

基于微流控芯片的等温扩增技术

涂芸萍, 杨殿龙, 张中平, 董晓斌, 刘路遥, 苗桂君, 张璐璐, 邱宪波

北京化工大学 信息科学与技术学院, 北京 100029

涂芸萍, 杨殿龙, 张中平, 董晓斌, 刘路遥, 苗桂君, 张璐璐, 邱宪波. 基于微流控芯片的等温扩增技术. 生物工程学报, 2022, 38(3): 943-960.

TU YP, YANG DL, ZHANG ZP, DONG XB, LIU LY, MIAO GJ, ZHANG LL, QIU XB. Isothermal amplification technology based on microfluidic chip. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 943-960.

摘 要: 基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的核酸扩增技术是分子诊断领域的金标准, 然而 PCR 往往包含多个反应温度, 涉及长时间的循环升降温过程, 且需要在复杂热循环仪中完成, 这些都限制了其在现场即时检测 (point-of-care testing, POCT) 中的应用。与传统 PCR 相比, 等温扩增依靠恒定反应温度, 反应时间短, 检测装置简单, 能够提供更加方便、快捷的核酸检测。基于微流控技术的等温扩增检测, 通过兼顾微流控与等温扩增两者的优势, 能够为 POCT 分子诊断提供更具竞争力的平台。例如, 在新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 疫情防控中, 多种形式的 POCT 等温扩增检测展示了其独特优势。文中首先归纳总结了典型的等温扩增技术及其检测方法, 然后对不同类型的等温扩增微流控系统进行了分类总结与分析 (如功能定位、结构组成、流体控制、系统特点等), 最后总结了等温扩增微流控系统在新冠病毒 (SARS-CoV-2) 等不同病原体检测领域中的应用, 并对等温扩增与 CRISPR 基因编辑等其他新型技术的相互结合进行了介绍与展望。

关键词: 分子诊断; 等温扩增; 微流控芯片; 现场即时检测; 新型冠状病毒肺炎; 新冠病毒; 人乳头状瘤病毒

Received: July 15, 2021; Accepted: September 15, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81871505)

Corresponding author: QIU Xianbo. Tel: +86-10-64413467; E-mail: xbqiu@mail.buct.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (81871505)

Isothermal amplification technology based on microfluidic chip

TU Yunping, YANG Dianlong, ZHANG Zhongping, DONG Xiaobin, LIU Luyao, MIAO Guijun, ZHANG Lulu, QIU Xianbo

College of Information Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: Polymerase chain reaction (PCR) is the gold standard for nucleic acid amplification in molecular diagnostics. The PCR includes multiple reaction stages (denaturation, annealing, and extension), and a complicated thermalcycler is required to repetitively provide different temperatures for different stages for 30–40 cycles within at least 1–2 hours. Due to the complicated devices and the long amplification time, it is difficult to adopt conventional PCR in point-of-care testing (POCT). Comparing to conventional PCR, isothermal amplification is able to provide a much faster and more convenient nucleic acid detection because of highly efficient amplification at a constant reaction temperature provided by a simple heating device. When isothermal amplification is combined with microfluidics, a more competent platform for POCT can be established. For example, various diagnosis devices based on isothermal amplification have been used to rapidly and conveniently detect SARS-CoV-2 viruses. This review summarized the recent development and applications of the microfluidics-based isothermal amplification. First, different typical isothermal amplification methods and related detection methods have been introduced. Subsequently, different types of microfluidic systems with isothermal amplification were discussed based on their characteristics, for example, functionality, system structure, flow control, and operation principles. Furthermore, detection of pathogens (e.g. SARS-CoV-2 viruses) based on isothermal amplification was introduced. Finally, the combination of isothermal amplification with other new technologies, e.g. CRISPR, has been introduced as well.

Keywords: molecular diagnosis; isothermal amplification; microfluidic chip; point-of-care testing (POCT); COVID-19; SARS-CoV-2; HPV

作为分子诊断的重要手段，灵敏度高、特异性强的核酸检测，能够为病原体的检测和诊断提供精准信息，一直是传染病检测的金标准之一。自1985年发明以来，作为核酸检测的核心技术之一，聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 在病原体检测、生命科学、动物疫病防控和食品安全检测等各类分子诊断领域发挥了极其重要的作用。然而，由于受到设备复杂度高、检测时间长、检测成本高、对专业化实验室依赖性强等影响，PCR检测往往

需要在中心实验室完成，难以在基层检验机构等各类现场即时检测环境中进行广泛推广。

为了进一步提高核酸检测水平，实现更加方便、快捷的核酸检测，各类等温扩增技术正日益受到大家的关注，其应用范围不断拓展。一方面，等温扩增一般借助恒温反应模式来实现核酸扩增，由此显著降低了装置复杂度；另一方面，等温扩增通过多个反应酶的相互作用来引导核酸扩增，省略了PCR的反复升降温过程，由此显著缩短了核酸检测时间^[1-2]。因此，

