

“主动健康”百花齐放

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003076

基于纸基微流控的核酸分子快速检测技术研究进展

杨毅¹,孙金元²,陈嘉瑞³,杨滨瑞³,丁柯⁴,罗阳¹,张洪⁵

(1. 重庆大学医学院智慧检验与分子医学中心,重庆 400044;2. 重庆大学生物工程学院,重庆 400044;
 3. 重庆市第一实验中学校,重庆 400044;4. 重庆大学附属江津医院科教外事部,重庆 402260;
 5. 山东大学第二医院检验医学中心,济南 250033)

[摘要]核酸分子具有丰富的遗传信息,对疾病诊断具有关键价值。传统核酸检测技术受限于耗时长、需大型仪器设备等局限,严重制约了其在大规模、突发性疾病检测中的应用。纸基微流控具有便携、自驱动等优势,在整合等温扩增技术后,为核酸分子快速、准确的检测提供可能。本文从纸基微流控的设计出发,综述纸基微流控在核酸分子检测中的研究进展,分析影响其检测灵敏度、稳定性等的干扰因素,为推动纸基微流控向临床转化提供重要参考。

[关键词]微流控;核酸检测;等温扩增;即时检验

[中图分类号]R331

[文献标志码]A

[收稿日期]2022-06-29

Progress in rapid detection of nucleic acid molecules by integrated paper-based microfluidics

Yang Yi¹, Sun Jinyuan², Chen Jiarui³, Yang Binrui³, Ding Ke⁴, Luo Yang¹, Zhang Hong⁵

(1. Center of Smart Laboratory and Molecular Medicine, School of Medicine, Chongqing University;
 2. College of Bioengineering, Chongqing University;3. Chongqing First Experimental Middle School;
 4. Department of Science and Education Foreign Affairs, Jiangjin Hospital of Chongqing University;
 5. Laboratory Medicine Center, The Second Hospital of Shandong University)

[Abstract]Nucleic acid is of great importance to disease diagnosis because of its rich genetic information. Traditional nucleic acid detection technology is limited by the limitation of time consuming and large equipment, which seriously restricts its application in large-scale and sudden disease detection. Paper-based microfluidic technology has the advantages of portability and self-actuation, providing the possibility for rapid and accurate detection of nucleic acid molecules after integrating isothermal amplification technology. Based on the design of paper-based microfluidic technology, this review has summarized the research progress of paper-based microfluidic technology in the detection of nucleic acid molecules, and analyzed the interference factors that affect the sensitivity and stability of the detection, providing an important reference for promoting the clinical transformation of paper-based microfluidic technology.

[Key words]microfluidics; detection of nucleic acid; isothermal amplification; point-of-care testing

核酸作为公认的生物遗传信息载体,其检测常被作为诸多疾病确诊的金标准^[1]。临床常用核酸检测技术以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)为基础,进一步发展出如实时荧光定量PCR、数字PCR等高灵敏度核酸分子定量技术,然而都存在耗时长、依赖昂贵仪器设备的缺点。在当前新型冠状病毒(novel coronavirus, SARS-CoV-2)大流

作者介绍:杨毅,Email:1374749359@qq.com,

研究方向:疾病分子标志物检测技术研究。

通信作者:张洪,Email:annicq@163.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:82072383);国家杰出青年科学基金资助项目(编号:82125022);博士后创新人才支持计划(BX20220194);四川省科技计划重点研发资助项目(编号:2021YFQ0060);重庆市自然科学基金重点资助项目(编号:cstc2020jcyj-zdxmX0006);重庆市青少年创新人才雏鹰计划资助项目(编号:CY210109)。

优先出版:[\(2022-08-31\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.0934.012.html)

行背景下,短期内大规模的检测需求极大冲击着现有核酸检测技术。因此,如何实现快速、高灵敏、便携式检测是当前核酸检测技术面临的主要挑战。

以整体实验室分析系统集成于芯片上的流体处理概念为核心的微流控技术,具有微型化、集成化等优势,已被广泛应用于病原微生物、肿瘤标志物等的检测^[2],有望解决传统检测耗时长、依赖大型仪器设备等缺陷。其中以纸纤维为基底的纸基微流控因良好的生物相容性、低成本和易于大规模制造等特点,为核酸分子即时检验(point-of-care testing, POCT)提供可选方案。然而受限于纸基微流控内有限的反应空间,复杂样本中低丰度核酸分子的检测仍是核酸POCT技术发展的一大瓶颈。

等温扩增技术的发展有效解决了核酸分子扩增条件限制难题。该技术无需梯度温控设备的优势为整合纸基微流控的低丰度核酸分子检测提供了支持。结合环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)、杂交

链式反应(hybrid chain reaction, HCR)和催化发夹自组装(catalytic hairpin self-assembly, CHA)等^[3]等温扩增技术的纸基微流控平台,已被成功用于SARS-CoV-2、人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)等核酸分子快速检测^[4-5]。基于此,本文综述了整合等温扩增策略的纸基微流控核酸分析技术研究进展,对比不同等温扩增POCT策略在纸基核酸检测的优劣势,分析影响其灵敏性、特异性、稳定性关键因素,推动核酸分子快速、超敏检测技术的发展(图1)。

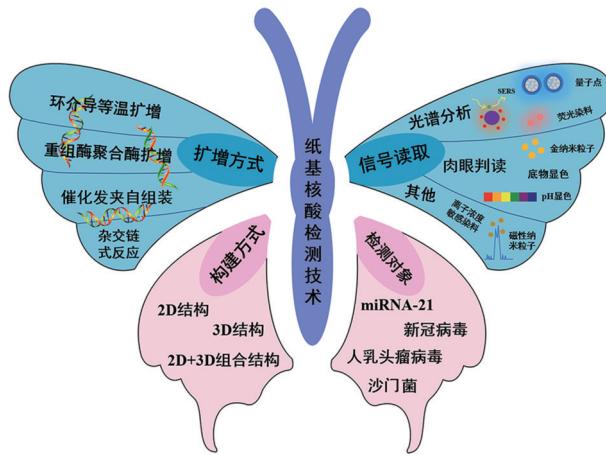


图1 基于纸基微流控的核酸检测技术

1 纸基微流控概述

1.1 纸基微流控的定义

纸基微流控是指在纸质材料上利用物理或化学手段构建图案化疏水屏障,从而划分出供液体流动和反应的微流道。纸基微流控常具有以下基本功能:将样品通过纸张的毛细管作用分布到多个区域;可以对小体积流体进行微量分析;集样品预处理、纯化、浓缩等功能于一体,实现快速检测。

