依次到达检测区; F: 不同宽度管道上的液体流动速度不同; G: 管道上修饰不同程度蔗糖、海藻糖等改变流经液体速度)

Fig. 2 Schematic diagram of liquid flow control during reaction. (A) Folding to achieve mixing of reagents to initiate the reaction. (B) The liquid stretches through the folding channel and contacts the other channel. (C) Press the position indicated by the arrow to allow the flow to pass. (D) Soluble bridge dissolves after passing a volume of liquid. (E) The liquid on the pipe of different lengths reaches the detection zone in turn. (F) Different liquid flow rates on different width pipes. (G) The pipe is modified to varying degrees of sucrose, trehalose and so on to change the flow rate through the liquid.

3.2 反应过程中液流的流速控制

纸上液体的流动速度是由多个因素决定的, 如纸的几何形状 (长度、宽度)^[35]、纸的性质 (孔隙度、表面化学修饰)^[36]、液体黏度^[28, 37]、环境条件 (温度、湿度)^[38]等。通常对纸的几何形状进行设计能控制液流的顺序释放。例如改变纸通道的长度能影响液体的流动速度和到达目的区域所需流动时间, 并且所连通道越短, 越先到达目的区域^[35], 因此可以通过合理设计纸通道的长度, 实现对液流的控制。如图 2E 所示, 将 A、B、C 三种试剂置于连接长、中、短三种长度的纸基通道口, 可实现 C、B、A 依次到达检测区。改变纸

通道的宽度能改变流速, 所连接通道越窄, 流动速度越快, 因此亦可以通过合理设计纸通道的宽度实现对液流的控制^[35]。给不同宽度的纸基通道 A、B 相同的初速度 (等宽起点)、相同的流动时间, 通道 B 因更窄而优先到达检测区 (图 2F)。然而对纸质流体通道几何形状的设计容易在空间上受到限制, 并且增宽或延长纸基通道将需要更大的样品体积来润湿通道, 不适合处理小体积样本。另一种改变流速的手段是通过局部改变纸的孔隙度。Shin 等^[36]通过压缩纸张特定区域的基质以降低孔隙度, 纸压缩后增加了该区域的流体阻力, 且流动阻力的大小可以通过施加到该区域的压缩程度来调节, 进而调节了流速。前文中提到, 溶液的流动速度随着黏度的增大而减慢^[28], 因此在纸管道上修饰液流经过时能溶解的物质, 可以改变液体的粘度, 进而改变流速。如图 2G 所示, Lutz 等^[37]通过在各个通道上修饰不同程度的蔗糖, 改变流经液体的黏度进而改变流速, 使液流顺序进入检测区。蔗糖为非还原性糖, 因此通常不影响测定。然而, 在测定中添加糖可能限制可测量的分析物的类型, 例如, 基于糖的流速控制对于与葡萄糖相关的许多检测是不可行的。此外, 环境条件的改变也会对液体在纸上的流动速度产生一定的影响^[38]。

4 μ PADs 上结果读取与分析

用于检测 POCT 装置中输出信号的常规方法有比色法检测、荧光检测、化学发光检测、电化学发光检测、电化学检测等。比色法检测可由最终用户直接肉眼观察颜色变化读取与分析结果, 结果读取方便, 分析简单, 而其余检测方法通常多涉及到外接设备, 操作复杂且不便携带, 相比之下, 比色法检测更能很好地满足 POCT 的需求 (不同信号检测方法应用于 POCT 的详细比较见表 3)。纸大多是白色的, 能与其他色彩形成强烈对比, 是比色法检测的良好介质, 因此比色法检

测与纸基微流体技术的结合在发展无需大型外部检测系统的 POCT 应用中更具有优势。

4.1 肉眼结果读取与分析

对于定性检测,可以通过肉眼观察 μ PADs 上相应区域颜色变化进行视觉判断,若出现设定颜色变化则为阳性,否则为阴性。此外,通过将颜色变化的深浅与预先设定的分数图表进行比较,能判断待测物浓度的大致范围。然而,由于终端用户在不同的光照条件下对颜色深浅的视觉感知不同,用肉眼进行的视觉比色测量存在局限性,无法精确定量分析。Jeong 等^[39]最近开发了一种无需外部设备的“定量”检测装置,用于测定样本中牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的含量。其原理如图 3A 所示,液流通道上装载有预先嵌入反应试剂的圆片,样本加入后沿着圆片所在通道顺序流动,样本中的 BSA 在流动过程中不断被消耗,并同时发生颜色变化,最后通过计算