与 PCR 相比, 等温扩增在装置简单性、检测快速性、操作便捷性及成本低廉性等方面, 具有若干显著优势, 尤其适合于现场即时核酸检测。

作为一种新型技术平台, 微流控芯片借助其内部集成的微阀、微泵、微反应器、微通道等各类功能单元构成的微流体网络, 能够自动完成检测样品的预处理、富集、反应、标记和检测等多个反应步骤, 一方面, 有利于实现“样品入-结果出”封闭式自动化检测, 显著提高检测效率; 另一方面, 有利于实现高通量、并行、乃至多靶标多重检测, 显著提升了整体检测水平。各类基于微流控芯片的新型检测方法, 如核酸检测微流控系统、免疫检测微流控系统及单细胞分析微流控系统等正不断涌现^[3]。通过将各类检测分析方法与微流控芯片相互结合, 有利于进一步提升其综合检测性能与水平。

近年来, 基于微流控芯片的新型等温扩增检测技术正成为核酸检测的一个研究焦点。借助微流控芯片在流体驱动, 检测过程自动化操作等方面的显著优势, 能够进一步提升微流控芯片平台上, 等温扩增检测的综合性能, 实现功能更强大、效率更高、操作更加方便和检测灵敏度更高的核酸检测。例如, 基于离心微流控平台, 借助其流水线式的流体驱动能力, 有利于实现带样品处理的“样品入-结果出”一体化核酸检测^[4], 通过核酸检测过程的全自动化, 进一步缩短核酸检测的总时间(核酸提取+核酸扩增), 进一步提升等温扩增在检测时间方面的优势, 这对于新型冠状病毒肺炎等重大传染病的现场及时检测及实时疫情防控, 具有重要的现实意义。另外, 基于微流控平台, 实现高通量, 或者多靶标多重等温扩增检测, 有利于进一步提升等温扩增在现场及时检测中的应用领域。

本文首先对当前的典型等温扩增技术进行

了总结, 在此基础上, 介绍了能够应用于等温扩增的常规检测方法。然后, 针对当前等温扩增与微流控芯片相互结合的特点, 对数个大方向上的典型等温扩增微流控系统进行了分类总结与特征分析(如功能定位、结构组成、流体控制、系统特点等)。其次, 对等温扩增微流控系统在不同病原体检测领域, 例如新冠病毒 SARS-CoV-2 检测及其他病原体检测中的应用进行了展开描述。最后, 对等温扩增与其他新型技术, 如与 CRISPR 基因编辑技术的相互结合, 进行了相关介绍与展望。

1 等温扩增技术

1.1 典型等温扩增方法

作为核酸扩增的最主要方法, PCR 反应由于涉及多步的变温反应步骤, 需要在复杂的热循环仪中完成。而且, 由于各步变温之间的过渡过程, 30–40 个周期的 PCR 核酸扩增往往至少需要 1–2 h, 甚至是更长时间。因此, 受到扩增设备复杂且成本高, 反应条件高且扩增时间长等因素影响, 基于 PCR 的核酸检测往往需要在中心实验室完成。与 PCR 不同, 基于等温扩增的核酸检测由于能够在恒定温度下, 快速完成扩增, 因此, 在装置简便性及检测快速性等方面, 均展示出显著的优势, 为现场快速核酸检测提供了一个可能的解决方案。

根据反应原理不同, 等温扩增技术可以分成多种不同类型, 且各自具有不同的优缺点。以第一步反应, 依赖于特异性引物延伸, 或者依赖于限制性内切酶, 可将等温扩增反应分为两大类^[5]。第一类方法依赖于特异性引物延伸, 一方面, 可以采用类似于 PCR 的方法, 使用特异性引物退火延伸作为反应的启动步骤, 例如: 依赖核酸序列等温扩增 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)^[6]、环介

导核酸扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[7-8]、交叉引物技术 (cross priming amplification, CPA)^[9]、滚环扩增技术 (rolling circle amplification, RCA)^[10]; 另一方面, 也可以引入 DNA 解旋酶和单链结合蛋白, 避免高温热变性, 例如重组酶介导扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA)^[3]、依赖解旋酶的扩增技术 (helicase-dependent amplification, HDA)^[11] 及转录介导的扩增 (transcription mediated amplification, TMA)^[12] 等。

第二类方法依赖于限制性内切酶, 借助切刻内切酶识别特异性核酸序列, 在序列内部或首尾处发生单链切割, 为核酸序列扩增做准备, 例如链置换扩增 (strand displacement amplification, SDA)^[13]、切刻内切酶介导扩增 (niking enzyme amplification reaction, NEAR)^[14] 等。

1.2 等温扩增检测方法

在核酸扩增反应过程中, 实时监测扩增结果或在反应终点检测扩增结果, 由此获取了检测结果, 为进一步分析检测结果打下了基础。常用等温扩增的检测方法有实时荧光法^[15]、免疫试纸条法^[16]、比色法^[17]和浊度法^[18]等。

实时荧光检测通过在核酸扩增过程中, 动态监测与核酸产物浓度相关的荧光物质信号强度来实现实时检测。实时荧光检测可以通过普通的荧光染料或荧光探针来实现, 后者具有特异性高的优势。荧光检测往往被整合到加热仪器中, 构成了实时等温扩增系统。