随着技术的进步,纸基微流控检测经历了从定性分析到精确定量的发展。在传统的由硅和玻璃等材质制备的微流控芯片中,体系中的靶分子需通过与流道壁偶联的探针分子结合,进而实现核酸分子的分离与检测。而纸基纤维素作为一种极性亲水聚合物,在溶液被动流经整个纸基微流控时,纤维素可与溶液中的核酸分子或其他带电和极性物质形成强烈的非共价相互作用,以达到天然分离核酸分子的效果,并用于下游检测^[6]。

1.2 纸基微流控的结构

纸基微流控的结构可大致分为平面二维(2D)和立体三维(3D)两大类,二者之间的主要区别体现在结构设计、功能集成和多靶标、多步骤分析能力等方面(表1)。

1.2.1 2D结构 为实现核酸分子的快速检测,研究者们探索经典的2D侧向流试纸用于核酸分子POCT识别。通过预

固定捕获探针,经典2D侧向流试纸可提供连续的横向流动分析。尽管该类2D分析策略具有便携和反应体系简单可靠的优点,但在多个维度上应对复杂核酸反应体系的能力有限,往往仅能检测单靶标核酸分子。为了引导反应体系在多个方向上水平流动,在核酸分子检测中执行如多靶标分析、顺序试剂递送等功能,越来越多的研究转向立体3D结构的微流控分析^[13]。

1.2.2 3D组合结构 为了满足多步分析,研究者通过折叠、弯曲或扭转2D纸基微流控,或利用多层纸基衔接以构建3D纸基微流控^[14]。与2D结构相比,3D结构在核酸检测中能够整合样品纯化层、静电吸附层等对核酸样本进行纯化和多步骤分析^[10]。利用多层流体结构结合如电极印刷、生物发光等手段,可同时对多个核酸分子检测区域进行快速定量,且能降低在试剂输送过程中样品的损耗率^[15]。

同时,通过2D与3D纸基结构的组合可提高复杂体系中核酸分子检测效率,如在McConnell WW等^[16]开发的丙型肝炎病毒诊断平台中,2D与3D纸基微流控分别负责靶标核酸的检测和血液样品的预处理步骤。这种设计的优点在于检测部分独立于样品预处理区域之外,能最大限度地排除非靶物质的干扰,保证检测结果的准确性。因此,根据临床样本处理需求的不同,可选择相应的纸基微流控结构以实现最优检测。

2 纸基微流控技术在核酸快速检测中的应用

随着扩增技术的发展,整合系列核酸扩增技术的纸基微流控已被广泛用于寨卡病毒、腺病毒、SARS-CoV-2等核酸分子的快速检测,为核酸分子的准确、高通量检测提供了可选方案。

2.1 基于环介导等温扩增的纸基核酸快速检测

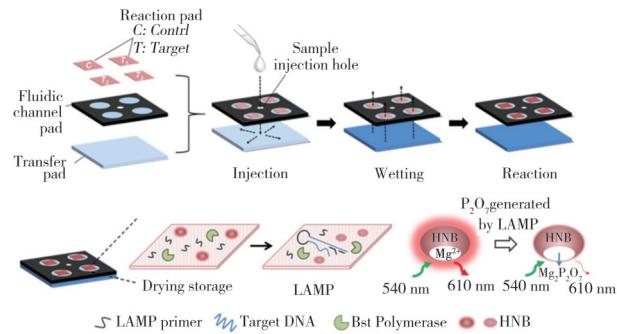
LAMP技术针对靶基因的不同区域分别设计4~6条特异性引物,经链置换DNA聚合酶的作用,在60~65℃条件下扩增1 h可达10⁹拷贝,具有较高扩增效率和强特异性^[17]。其试剂可制备成冻干粉末预置于纸基材料中进行长时间保存和运输,检测时重新水化并不会对LAMP扩增效力产生明显影响^[18]。

LAMP体系中Mg²⁺、焦磷酸等副产物的变化常被作为核酸检测依据。为与纸基微流控更好地整合,基于体系中Mg²⁺的浓度变化,Seok Y等^[11]利用多层纸基材料进行3D组装,结合蜡染技术构建了多个具有纵向流体空间的LAMP反应区(图2A),仅需一步加样,即可通过Mg²⁺敏感染料羟基萘酚蓝的荧光特性对LAMP信号进行实时分析。但其与常用的Mg²⁺敏感染料钙黄绿素存在同样的问题,即反应中染料颜色变化的对比度较低,色弱人群往往不能很好地区分^[19]。此外,利用LAMP扩增过程中能产生大量焦磷酸,导致反应体系的pH发生明显改变这一特点的纸基pH指示法,已在寨卡病毒等检测中被证明具有较高灵敏度,检测限低至

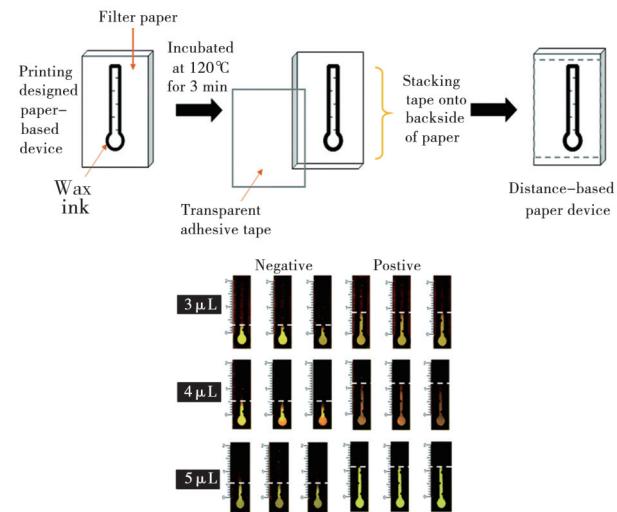
表1 纸基微流控的结构特征

名称	结构设计	功能集成	分析手段	多靶标检测能力
2D纸基微流控结构 ^[7-9]	平面结构、组装简易、稳定性强	通常仅具有检测功能	免疫分析	检测空间有限、多靶标检测能力较弱
3D纸基微流控结构 ^[10-12]	立体结构、组装精度要求较高、易受结构位移影响	整合多层纸基结构能实现核酸提取和多步骤分析	免疫分析、电化学分析等	可提供多层流体位移、多靶标检测能力强