颜色变化的圆片个数来测量样品溶液中 BSA 的浓度。同样地,消耗试剂产生颜色变化也可以通过在纸上修饰“刻度尺”实现(图 3B)^[11, 40]。另一种克服颜色深浅感知局限性的方法是对单个分析物使用多个指示剂^[41],如图 3C 所示,每个指示剂在不同的分析物浓度下改变颜色,同时颜色变化深浅也能指示浓度,故可以根据不同指示剂颜色的变化情况进行“定量”。与使用单一指示剂相比,当产生多于一种颜色的不同色调或强度时,可以实现更大的视觉辨别,提供更准确的结果。

4.2 便携设备辅助结果读取与分析

上述肉眼结果读取与分析方式能在一定程度上减少肉眼观测时可能存在的终端用户主观判断差异,然而当检测信号接近阈值时,肉眼有限的颜色分辨率仍会导致有争议的检测结果,可适当借助外部设备进行客观分析判断。 μ PADs 结合具有识别元件的低成本读取器能实现精准的定量检

表 3 不同信号检测方法应用于 POCT 的比较

Table 3 Comparison of different signal detection methods applied in POCT

Detection methods	Characteristics of applying in POCT	References
Colorimetric	No need for a large external inspection system, the results of the analysis can be read by the naked eye, and the auxiliary equipment can be accurately quantified if necessary	[39-41]
Fluorescence	External device is needed to generate excitation light	[42]
Chemiluminescence	Depend on the illuminating signal measuring instrument to measure the number of photons	[43-44]
Electrochemiluminescence	Depend on the external equipment to generate the electrochemical luminescence signal	[45-46]
Electrochemistry	External detection system is needed, electrodes need frequent calibration	[47]

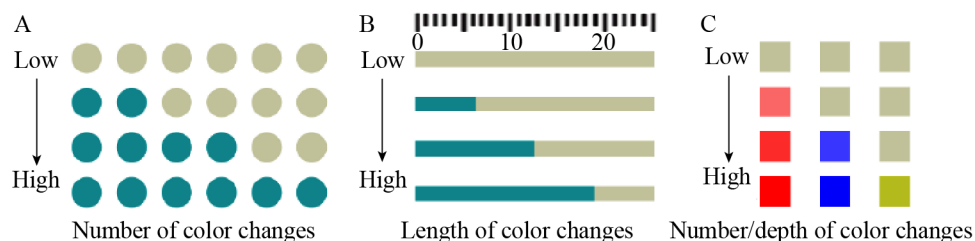


图 3 结果读取与分析示意图 (A: 颜色变化个数指示浓度; B: 颜色变化长度指示浓度; C: 不同指示剂的变化指示浓度)

Fig. 3 Schematic diagram of result reading and analysis. (A) The number of color changes indicates the concentration. (B) The length of the color change indicates the concentration. (C) The change in the different indicator indicates the concentration.

测, 如 Whitesides 课题组^[48]设计了定量检测尿液中葡萄糖与蛋白质的 μ PADs, 该装置通过便携式扫描仪测量检测区数字图像中的颜色强度, 将其与校准曲线进行比较来计算分析物的浓度。

4.3 远程医疗

目前智能手机成像能力强大、普及率广, 是一个很有吸引力的外部设备定量分析工具, 通过手机拍照对检测结果进行图像采集, 采集的图像可以通过手机上安装的特定应用程序或计算机进行处理, 或者远程发送给受过培训的医学专业人员进行分析与结果解释, 实现远程医疗。图像中的颜色强度可能会因为拍摄时的照明条件、相机的分辨率和图像的焦点而变化, 可以通过使用颜色校准表进行调整。