侧向流纸条法在扩增过程中, 对扩增产物进行特异性标记, 在纸条层析过程中, 带标记的核酸扩增产物与测试线 (T 线) 上的互补性标物相结合, 再结合胶体金纸条的显色反应, 由此实现了核酸扩增产物的现场快速检测。Wang 等^[19]提出了利用 LAMP 结合侧向流纸条快速检测筛查引起水华污染的米氏凯伦藻。

该方法对米氏凯伦藻 *K. mikimotoi* 基因组 DNA 的检测下限为 1.70×10^{-4} ng/ μ L, 比传统 PCR 检测下限低 100 倍; 对包含米氏凯伦藻 LSU rDNA 的重组质粒, 其检测下限为 6.21×10^3 copies/ μ L, 灵敏度比 LAMP 法高出 10 倍。通过模拟现场水样测试证实了该方法的可行性, 该方法具有特异性强、灵敏度高和准确性好等优点, 可用于米氏凯伦藻的现场检测。Wu 等^[20]应用多重交叉置换扩增方法 (multiple cross displacement amplification, MCDA), 在 60 min 内, 实现结核检测。该方法针对特定的 *sdaA* 基因进行鉴别, 可在 45 min 内完成 DNA 提取及扩增, 并结合侧向流纸条, 在 2 min 内完成显色层析检测。经实验验证, 该方法具有快速、简单、特异性强和灵敏度高等优点。

比色法和浊度法都是利用核酸扩增反应中的焦磷酸根来进行扩增产物的间接检测。比色法中最常用的是钙黄绿素法。钙黄绿素本身可以发出绿色荧光, 当溶液中同时加入锰离子和钙黄绿素时, 由于 2 种物质结合而不显示荧光, 随着扩增反应进行, 不断产生的焦磷酸根会与锰离子结合, 从而导致钙黄绿素脱离锰离子而使溶液显示出绿色荧光。浊度法利用核酸扩增反应中产生的焦磷酸根与镁离子结合产生焦磷酸镁沉淀, 通过沉淀产物的浓度来间接检测核酸扩增产物。Zasada 等^[21]提出了一种将 LAMP 与比色法、侧向流试纸条相互结合, 检测白喉棒状杆菌的方法。研究了用于诊断白喉、非毒素性白喉棒状杆菌感染的 LAMP 检测试剂盒, 并研究了用于检测结果可视化的 LAMP 比色检测方法。基于比色法, 使用羟基萘酚蓝、钙黄绿素等成功检测出低浓度的白喉棒状杆菌阳性样本。

实时荧光检测、浊度法及比色法的一个共同优点, 即无需“开盖”, 允许进行“One-Pot”反

应,这对于防止样本间污染,乃至防止扩增样品对于环境的污染,降低气溶胶污染的风险,都具有非常重要的意义。

2 等温扩增微流控芯片

基于微流控芯片的一体化核酸检测与分析方法,为疾病检测、食品安全和环境监测等领域提供了一种方便、快速、低成本且高效的检测方法^[22]。随着新冠疫情的发展,POCT成为行业焦点,为了满足各种临床检测需求,各种不同类型的微流控芯片正不断涌现。本文针对代表性的等温扩增微流控芯片,根据其芯片特征及功能定位,将其分成如下6个大类:离心式等温扩增微流控芯片、多指标联检等温扩增微流控芯片、高通量等温扩增微流控芯片、一体化等温扩增微流控芯片、巢式等温扩增微流控芯片和液滴等温扩增微流控芯片。

2.1 离心式等温扩增微流控芯片

离心式微流控芯片(lab-on-disk)是一种借助离心力驱动来实现芯片上流体驱动的自动化检测平台。借助芯片在微电机带动下做圆周运动时所产生的离心力作为流体的驱动力,通过改变芯片旋转速度和调整通道构型,由此可以调节和控制流体的流向与流速。传统的lab-on-chip芯片平台,在检测通量、系统灵活度及主动式流体驱动等方面,往往容易受到自身结构的局限。Lab-on-disk芯片平台,借助方便的离心力来实现主动式流体驱动,而且由于disk结构及离心力作用的对称性,往往容易实现高通量、并行检测,且系统灵活度显著提升,这些都为实现高集成度、多指标并行检测的一体化微流控系统打下了坚实的基础。