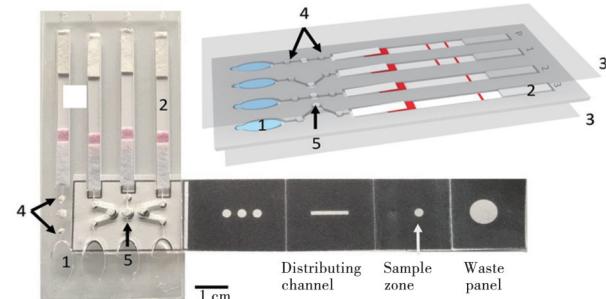
1 拷贝/ μL ^[20]。除了利用 LAMP 反应体系本身的特性变化作为检测依据外,其他报道的纸基 LAMP 信号输出方法还包括底物显色、荧光标记和基于流体层析距离(图 2B)的检测等^[7,21-22]。然而,上述研究大多依靠单独的扩增步骤。为将扩增与检测整合于一体,Reboud J 等^[23]设计了一种疟疾检测 POCT 装置(图 2C),并通过整合一个多功能 3D 纸带进行临床血液样本的扩增前预处理;经 LAMP 反应后,靶标能继续与通道中预储存的红色微球结合,随后在 2D 纸基微流控上完成检测,实现了扩增与检测一体化。



A. 纸基 LAMP 反应对 3 种脑膜炎病毒进行定量分析^[11]



B. 结合 LAMP 扩增与纸基荧光层析距离的大肠杆菌检测^[21]



C. 基于 LAMP 反应的纸基微流控设备用于疟疾快速检测^[23]

图 2 基于 LAMP 技术的纸基核酸快速检测

基于纸基的 LAMP 检测虽然具有与 PCR 技术相当的灵敏度,但 LAMP 反应长时间的高温环境将对纸基微流控材料的耐热性提出较高要求。加之,在检测中对恒温设备的需求

和易受气溶胶污染的特性,使 LAMP 暂时无法在真正意义上脱离实验室检测。除了尽可能保证操作环境的清洁和反应装置的密闭外,最近已有研究报道了一种使用硫代引物代替传统引物的 LAMP 设计,可以在更低的工作温度(40°C)下形成哑铃状结构进行有效扩增,减少对恒温设备的依赖^[24]。如何减少温度、设备等条件要求,仍是后续纸基微流控研究关注的重点。

2.2 基于重组酶聚合酶扩增的纸基核酸快速检测

与 LAMP 相比,RPA 技术能够在 37°C 的室温条件下在 20 min 内实现靶核苷酸的高效常温扩增。由于 RPA 具有相对较低的最适扩增温度,因此在选择疏水区构建方法时无须考虑反应温度对疏水材料的影响,便于直接在纸基微流控上实现扩增与检测一体化。

长期以来,对单核苷酸多态性的识别是核酸检测技术的一大挑战。为了实现单碱基错配特异性识别,Kellner MJ 等^[8]利用 Cas13a 分子强大的靶向性与 RPA 结合,以纸基为反应基底构建了基于成簇规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR)的 SHERLOCK 系统。虽然其具有识别单碱基错配的能力和低至 2 amol/L 的检测限,但纸基材料的自发荧光可能对信号读取产生干扰,且户外场景下荧光淬灭现象时有发生。基于此,Zhuang JW 等^[9]结合表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering,SERS)取代 SHERLOCK 系统荧光信号判读(图 3A),避免了纸基材料自发荧光的影响及可能产生的荧光淬灭现象。该方法可在 45 min 内实现伤寒沙门菌的高灵敏度检测,检测限为 3 菌落形成单位/mL。

然而,上述设计均依赖大型检测设备进行信号读取,也难以实现 POCT 检测。为了实现肉眼判读,研究者开发多种基于 RPA 技术的比色分析试纸。Tang YD 等^[25]在利用 CRISPR 系统的同时,通过引入一种在妊娠试纸条上具有空间位阻效应的探针,将靶标存在转化为妊娠试纸条上的颜色变化(图 3B)。经过 30 min 的 RPA 扩增,该系统对 HPV、SARS-CoV-2 的检测限分别低至 2 拷贝/ μL 和 1.6 amol/L 。同时,Nybond S^[26]和 Cherkaoui D^[27]等团队也分别利用金和碳纳米颗粒作为信号输出分子实现了对腺病毒、SARS-CoV-2 的视觉检测,但其仍存在检测时间较长的问题。为了进一步提高检测效率,Ahn H 等^[12]利用多层纸基材料进行组装,使检测体系在 3D 模型中各功能层间进行自由流动和分析(图 3C),检测时间进一步缩短至 20 min。

尽管 RAP 技术整合纸基微流控分析可有效解决扩增过程中的温度问题,但是其扩增体系均需要多种酶的参与,其价格昂贵,且对保存条件有特定要求,一定程度上限制了大规模应用。后续研究中如何探索更多酶替代方案或无酶方案值得思考。

2.3 基于杂交链式反应的纸基核酸快速检测

HCR 是 Dirks 和 Pierce 提出的一种无酶核酸扩增技术,该技术的提出使得核酸分子的体外扩增摆脱了对聚合酶的依赖,进一步降低了纸基核酸快速检测装置的生产、存储成本。HCR 体系中目标分子的识别会触发若干种 DNA 发夹结构之间的级联杂交事件,形成具有重复单位的缺口双螺旋^[28]。