我们相信高灵敏度的色度信号可以通过肉眼轻松检测, 再加上手持读取器或现成的智能手机拍照客观辅助检测, 将来可以实现低成本和准确的定量检测。

5 总结与展望

纸基微流体技术作为一种新兴技术, 近年来在应用于 POCT 上取得了一定的进展。从样本前处理到结果读取与分析的各步骤, 该技术均能利

用纸的独特性质进行巧妙的设计 (表 4), 使得原本操作繁琐的临床检测不再受限于中心实验室, 仅需在 μ PADs 上便能完成检测并实现远程医疗。

然而目前 μ PADs 产品尚未大规模投入临床使用, 其发展仍面临临床表现、产业化和商业化等关键挑战。首先, 在临床表现方面: μ PADs 操作虽然已经较为简便, 但部分用户在使用过程中仍可能出现操作失误, 或者不能正确判读结果, 因此有必要对操作步骤进一步整合, 简化结果判读方式; 由于更多是面向经济、医疗卫生等条件相对落后的地区, μ PADs 产品需要具备比常规诊断产品更高的稳定性, 以应对在运输、保存和使用过程中可能面对的各种不理想条件。尤其是试剂保存的稳定性、试剂的干燥工艺、包装密封性、保存环境的温湿度等都可能对其活性造成影响; 即便是在用户操作和结果判读正确、试剂性能与新配制试剂相当的情况下, 目前大多数 μ PADs 产品的灵敏度、特异性和重复性等性能与中心实验室检测相比还是存在差距^[49-51]。其原因可归结为试剂/样本用量减少、反应时间变短、反应流程简化等多方面的综合效应。因此, 研究人员还需对方法学作更进一步的优化。其次, 在产业化方面: 纸的常用加工工艺为切割、折叠等, 制

表 4 纸应用于 POCT 中的特性和优势

Table 4 Characteristics and advantages of paper used in POCT

Steps	Characteristics	Advantages
Sample preparation	Porous structure for interception	The paper can filter and separate substances whose diameters are larger than it
	Large specific surface area of porous structure	Easy to volatilize and is suitable for concentrating substances
	Porous structure for storing substances	It is convenient for the reagent to be stored in a dry form
Flow control during reaction	Hydrophilic	Capillary action can be spontaneously formed, so the liquid can be transported without external driving force
	Deformability	The flow can be controlled by folding paper, pressing paper, etc
Analysis of the results	Biocompatibility ^[4-5]	Paper does not interfere with the detection of most clinical indicators
	The color is mostly white	White can be strongly contrasted with other colors The corresponding test results can be directly interpreted and analyzed by the naked eye

作简单, 适合大规模生产, 但部分因涉及精密而复杂的微量流体操控, 对工艺要求高。 μ PADs 在与干燥试剂整合过程中可能因试剂呈松散的粉末状而难度增加, 且部分试剂对环境温湿度要求较高, 增加了生产难度。最后, 在商业化方面: 虽然纸的制作原料在大自然中普遍存在, 成本低廉, 但是 μ PADs 涉及的支撑/保护材料以及微小精密的生产工艺成本相对较高, 且产品多为一次性使用, 致使部分产品的单个检测成本高。值得注意的是, 纸基微流体发展时间短, 相关产品的政策法规和行业相关法规尚不十分明确, 需要朝这个方向做更多的工作。

已有的纸基微流体研究主要集中在开发单一功能的独立操作, 今后应尽可能将多个基本操作简化成单个完整系统的操作。例如现有的对于全血分离的研究主要集中在单一全血分离模块的设计与验证, 而目前较多 μ PADs 的检测需要单独离心, 若能将二者整合则能极大方便操作者使用。随着检验指标不断被发现, 多种指标联合使用能在一定程度上增加灵敏度和特异性, 对疾病的判断有更大的帮助, 因此今后应该进一步发展能同时进行多种指标检测的 μ PADs。就目前而言, 虽然纸基微流体技术产品在临床检测性能、商业化方面虽仍面临挑战, 但相比于中心实验室成熟但操作复杂的检测方法, 纸基微流体技术更能满足急诊手术室、小型医院、社区诊所、家庭、野外或资源匮乏等地区对样本进行现场、简单、快速检测的需求。相信未来不仅可以被广泛应用在 POCT 领域, 也可被广泛发展应用于农业、兽医学、食品安全、环境卫生等领域, 并发挥重大作用。