Rhaneuf等提出了一个高灵敏度的免疫分析和等温扩增的离心微流控平台^[23]。如图1A所示,带有双入口的一次性离心式芯片与电机

控制系统相结合,通过非接触式红外加热系统对芯片进行加热,9个LAMP扩增腔与9个免疫反应腔相互配合,在不到1h内,就可以从低浓度下临床样品检测出毒素和细菌。Choi等提出了一种带有实时荧光检测和一次性离心式芯片的便携式分析仪,该芯片包含4个并行的检测单元,可以在50min内检测分析4个样本^[24]。在资源匮乏的环境中,如供电可能在不稳定的情况下,为了确保疾病检测的正常进行,可以通过手动操作来代替电机,给离心芯片提供离心力,由此实现流体驱动。如图1B所示,该离心式微流控芯片通过定制的手动式离心支架,手工提供离心力来驱动圆盘的高速旋转,从而有效完成了各类流体驱动的相关操作,借助8组检测单元,实现“样本进-结果出”高通量并行检测^[25]。对于食源性病原体检测,Seo等在离心式微流控系统上,基于比色法,实现了高通量检测。该离心微流控系统由样品腔、样品注入微通道、交叉毛细管和单个芯片组成,可在1h内,同时完成24种病原体扩增与检测^[26]。Heo等提出了一种新型离心微流控芯片系统^[27],该芯片可对TP53基因的突变位点进行单核苷酸多态性SNP分型检测,通过实时RCA扩增来检测与肿瘤预测相关的5个突变基因,为生物学医学诊断领域提供了一个简单、便携,且能够实现多重检测的分析平台。如图1C所示,Liu等提出了一种结合离心式微流控芯片的一体化便携式分析仪(151mm×134mm×110mm),该离心式芯片由试剂腔、裂解腔、过滤腔、废液腔、混合腔和反应腔组成,通过电机提供的离心力自动完成一系列反应操作,可在70min内完成5种细菌的高通量检测^[28]。

离心式微流控芯片,无需外界驱动泵,借助离心力即可完成复杂多步的流体驱动,基于离心平台,避免了传统微流控芯片中微阀、微

泵模块集成,降低了芯片复杂度。尤其是,借助离心力物理分布的均衡性与对称性,有利于构建多指标、高通量及一体化核酸分析平台。其不足之处在于,离心式微流控系统受到封闭式芯片结构和单一离心式流动驱动方式的制约,自身难以实现高复杂度、多功能性的反应过程。

2.2 多重、高通量等温扩增微流控芯片

多重或者多指标联检技术,是指通过一次等温扩增反应同时对多个靶标进行扩增,并结合检测技术对扩增产物进行检测,从而实现多靶标并行检测分析,可用于多种病原微生物鉴定、遗传病及癌症基因的分型鉴定。相对于单一目标检测,多靶标联检有利于缩短检测时间、降低成本及提高检测效率。例如宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,医学研究表明人乳头状瘤病毒(HPV)与宫颈癌的发生密切相关,99%的宫颈癌都是由其导致,但持续感染高风险 HPV

病毒才可能发展为宫颈癌。高危致病率的 HPV 亚型大约有 13 种^[29],能检测并有效筛查出具有高致病率的 HPV 亚型,对于宫颈癌的预防与药物治疗会起到决定性的作用。因此,多指标联检核酸检测设备在某些特定应用场合下,具有重要的现实意义^[30-31]。

纸基材料价格便宜,制造工艺简单、生物相容性好,其多孔结构具有毛细运输、过滤、试纸储存、样本浓缩等功能^[32],纸基微流控芯片对设备依赖性小,符合 POCT 的检测场景需求。如图 2A 所示,该纸基杂交微流控芯片集成了片上裂解,与 LAMP 技术相结合,实现 3 种病原体的并行检测,通过观察荧光信号的强弱来实现阴性与阳性样本的判读。基于纸基检测平台,简化了流体控制,降低了配套装置的复杂度,而且,最终获取了理想的检测效率及灵敏度^[33]。一种基于 LAMP 技术的离心式微流