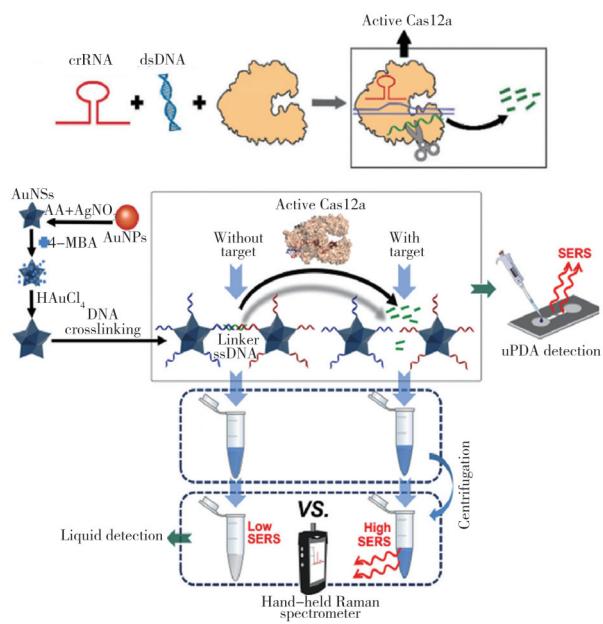
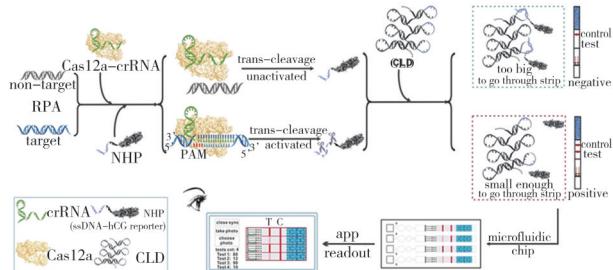
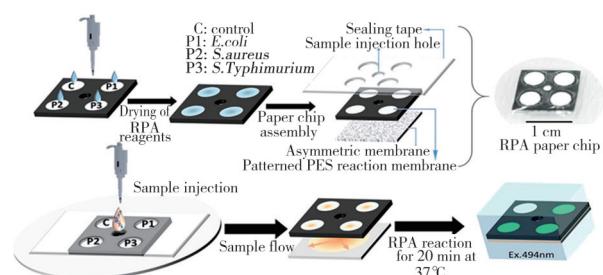
A. 基于SERS信号的CRISPR-Cas纸基检测系统^[9]B. 利用CRISPR和RPA扩增的妊娠试纸检测设计^[25]C. RPA反应用于多种病原菌定量分析^[12]

图3 基于RPA技术的纸基核酸快速检测

由于每一个目标分子都可以触发一个HCR反应生成一段长双链HCR产物，这种特殊结构不仅能实现有效的信号放大，而且可在发夹上修饰各种信号分子或经特殊序列设计实现高效标记。Ying N等^[29]利用HCR反应设计了一种能更高效检测沙门菌的纸基微流控芯片(图4A)。传统细菌检测通常通过平板培养进行，需要耗费几天时间才能形成菌落，而纸基核酸检测装置提供了一种更快、更便携的方案。该设计中特殊修饰的发夹使得HCR产物结合有大量生物素，能与更多链霉亲和素修饰的金纳米粒子(AuNPs)结合，在测试线上产生更为明显的颜色变化，20 min内即可定量沙门菌DNA(检测限1.76 pmol/L)，极大提高了检测效率。但由于AuNPs价格较高且不宜长时间储存，针对发夹探针进行了特殊设计，结合底物显色反应的纸基微流控也被开发用于各类

疾病标志物检测^[30-31]。

如今，整合HCR技术的纸基微流控检测大多以各类荧光基团标记的方式取代纳米粒子和底物显色策略^[32-33]，虽能在一定程度上实现信号放大效果，但由于信号分子与反应体系本身的局限，导致检测灵敏度仍然较低。通过对纸基材料加以表面改性或探索新的纸基信号输出模式，有望再次提升检测灵敏度。如Zhang DG等^[34]在基于HCR反应的同时巧妙地利用了纸张的咖啡环效应作为信号转导手段(图4B)，将体系中液体的蒸发过程转化为纸张末端彩色条带的形成过程，仅需测量着色带长度即可对miRNA-21进行定量，检测限为0.2 pmol/L，为提高检测灵敏度提供了新思路。此外，Choi JR等^[35]还通过在纸基材料中加入可溶性糖来创建混合基质的方法控制样本流量，以延长生物分子间的相互作用时间，提高反应稳定性；与未经预处理时相比，该方法在1 h内将登革热病毒的检出能力提升了10倍(10 pmol/L)。

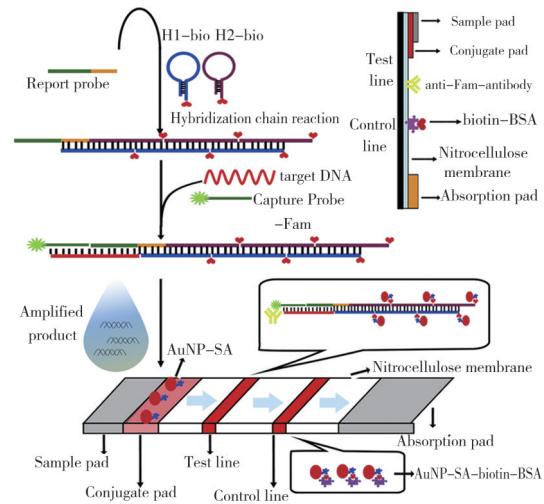
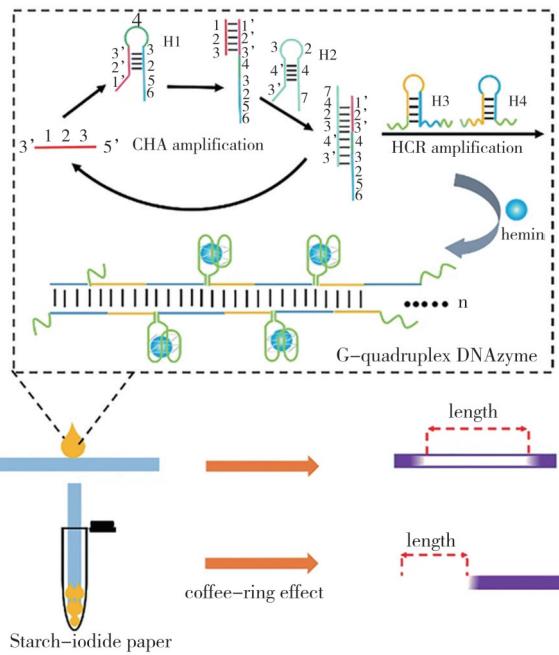
A. 基于HCR反应的沙门菌纸基检测装置^[29]B. 基于咖啡环效应的miRNA定量分析示意图^[34]

图4 基于HCR技术的纸基核酸快速检测

相较于 RPA 技术,无酶催化的 HCR 技术结合纸基微流控在保留其信号放大效果的同时,可有效缩短检测时间、降低成本;但受限于纸基纤维反应空间,现有整合 HCR 技术的纸基微流控大多基于线性 HCR 反应,较难进行指数型非线性扩增。若能将反应体系加以设计和改进,在纸质微流控上实现指数型 HCR 扩增,则能达到更优的痕量靶标检测效果。

2.4 基于催化发卡自组装反应的纸基核酸快速检测

CHA 是 Yin P 等^[36]在 HCR 技术基础上开发的一种更高效、更灵敏的无酶信号放大技术。CHA 与 HCR 的主要区别在于,CHA 反应中靶标触发级联放大效应后并不会作为生成物的一部分参与后续延伸,而是会被重新释放到体系中充当“催化剂”继续触发下一段 CHA 反应,产生更明显的信号放大效果(表 2)。无酶催化的 CHA 具有更高灵敏度和放大效率,在纸基微流控中是一种同样经济且更适用于微量靶标的检测手段。