REFERENCES

- [1] Duan XX, Zhao LL, Dong H, et al. Microfluidic immunoassay system for rapid detection and semi-quantitative determination of a potential serum biomarker mesothelin. *ACS Sens*, 2019, 4(11): 2952–2957.
- [2] Natarajan S, Su FM, Jayaraj J, et al. A paper microfluidics-based fluorescent lateral flow immunoassay for point-of-care diagnostics of non-communicable diseases. *Analyst*, 2019, 144(21): 6291–6303.
- [3] Nilghaz A, Wicaksono DHB, Gustiono D, et al. Flexible microfluidic cloth-based analytical devices using a low-cost wax patterning technique. *Lab Chip*, 2012, 12(1): 209–218.
- [4] Credou J, Berthelot T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *J Mater Chem B*, 2014, 2(30): 4767–4788.
- [5] Juvonen H, Määttänen A, Laurén P, et al. Biocompatibility of printed paper-based arrays for 2-D cell cultures. *Acta Biomater*, 2013, 9(5): 6704–6710.
- [6] Magro L, Escadafal C, Garneret P, et al. Paper microfluidics for nucleic acid amplification testing (NAAT) of infectious diseases. *Lab Chip*, 2017, 17(14): 2347–2371.
- [7] Soum V, Park S, Brilian AI, et al. Programmable paper-based microfluidic devices for biomarker detections. *Micromachines (Basel)*, 2019, 10(8): 516.
- [8] Eluru G, Adhikari JV, Chanda P, et al. Hand-powered elastomeric pump for microfluidic point-of-care diagnostics. *Micromachines (Basel)*, 2020, 11(1): 67.
- [9] Yakoh A, Chaiyo S, Siangproh W, et al. 3D capillary-driven paper-based sequential microfluidic device for electrochemical sensing applications. *ACS Sens*, 2019, 4(5): 1211–1221.
- [10] Park JH, Jin CE, Koo B, et al. A simple microfluidic assay for diagnosing tuberculous meningitis in HIV-uninfected patients. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(5): e01975–18.
- [11] Gerold CT, Bakker E, Henry CS. Selective distance-based K^+ quantification on paper-based microfluidics. *Anal Chem*, 2018, 90(7): 4894–4900.
- [12] Ma LY, Nilghaz A, Choi JR, et al. Rapid detection of clenbuterol in milk using microfluidic paper-based ELISA. *Food Chem*, 2018, 246: 437–441.
- [13] Turner S, Kumar M. Cellulose synthase complex organization and cellulose microfibril structure. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2018, 376(2112):

- 20170048.
- [14] Park SK, Jung JY, Oh CM, et al. The level of urine dipstick proteinuria and its relation to the risk of incident cholelithiasis. *J Epidemiol*, 2020, doi: 10.2188/jea.JE20190223.
- [15] Hua QT, Shibata H, Hiruta Y, et al. Flow control-based 3D μ PADs for organophosphate pesticide detection. *Analyt Sci*, 2019, 35(4): 393–399.
- [16] Nguyen MP, Kelly SP, Wydallis JB, et al. Read-by-eye quantification of aluminum (III) in distance-based microfluidic paper-based analytical devices. *Anal Chim Acta*, 2020, 1100: 156–162.
- [17] He PJ, Katis IN, Eason RW, et al. Laser-based patterning for fluidic devices in nitrocellulose. *Biomicrofluidics*, 2015, 9(2): 026503.
- [18] Bishop JD, Hsieh HV, Gasperino DJ, et al. Sensitivity enhancement in lateral flow assays: a systems perspective. *Lab Chip*, 2019, 19(15): 2486–2499.
- [19] Jing J, Wang ZZ. Research advance of lateral flow assay labels. *J Biomed Eng*, 2018, 35(4): 661–664 (in Chinese).
靖静, 王志增. 侧向层析技术标记物研究进展. *生物医学工程学杂志*, 2018, 35(4): 661–664.
- [20] Skipper C, Tadeo K, Martyn E, et al. Evaluation of serum cryptococcal antigen testing using two novel semi-quantitative lateral flow assays in persons with cryptococcal antigenemia. *J Clin Microbiol*, 2020, doi: 10.1128/JCM.02046-19.
- [21] Toley BJ, Wang JA, Gupta M, et al. A versatile valving toolkit for automating fluidic operations in paper microfluidic devices. *Lab Chip*, 2015, 15(6): 1432–1444.
- [22] Shen LG, Bian XK, Lu XF, et al. Preparation and characterization of ZnO/polyethersulfone (PES) hybrid membranes. *Desalination*, 2012, 293: 21–29.
- [23] Ma J, Yan SQ, Miao CY, et al. Paper microfluidics for cell analysis. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(1): e1801084.
- [24] Yang XX, Forouzan O, Brown TP, et al. Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices. *Lab Chip*, 2012, 12(2): 274–280.
- [25] Fronczek CF, Park TS, Harshman DK, et al. Paper microfluidic extraction and direct smartphone-based identification of pathogenic nucleic acids from field and clinical samples. *RSC Adv*, 2014, 4(22): 11103–11110.
- [26] Hu J, Wang SQ, Wang L, et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54: 585–597.
- [27] Nilghaz A, Shen W. Low-cost blood plasma separation method using salt functionalized paper. *RSC Adv*, 2015, 5(66): 53172–53179.
- [28] Villagrán-Zaccardi Y, Alderete N, de Belie N. Lucas-Washburn vs Richards equation for the modelling of water absorption in cementitious materials. *MATEC Web Conf*, 2018, 199: 02019.
- [29] Wong SY, Cabodi M, Rolland J, et al. Evaporative concentration on a paper-based device to concentrate analytes in a biological fluid. *Anal Chem*, 2014, 86(24): 11981–11985.
- [30] Rohrman B, Richards-Kortum R. Inhibition of recombinase polymerase amplification by background DNA: a lateral flow-based method for enriching target DNA. *Anal Chem*, 2015, 87(3): 1963–1967.
- [31] Govindarajan AV, Ramachandran S, Vigil GD, et al. A low cost point-of-care viscous sample preparation device for molecular diagnosis in the developing world; an example of microfluidic origami. *Lab Chip*, 2012, 12(1): 174–181.
- [32] Tang RH, Yang H, Gong Y, et al. A fully disposable and integrated paper-based device for nucleic acid extraction, amplification and detection. *Lab Chip*, 2017, 17(7): 1270–1279.
- [33] Martinez AW, Phillips ST, Nie ZH, et al. Programmable diagnostic devices made from paper and tape. *Lab Chip*, 2010, 10(19): 2499–2504.
- [34] Houghtaling J, Liang T, Thiessen G, et al. Dissolvable bridges for manipulating fluid volumes in paper networks. *Anal Chem*, 2013, 85(23): 11201–11204.
- [35] Fu E, Lutz B, Kauffman P, et al. Controlled reagent transport in disposable 2D paper networks. *Lab Chip*, 2010, 10(7): 918–920.
- [36] Shin JH, Park J, Kim SH, et al. Programmed sample delivery on a pressurized paper. *Biomicrofluidics*, 2014, 8(5): 054121.
- [37] Lutz B, Liang T, Fu E, et al. Dissolvable fluidic time