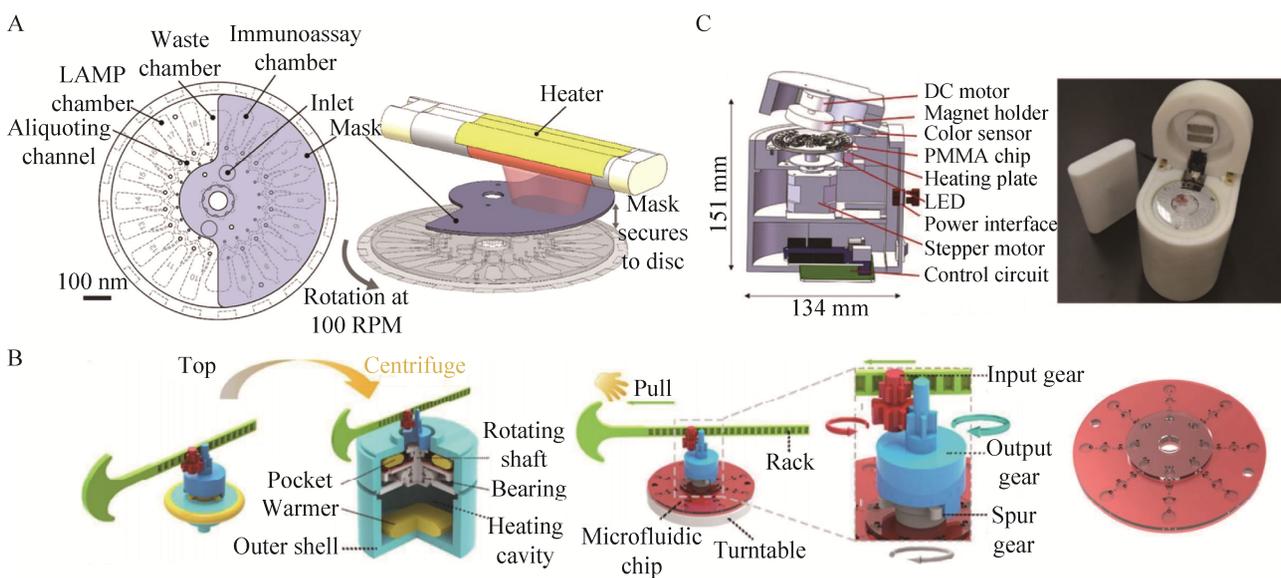


图 1 离心式微流控系统

Figure 1 Centrifugal microfluidic system. (A) Dual-inlet microfluidic disc chip, LAMP chamber and immunoassay chamber are positioned in mirror, and the heating mask in middle prevents infrared radiation from overheating the immunoassay chambers^[23]. (B) Schematic view of the hand-powered centrifuge for LAMP detection^[25]. (C) Schematic design of the analyzer for the LAMP disk chip^[28].

控系统,借助智能手机自带的摄像头、信号输入接口以及信号处理与显示功能,在一个芯片上设计了6个相同的检测通道,同时实现流体驱动、试剂定量、扩增和检测等若干反应步骤。采用简单的 Calcein 染料比色检测方法,能够同时对来自3种食源性病原体的样品进行30组基因分析^[34]。此外, Xie 等设计了一种无需外部驱动,借助反应腔和真空腔之间的压差,实现流体自驱动的多路微流控芯片,如图2B所示,该芯片尺寸为39 mm(长)×25 mm(宽)×6 mm(高),通过 LAMP 技术实现对 HBV、HCV 和 HIV 多种病毒的多重扩增,并使用比色法对扩增产物进行了检测^[35]。

随着2020年全球新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的暴发,高感染性、高致病性、新冠病毒(SARS-CoV-2)对全球公共卫生及公共安全带来极大的威胁。Xiong 等成功开发了一种便携式离心式微流体平台,用于快速、准确地对 SARS-CoV-2 及其他4类人类冠状病毒进行同时扩增与检测^[36]。该平台集成了 LAMP 等温技术,可在40 min内提供宽动态范围的检测结果。如图2C所示, Chen 等^[37]研究了一种预先存储反应试剂的 PDMS 芯片,可同时检测4种不同细菌。通过琼脂糖凝胶溶液预加载多通道 LAMP 试剂,并通过凝胶内的 LAMP 反应扩增并检测病原细菌 DNA,检测灵敏度达到3 拷贝/ μL 。此外,有研究者将细菌裂解、核酸提取、HDA 扩增和荧光检测集成到一次性聚合物材料的微流控检测盒中^[38],将基于固相萃取法的细菌 DNA 提取和 HDA 等温扩增相互集成,可在50 min内实现肉汤培养基中多个大肠杆菌菌落的检测,其检测下限可低至10 CFU。

高通量检测是指同时对多个样品进行并行

检测,借助多个独立的反应单元,实现对多个待测样品的并行分析。在临床检测或生命科学分析中,借助高通量检测模式,一次可以对数个、数十个乃至数百个样本进行并行处理,实现检测分析,由此显著提高了检测效率。在多重检测基础上,通过在芯片中设置多组并行检测单元,由此实现高通量、多重联检。

基于 LAMP 的微型设备的使用可以替代传统 PCR 方法,以检测食品样本中的病原体。Jin 等研究了一种基于 PMMA 的快速检测食源性细菌病原体的高通量微流控芯片,该芯片采用真空泵作为动力源把反应液引入微井阵列^[39],如图2D所示,能够实现针对24个靶标的同时检测。Oh 等研究了一种离心式微流控芯片来检测4种与食品安全相关的细菌;该芯片包含24个高通量反应腔,基于 LAMP 等温扩增,能够在1 h内,同时实现24个靶标扩增,并采用比色法显示检测结果^[40]。Zhao 等提出了一个集成,基于膜法的核酸提取,核酸定量扩增(Q-NASBA)的24通道高通量微流控系统^[41],用于水生微生物检测,能够同时定量检测多种微生物,实现对环境水质的监测。传统疟疾感染的诊断方法,检测通量低、检测时间长,不利于疟疾诊疗。基于 LAMP 等温扩增方法,借助微流控芯片,针对疟疾检测,可以构建针对多个靶基因的多重检测微流控芯片^[42];如图2E所示,该芯片包含了8个反应腔(含2个阴性对照),能够同时对6种疟疾靶标基因进行检测。Yang 等研究了一种针对腹泻大肠杆菌,基于 circular fluorescent probe-mediated isothermal nucleic acid amplification 的便携式微流控装置,用于准确、快速地检测5种腹泻大肠杆菌的12个毒性基因。该微流控系统可在60 min内,同时检测8个样品^[43]。