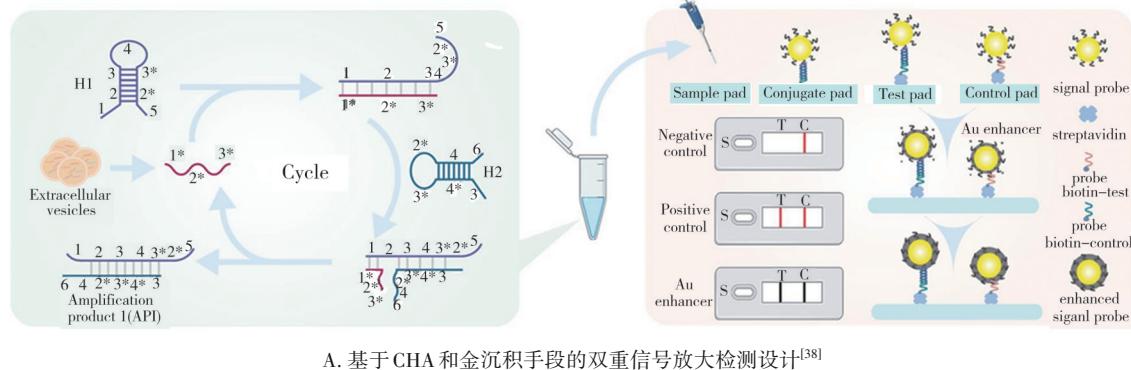
近年来,胞外囊泡相关的 glyican-1 mRNA 被认为是一种新的用于胰腺癌早期诊断的有效生物标志物^[37],但在早期胰腺癌患者体内含量极低,为早期检测带来了困难。基于 CHA 反应强大的信号放大效果,Li HX 等^[38]开发了一种能够在纸质芯片上具有双重放大的早期胰腺癌诊断卡(图 5A)。体系中靶标能有效触发 CHA 装配策略并与

AuNPs 特异性结合;随后利用金沉积技术将捕获的 AuNPs 粒径再次增大实现双重信号放大,能在 2 h 内达到 100 fmol/L 的视觉检测灵敏度。与传统的免疫分析试纸条相比,该设计通过同时引入 CHA 和金沉积手段达到更高的检测灵敏度。为了缩短反应时间、提高检测效率,Su FY^[39]和 Deng HP^[40]等进一步将该技术进行了拓展:在靶标触发 CHA 反应后,分别利用量子点和多色荧光基团标记取代了金增强步骤(图 5B、C),实现对 miRNA-21 和丙型肝炎病毒精确定量的同时将反应时间缩短至原来的 1/3。同时,也有文献对利用表面增强拉曼分子标记发夹探针的方法进行报道^[41-42],通过检测产生的 SERS 信号也能获得较为理想的检测效果。

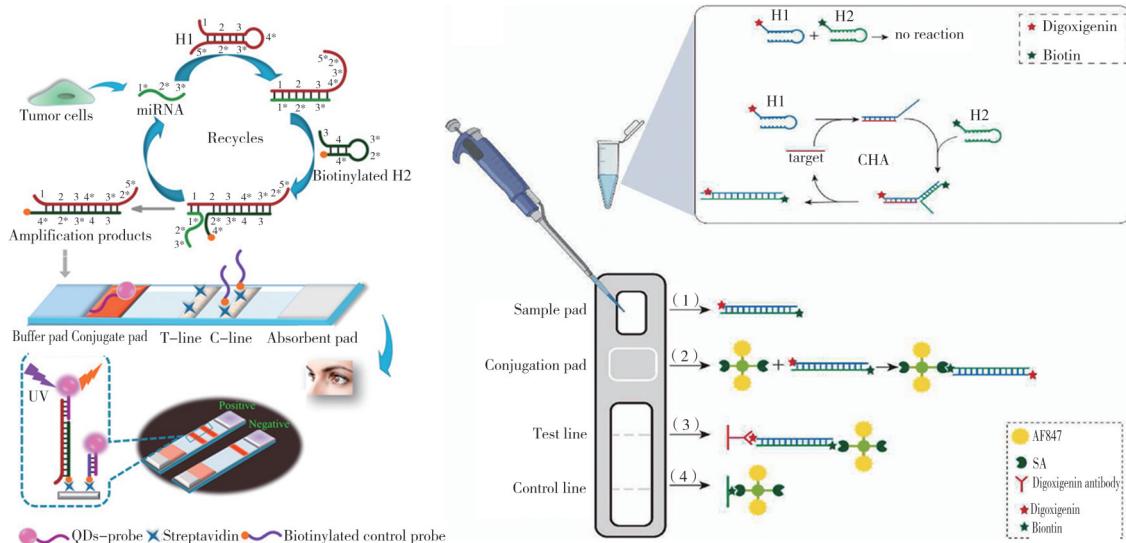
无酶核酸扩增手段相比于含酶扩增策略在整合纸基微流控分析中具有更高的灵活性。值得注意的是,在基于自由能的发夹探针自组装策略中,发夹探针的精确序列设计是保证高特异性扩增的关键和难点所在,其结构的细微变化即会明显影响无酶扩增反应的效率(表 2)。

2.5 其他信号放大策略用于纸基核酸检测

相较于核酸预扩增,纸基核酸直接检出策略往往通过提高信号分子的信号输出效率或采取全新的分子信号输出模式,省去了核酸扩增复杂的引物设计步骤,其反应体系也更为简单,更易于临床应用。Gao Y 等^[43]通过在 AuNPs 表面偶



A. 基于 CHA 和金沉积手段的双重信号放大检测设计^[38]



B. 利用量子点标记发夹探针对 miRNA-21 进行精确定量^[39]

C. 利用荧光染料标记发夹探针对丙型肝炎病毒进行精确定量^[40]

图 5 基于 CHA 技术的纸基核酸快速检测

表 2 纸基微流控整合不同等温扩增技术的对比分析

名称	温度/°C	反应时间/ min	酶	检测靶标	引物 数量	扩增效率	与纸基结合的优势	与纸基结合的不足
环介导等温扩增 (LAMP) ^[17]	60~65	<60	Bst DNA pol	DNA/RNA	4~6	10^9	反应试剂可在纸上长时 间冻干保存	长时间高温反应对纸 基疏水材料要求较高、 易受气溶胶污染
重组酶聚合酶扩增 (RPA) ^[8,25]	30~42	15~60	Bsu DNA pol、 T4 uvsX 重组 酶、肌酸激酶	DNA	2	$10^9\sim10^{11}$	反应试剂可在纸上长时 间冻干保存, 室温下即具 有较高扩增效率	需要多种酶蛋白同时 参与反应, 体系复杂且 成本较高
杂交链式反应 (HCR) ^[28]	25	<120	-	DNA/RNA	2	10^2	无酶扩增、体系简单可靠	线性扩增效率较低
催化发夹自组装 (CHA) ^[36,40]	37	20~30	-	DNA/RNA	2	$10^2\sim10^4$	无酶扩增、扩增效率较 HCR 更高	容易出现假阳性结果