- delays for programming multi-step assays in instrument-free paper diagnostics. *Lab Chip*, 2013, 13(14): 2840–2847.
- [38] Camplisson CK, Schilling KM, Pedrotti WL, et al. Two-ply channels for faster wicking in paper-based microfluidic devices. *Lab Chip*, 2015, 15(23): 4461–4466.
- [39] Jeong SG, Lee SH, Choi CH, et al. Toward instrument-free digital measurements: a three-dimensional microfluidic device fabricated in a single sheet of paper by double-sided printing and lamination. *Lab Chip*, 2015, 15(4): 1188–1194.
- [40] Cate DM, Dungchai W, Cunningham JC, et al. Simple, distance-based measurement for paper analytical devices. *Lab Chip*, 2013, 13(12): 2397–2404.
- [41] Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. *Anal Chim Acta*, 2010, 674(2): 227–233.
- [42] Qian LH, Li L, Yao SQ. Two-photon small molecule enzymatic probes. *Acc Chem Res*, 2016, 49(4): 626–634.
- [43] Ge L, Wang SM, Song XR, et al. 3D origami-based multifunction-integrated immunodevice: low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device. *Lab Chip*, 2012, 12(17): 3150–3158.
- [44] Delaney JL, Hogan CF, Tian JF, et al. Electrogenerated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors. *Anal Chem*, 2011, 83(4): 1300–1306.
- [45] Yan JX, Yan M, Ge L, et al. A microfluidic origami electrochemiluminescence aptamer-device based on a porous Au-paper electrode and a phenyleneethynylene derivative. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49(14): 1383–1385.
- [46] Bertonecello P, Forster RJ. Nanostructured materials for electrochemiluminescence (ECL)-based detection methods: recent advances and future perspectives. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(11): 3191–3200.
- [47] Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Anal Chem*, 2009, 81(14): 5821–5826.
- [48] Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, et al. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal Chem*, 2008, 80(10): 3699–3707.
- [49] Noiphung J, Talalak K, Hongwarittorn I, et al. A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups. *Biosens Bioelectron*, 2015, 67: 485–489.
- [50] Ozer T, McMahon C, Henry CS. Advances in paper-based analytical devices. *Annu Rev Anal Chem*, 2020, 13, doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-114845.
- [51] Lim WY, Goh BT, Khor SM. Microfluidic paper-based analytical devices for potential use in quantitative and direct detection of disease biomarkers in clinical analysis. *J Chromatogr B*, 2017, 1060: 424–442.

(本文责编 郝丽芳)