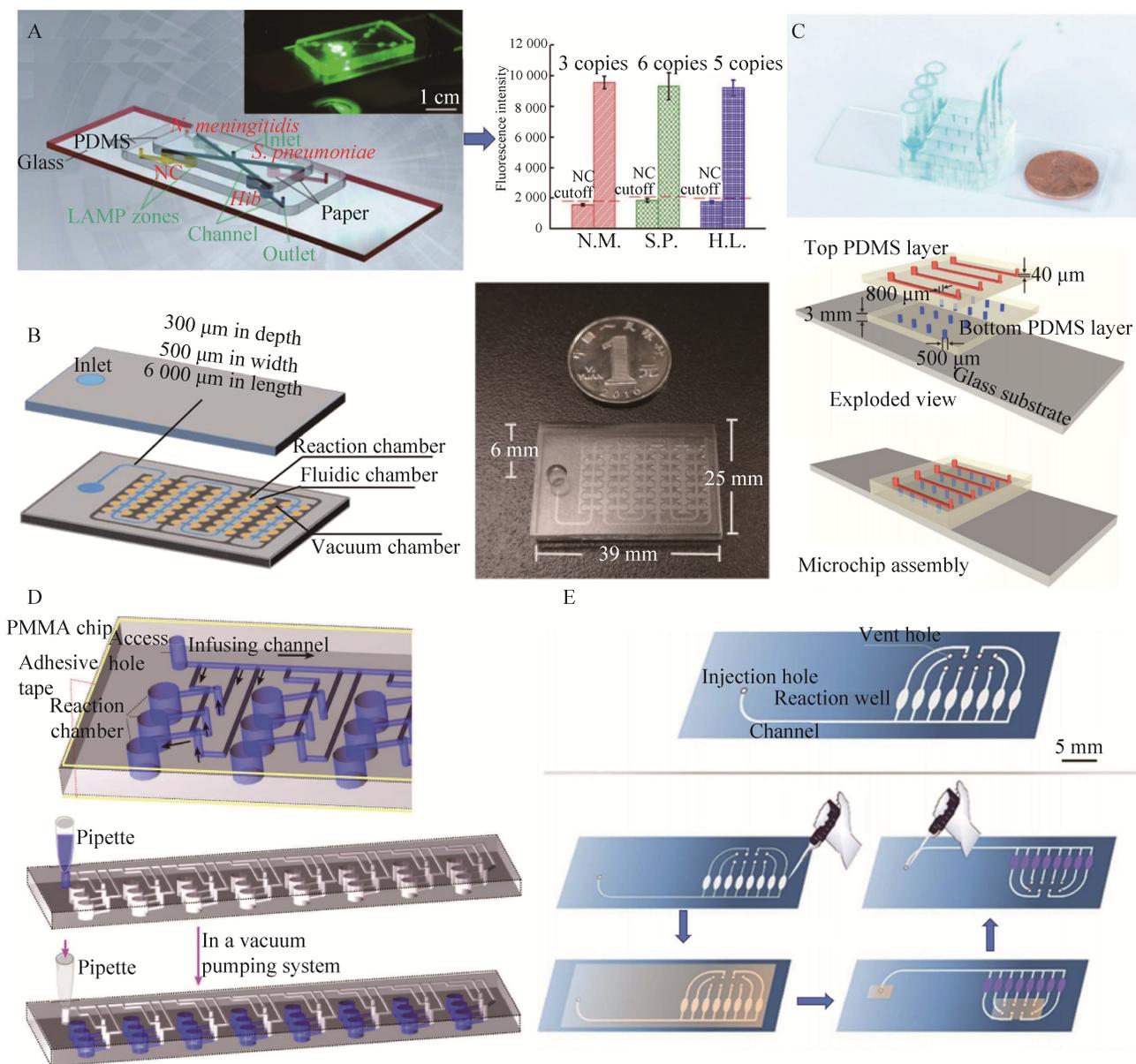


图 2 多重、高通量等温扩增芯片

Figure 2 Multiplexed, high-throughput microfluidic chips. (A) Schematic view of PDMS/paper hybrid LAMP microfluidic biochip for multiplexed diagnosis based on fluorescence detection^[33]. (B) Self-driven LAMP microfluidic chip with multiple-chambers (reaction chamber) and a vacuum chamber^[35]. (C) Schematic view of PDMS/glass hybrid gLAMP microfluidic chip for isothermal amplification^[37]. (D) Schematic structure of self-priming multiplex LAMP chip, containing an inlet hole, infusing channels and reaction chambers, where LAMP mixture is sucked into the infusing channels and compartmentalized into each chambers^[39]. (E) Schematic diagram of LAMP chip and its operation^[42].