联 ssDNA 的方法实现了 AuNPs 的网格状聚集以增强显色强度(图 6A),使得检测灵敏度相比于传统免疫胶体金试纸条提高了 4 个数量级,检测限低至 0.01 pmol/L。同时,为了避免 AuNPs 的制备和储存难题,Ghorbanizamani P 等^[44]利用有机聚合物分子负载染料的方法代替了传统试纸条上基于 AuNPs 的信号输出策略,构建了无须扩增的 SARS-CoV-2 检测平台,在灵敏度、再现性和重复性上均超过传统胶体金检测平台。

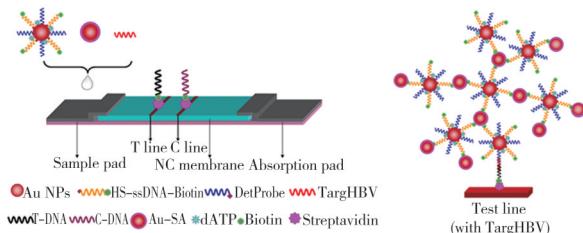
不仅如此,研究者们还将 SERS 技术广泛应用于纸基微流控领域,实现了无须核酸扩增的高效 SERS 信号输出^[45]。此外,基于磁性纳米颗粒的信号转导方法能够避免表面增强拉曼分子制备过程复杂的问题,并成功应用于癌症标志物的检测^[46],有望得到进一步应用。为了探索提升检测灵敏度的新思路,研究者们利用截流延时(图 6B)^[47]、蒸发驱动(图 6C)^[48]等手段对纸基材料本身加以改造和处理,成功提升了纸基材料本身的检测能力。如今,随着智能便携设备的广泛普及和硬件运算能力的提升,核酸检测结果均可以通过各种算法将大量的数据进行综合分析,以提升在复杂反应体系中多靶标、高通量的检测和判读能力,适应未来检测市场的发展需求^[49]。

3 挑战

纸基微流控技术自 21 世纪初研发以来取得了巨大进步,已成为临床 POCT 领域的重要组成部分。随着研究的深入,其在核酸快速检测领域的检测灵敏度、功能集成度等方面取得了较大突破;加之便携式信号分析设备开发以及机器学习等算法的引入正在逐步提高纸基微流控在核酸检测中的定量分析能力,并逐步向智能化、通用化迈进。近年来系列核酸等温扩增技术被相继开发后,核酸扩增摆脱了梯度温控设备的限制,纸基微流控核酸检测新技术的研发中,要实现其临床转化与应用仍存在较大挑战。

3.1 纸质材料作为核酸反应基底的局限性

纸质材料凭借其良好的生物相容性和极低的制造成本早已作为一种优良的基底参与检测过程。但与如妊娠试纸条等常见的用于蛋白大分子的检测不同,核酸检测往往涉及



A. 金纳米粒子的网格状聚集以提升核酸分子

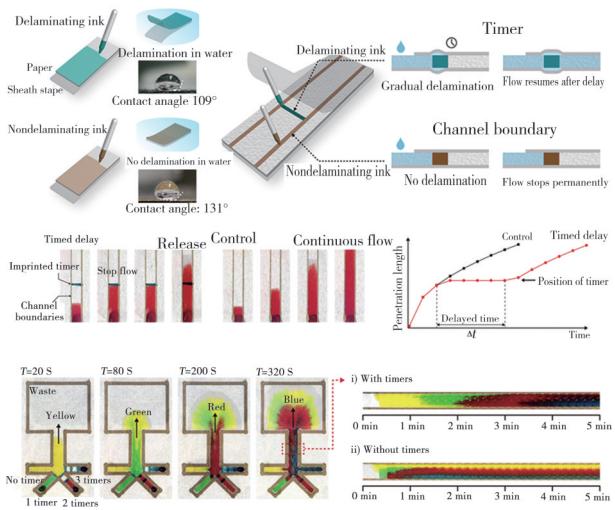
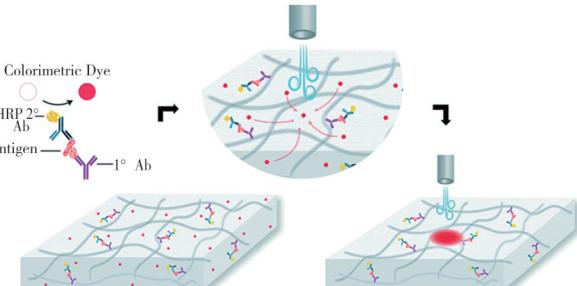
检测显色信号强度^[43]B. 基于核酸分子检测的纸基延时装置设计^[47]C. 利用气流促进纸张液体蒸发以驱动染料聚集,
用以提高蛋白或核酸检测灵敏度^[48]

图 6 其他信号放大策略用于纸基核酸检测

如试剂混合、细胞裂解、核酸纯化和浓缩等多个样本预处理步骤;并且为了避免样本的交叉污染,核酸纯化和预浓缩过程通常独立进行。利用纸张进行核酸提取和纯化与利用自动化仪器或在液相体系中进行不同,由于涉及多个处理步骤,加之常用于核酸分析的血液、组织渗出液等黏滞度大、成分复杂,要在纸基材料上按照分子量大小进行分级过滤的同时保证核酸提取效率是制约纸基微流控的一大瓶颈。

具有易于获得、无须复杂的特殊处理、兼容多种信号分子以及能够处理多种临床样本的纸质材料是用于核酸分析的理想选择。虽然目前通过将纸纤维中的羟基进行功能化修饰或调整纤维孔径,利用分子间作用力或分子筛效应能得到良好的纯化效果;但纸基表面被纤维分隔成大小不均的多个隔室,且核酸分子在纸纤维上的附着效率和均一度无法得到保证,导致纸基核酸扩增效率降低,甚至容易出现假阳性现象。3D 蜡打印技术能够在纸质材料上构建类似数字 PCR 的微反应室,这使得由靶标分子触发的扩增反应能够在相对独立的空间中进行,有望改善纸基核酸扩增和检测效率。目前通过改良纸基本身以契合核酸扩增效率的研究尚且较少,后续可加强对纸基材料的适配性研究。