高通量微流控芯片允许对多个样本进行并行检测，在此基础上，对单个样本中的多个靶标进行同时检测分析，由此实现针对多个样本

的高通量、多靶标联合检测，进一步提高疾病检测与分析的效率。其不足之处在于，由于受到离心式微流控芯片的物理限制，而且系统工

作在封闭环境下，功能可扩展性较差，其检测通量个数有限，例如，难以实现 50 个以上乃至上百个样品的高通量或者多重检测。

2.3 “样品进-结果出”集成式等温扩增芯片

基于核酸检测的分子诊断，其主要反应步骤包括：样本裂解、核酸提取和扩增及检测，由于整个反应过程的烦琐性，样品处理与核酸扩增及检测的相互整合，一直是核酸检测领域的研究重点与难点。传统的核酸检测过程，样品处理与核酸提取往往通过手工操作或者半自动化仪器完成。提取得到的核酸模板，再手工转移到扩增仪器中进行扩增与检测。涉及人工操作的分步式半自动操作模式，一方面，难以提升检测效率，容易导致操作失误；另一方面，

为了克服气溶胶可能导致的假阳性问题，往往需要相互独立的核酸提取室与核酸扩增室，对检测可靠性提出了较高的环境要求。因此，将核酸提取与核酸扩增进行相互集成，借助一体化核酸检测卡或者检测盒、核酸检测微流控芯片等方式，实现了全封闭环境下全自动化的核酸检测，由此，避免了手工操作，显著提升了检测效率，克服了气溶胶污染问题，降低了核酸诊断装置成本与检测成本，有利于实现各类不同应用场景下的 POCT 现场快速检测。

基于等温扩增的一体化集成核酸检测微流控系统，近年来一直得到大家的密切关注。如图 3A 所示，8 个毛细管采集样品后，首先，自动完成样品处理，随后，进行等温扩增及结

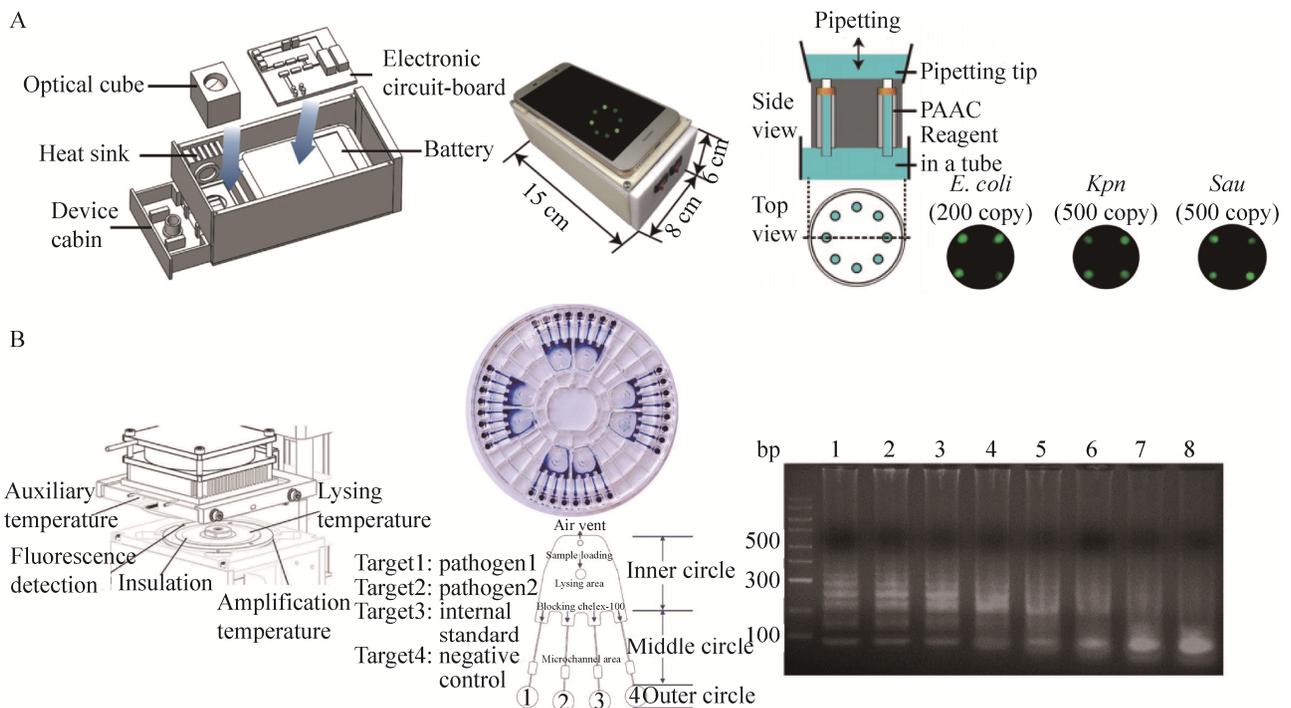


图 3 “样品进-结果出”集成式等温扩增芯片

Figure 3 “Sample in-result out” integrated isothermal amplification chip. (A) LAMP-based isothermal amplification system with sample processing, including: an integrated device, a smartphone module, a liquid-handling module with pipette tips, and fluorescence detection results^[44]. (B) LAMP-based centrifugal microfluidic disk system with the capacity of nucleic acid extraction, including: an actuation device, a microfluidic chip with multiple chambers, and electrophoresis result of amplicons^[45].