3.2 传统核酸检测技术的冲击

尽管系列等温扩增技术的提出使得核酸扩增不再依赖昂贵且笨重的温控设备,并进一步与纸基微流控整合实现了便携式、快速检测。然而迄今为止纸基核酸检测技术并未取得实质性领先,纵观其原因可能包括如下几点:①纸基核酸检测技术起步较晚、发展时间不长,还未形成完备的实验室配套设备和相关质量控制体系;②纸基微流控设备的检测分辨率受到当前微加工方法的限制,无法在有限的纸基反应空间上实现高通量和精确定量;③与如实时荧光定量 PCR、生物芯片等临床实验室常用核酸检测技术相比,纸基核酸检测技术受限于有限的反应空间在灵敏度特异性等方面还存在一定差距;④纸基微流控领域的工作虽然近些年来得到了快速发展,但行业内仍缺少统一的质量监管文件,无法对所研发的纸基微流控检测设备进行有效管理,在技术规范化层面还有较大的进步空间。值得注意的是,纸基核酸检测技术能否实现突围的关键指标是检测灵敏度与特异性的提升,而对该领域界定统一的质量管理办法则能促使其更深入发展。

3.3 面向临床或复杂环境下的应用挑战

虽已开发出多种操作便捷、功能多样的纸基微流控核酸检测装置,然而其并未经过在临床或复杂环境下的大样本验证,临床检测主流仍是依赖设备完善的实验室检测。实际上,若要将实验室初步研发的纸基微流控核酸检测装置转化为真正高度可靠的检测产品,通常要求反应体系尽可能简单以提高可靠性,并且还应确保其灵敏度满足检测要求。从技术层面来看,要同时兼顾体系的简单可靠和高灵敏度两项要求是困难的,这可能需要通过开创性的工作来实现。不仅如此,用于核酸检测的纸基微流控装置在进行临床或复杂环境下的评估之前,必须在实验室进行大量的测试和改良工作,以应对真实应用场景下可能出现的各种问题。此外,将核酸检测涉及的多个样本预处理步骤集成在纸质设备中,将难以避免地提升装置的复杂程度,在此情况下如何同时方便用户使用的问题也不容忽视。

总而言之,整合多种扩增策略的纸基核酸分析技术已被广泛用于各种病原微生物和疾病标志物等的定量检测,其在便携式、多靶标、快速检测等方面展现出极大的优势与前景。然而要将纸基核酸检测技术成功转化为商业化的高度可重复诊断平台,其灵敏度、特异性、稳定性等仍需进一步提升。如何进一步加以设计和改良,充分发挥纸基微流控技术的优势,并完善系列扩增技术以满足临床诊断的要求,是未来需长久努力的方向。

参 考 文 献

- [1] Li M, Yin FF, Song L, et al. Nucleic acid tests for clinical translation[J]. Chem Rev, 2021, 121(17): 10469–10558.
- [2] Illath K, Kar S, Gupta P, et al. Microfluidic nanomaterials: from synthesis to biomedical applications[J]. Biomaterials, 2022, 280: 121247.
- [3] Zhao YX, Chen F, Li Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids[J]. Chem Rev, 2015, 115(22): 12491–12545.
- [4] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. N Engl J Med, 2020, 383(15): 1492–1494.
- [5] Gootenberg JS, Abudayeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. Science, 2018, 360(6387): 439–444.
- [6] Noviana E, Ozer T, Carrell CS, et al. Microfluidic paper-based analytical devices: from design to applications[J]. Chem Rev, 2021, 121(19): 11835–11885.
- [7] Jawla J, Kumar RR, Mendiratta SK, et al. On-site paper-based loop-mediated isothermal amplification coupled lateral flow assay for pig tissue identification targeting mitochondrial CO I gene[J]. J Food Compos Anal, 2021, 102: 104036.
- [8] Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. Nat Protoc, 2019, 14(10): 2986–3012.
- [9] Zhuang JW, Zhao ZY, Lian K, et al. SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods[J]. Biosens Bioelectron, 2022, 207: 114167.
- [10] Khalilazar S, Toldrà A, Chondrogiannis G, et al. Electroanalytical paper-based nucleic acid amplification biosensors with integrated thread electrodes[J]. Anal Chem, 2021, 93(42): 14187–14195.
- [11] Seok Y, Joung HA, Byun JY, et al. A paper-based device for performing loop-mediated isothermal amplification with real-time simultaneous detection of multiple DNA targets[J]. Theranostics, 2017, 7(8): 2220–2230.
- [12] Ahn H, Batule BS, Seok Y, et al. Single-step recombinase polymerase amplification assay based on a paper chip for simultaneous detection of multiple foodborne pathogens[J]. Anal Chem, 2018, 90(17): 10211–10216.
- [13] Qin XX, Liu JJ, Zhang Z, et al. Microfluidic paper-based chips in rapid detection: current status, challenges, and perspectives[J]. Trac Trends Anal Chem, 2021, 143: 116371.
- [14] Pollock NR, Rolland JP, Kumar S, et al. A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(152): 152ra129.
- [15] Clarke OJR, Goodall BL, Hui HP, et al. Development of a SERS-based rapid vertical flow assay for point-of-care diagnostics[J]. Anal Chem, 2017, 89(3): 1405–1410.

- [16] McConnell WW, Davis C, Sabir SR, et al. Paper microfluidic implementation of loop mediated isothermal amplification for early diagnosis of hepatitis C virus[J]. *Nat Commun*, 2021, 12:6994.
- [17] Bakthavatsalam P, Longatte G, Jensen SO, et al. Locked nucleic acid molecular beacon for multiplex detection of loop mediated isothermal amplification[J]. *Sens Actuat B Chem*, 2018, 268:255–263.
- [18] Song X, Coulter FJ, Yang M, et al. A lyophilized colorimetric RT-LAMP test kit for rapid, low-cost, at-home molecular testing of SARS-CoV-2 and other pathogens[J]. *Sci Rep*, 2022, 12:7043.
- [19] Li JJ, Zhai LG, Bie XM, et al. A novel visual loop-mediated isothermal amplification assay targeting gene 62181533 for the detection of *Salmonella* spp. in foods[J]. *Food Control*, 2016, 60:230–236.
- [20] Kaarj K, Akarapipad P, Yoon JY. Simpler, faster, and sensitive zika virus assay using smartphone detection of loop-mediated isothermal amplification on paper microfluidic chips[J]. *Sci Rep*, 2018, 8:12438.
- [21] Saengsawang N, Ruang-Areerate T, Kesakomol P, et al. Development of a fluorescent distance-based paper device using loop-mediated isothermal amplification to detect *Escherichia coli* in urine[J]. *Analyst*, 2021, 145(24):8077–8086.
- [22] Choopara I, Suea-Ngam A, Teethaisong Y, et al. Fluorometric paper-based, loop-mediated isothermal amplification devices for quantitative point-of-care detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *ACS Sens*, 2021, 6(3):742–751.
- [23] Reboud J, Xu GL, Garrett A, et al. Paper-based microfluidics for DNA diagnostics of malaria in low resource underserved rural communities[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(11):4834–4842.
- [24] Cai S, Jung C, Bhadra S, et al. Phosphorothioated primers lead to loop-mediated isothermal amplification at low temperatures[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(14):8290–8294.
- [25] Tang YD, Qi LJ, Liu YC, et al. CLIPON: a CRISPR-enabled strategy that turns commercial pregnancy test strips into general point-of-need test devices[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61(12):e202115907.
- [26] Nybond S, Réu P, Rhedin S, et al. Adenoviral detection by recombinase polymerase amplification and vertical flow paper microarray[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(4):813–822.
- [27] Cherkaoui D, Huang D, Miller BS, et al. Harnessing recombinase polymerase amplification for rapid multi-gene detection of SARS-CoV-2 in resource-limited settings[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 189:113328.
- [28] Zhou L, Wang Y, Yang C, et al. A label-free electrochemical biosensor for microRNAs detection based on DNA nanomaterial by coupling with Y-shaped DNA structure and non-linear hybridization chain reaction[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 126:657–663.
- [29] Ying N, Ju CJ, Li ZY, et al. Visual detection of nucleic acids based on lateral flow biosensor and hybridization chain reaction amplification[J]. *Talanta*, 2017, 164:432–438.
- [30] Kaewarsa P, Vilaivan T, Laiwattanapaisal W. An origami paper-based peptide nucleic acid device coupled with label-free DNazyme probe hybridization chain reaction for prostate cancer molecular screening test[J]. *Anal Chimica Acta*, 2021, 1186:339130.
- [31] Chen WW, Fang XE, Li H, et al. DNA-mediated inhibition of peroxidase-like activities on platinum nanoparticles for simple and rapid colorimetric detection of nucleic acids[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94:169–175.
- [32] Chen PP, Bai YJ, Tang SY, et al. Homogeneous binary visual and fluorescence detection of tetanus toxoid in clinical samples based on enzyme-free parallel hybrid chain reaction[J]. *Nano Lett*, 2022, 22(4):1710–1717.
- [33] Lv X, Huang YM, Liu DF, et al. Multicolor and ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on the fluorescence hybrid chain reaction for simultaneous detection of pathogens[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(33):9390–9398.
- [34] Zhang DG, Wu C, Luan CX, et al. Distance-based quantification of miRNA-21 by the coffee-ring effect using paper devices[J]. *Microchim Acta*, 2020, 187(9):513.
- [35] Choi JR, Yong KW, Tang RH, et al. Lateral flow assay based on paper-hydrogel hybrid material for sensitive point-of-care detection of dengue virus[J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6 (1) : 10.1002/adhm.201600920.
- [36] Yin P, Choi HMT, Calvert CR, et al. Programming biomolecular self-assembly pathways[J]. *Nature*, 2008, 451(7176):318–322.
- [37] Hu JM, Sheng Y, Kwak KJ, et al. A signal-amplifiable biochip quantifies extracellular vesicle-associated RNAs for early cancer detection[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:1683.
- [38] Li HX, Warden AR, Su WQ, et al. Highly sensitive and portable mRNA detection platform for early cancer detection[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1):287.
- [39] Su FY, Zou MY, Wu HN, et al. Sensitive detection of hepatitis C virus using a catalytic hairpin assembly coupled with a lateral flow immunoassay test strip[J]. *Talanta*, 2022, 239:123122.
- [40] Deng HP, Liu QW, Wang X, et al. Quantum dots-labeled strip biosensor for rapid and sensitive detection of microRNA based on target-recycled nonenzymatic amplification strategy[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87:931–940.
- [41] Wang WJ, Nie AX, Lu ZC, et al. Catalytic hairpin assembly-assisted lateral flow assay for visual determination of microRNA-21 using gold nanoparticles[J]. *Microchim Acta*, 2019, 186(9):661.
- [42] Mao Y, Sun Y, Xue J, et al. Ultra-sensitive and high efficiency detection of multiple non-small cell lung cancer-related miRNAs on a single test line in catalytic hairpin assembly-based SERS-LFA strip[J]. *Anal Chimica Acta*, 2021, 1178:338800.
- [43] Gao Y, Deng XL, Wen W, et al. Ultrasensitive paper based nucleic acid detection realized by three-dimensional DNA-AuNPs network amplification[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 92:529–535.
- [44] Ghorbanizamani F, Tok K, Moulahoum H, et al. Dye-loaded polymersome-based lateral flow assay: rational design of a COVID-19 testing platform by repurposing SARS-CoV-2 antibody cocktail and antigens obtained from positive human samples[J]. *ACS Sens*, 2021, 6(8):2988–2997.
- [45] Liu XN, Zhang C, Liu KW, et al. Multiple SNPs detection based on lateral flow assay for phenylketonuria diagnostic[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(5):3430–3436.
- [46] Liu FM, Zhang HL, Wu ZH, et al. Highly sensitive and selective lateral flow immunoassay based on magnetic nanoparticles for quantitative detection of carcinoembryonic antigen[J]. *Talanta*, 2016, 161:205–210.
- [47] Lee D, Ozkaya-Ahmadov T, Chu CH, et al. Capillary flow control in lateral flow assays via delaminating timers[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(40):eabf9833.
- [48] Wang E, Guo ZL, Tang R, et al. Using airflow-driven, evaporative gradients to improve sensitivity and fluid control in colorimetric paper-based assays[J]. *Lab Chip*, 2021, 21(21):4249–4261.
- [49] Zhang H, Liu RN, Li QM, et al. Flipped quick-response code enables reliable blood grouping[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(4):7649–7658.

(责任编辑:唐秋姗)