果检测^[44]，该便携式检测装置通过智能手机实现了 LAMP 温度调节与荧光检测。借助智能手机的相机，获取 LAMP 反应过程的荧光图像，并借助智能手机上的应用程序进行检测结果分析。如图 3B 所示，Ye 等提出一种一体化微流控核酸诊断系统，可同时检测沙眼衣原体、生殖泌尿膜分泌物、淋病人支原体和泌尿原体 4 种病原体^[45]。单个微流控芯片上集成了核酸提取、等温扩增及电泳分离等功能，可以同时进行 8 个芯片单元的并行检测，从样品处理到获得检测结果的总时间在 50 min 内。Gulliksen 等^[46]提出了一种集成细胞裂解、核酸提取、纯化、及实时 NASBA 扩增与检测的样本进-结果出检测平台，可以实现宫颈癌肿瘤诊断，实验结果表明，其关键性能优于 HPV 行业检测标准。Liu 等研究了一种新型阀控离心式微流控平台^[47]，这种集成的阀膜可用于与样品预处理相关的复杂流体控制。该离心式平台可自动完成 RNA 提取和纯化、RT-LAMP 扩增与实时荧光检测，通过一体化、自动化核酸分析，缩短了检测时间，简化了检测过程。快速、灵敏的细菌检测是治疗败血症、肺结核、膀胱炎及肾炎等疾病的重要诊断手段，在离心式微流控芯片上，将 DNA 核酸提取，RPA 等温扩增及荧光检测等多个反应步骤进行集成^[48]，由此，构建一体化、高通量的核酸分析系统，其中，每个单元都包括细胞裂解腔、储液腔、定量腔、混合腔、毛细阀等结构功能模块，能够在 40 min 内，完成对原始细菌样品的核酸检测。

立足于微流控芯片的“样品进-结果出”一体化检测，能够自动、连续实现从样本处理，包括细胞裂解、核酸提取及纯化，到核酸扩增与检测的整个核酸分析过程，由此，显著减少了人工操作、提高了检测效率、避免样品操作及转移过程中的交叉污染及环境污染、降低了

对核酸检测分析实验室的环境要求，有利于进一步降低核酸检测成本，实现 POCT 现场快速核酸检测。其不足之处在于，受到芯片上试剂存储有效时长的影响，芯片能够稳定工作的使用寿命往往有限；而且，芯片上的试剂存储与快速释放等功能会显著增加芯片的复杂度（设计复杂度、加工制造的复杂度），由此提升了芯片的检测成本，不利于芯片的推广与应用。

2.4 巢式等温扩增微流控芯片

与巢式 PCR 类似，基于微流控芯片的巢式等温扩增，其基本原理是在微流控芯片上，集成多步（例如两步）等温扩增反应，其中第一步等温扩增为预扩增，为第二步等温扩增提供扩增模板，由此，通过两步等温扩增，实现高灵敏度等温扩增检测。另外，也可以通过巢式等温扩增实现多重检测，例如，在第一步预扩增状态下，对多个病原体靶基因进行并行扩增，第二步等温扩增利用第一步等温扩增得到的模板，进行物理上分离的多通道多重独立扩增，由此实现了直观的多重检测。

为了提高检测灵敏度，Song 等^[49]提出了一种包括两步等温扩增的巢式等温扩增芯片，能够在 40 min 内完成两步扩增，称为快速扩增 (RAMP)。如图 4A, 4B 所示，RAMP 第一步扩增在 RPA 反应腔中，借助多条扩增引物，同时针对多个病原体进行 RPA 核酸扩增，随后，将第一个阶段的扩增模板导入到第二步扩增的 LAMP 反应腔，进行针对单一特定靶基因的 LAMP 扩增。最终的 LAMP 扩增产物，可以通过浓度比色法或荧光染料法，在芯片内实现。该 RAMP 微流控芯片，将低温 RPA 等温扩增与高温 LAMP 等扩增相互结合，一方面，通过对原始样品直接进行多靶标并行 RPA 扩增，最大化利用了原始核酸模板，有利于获取理想的检测灵敏度；另一方面，借助第二步基于多个独

立反应腔室的 LAMP 扩增, 实现了不受荧光检测波长物理限制的多重检测。此外, 通过集成两步、不同的等温扩增方法, 有利于提升整体的检测灵敏度与特异性。

2019 年, 针对新型冠状病毒 E1-Tholoth 等^[50]提出了一种基于“RPA+LAMP”的可嵌套、双阶段巢式等温扩增方法。首先, 由试管中的反应体系直接完成基于 RPA 的等温扩增, 随后, 将试管颠倒多次, 使得试管中的预扩增产物与试管帽底部预先放置的 LAMP 引物等相互混合, 然后, 进行基于 LAMP 的等温扩增, 由此, 通过两步扩增法, 能够针对简易核酸提取方法得到的核酸模板, 实现高灵敏度、高特异性检测。针对相同的核酸模板, 其灵敏度比 RT-PCR 高 2 个数量级, 此类简便的巢式等温扩增检测尤其适合于高灵敏的 POCT 核酸检测。

巢式等温扩增芯片, 将 2 种等温扩增反应集成到一个芯片中, 通过对模板的两步扩增放大, 由此提升了检测灵敏度。与单步等温扩增芯片相比, 两步法巢式等温扩增芯片的结构更加复杂, 其流体控制的精准度要求也更高, 例如, 在封闭式反应条件下, 第二步等温扩增反应需要高效率的芯片内试剂混合、试剂定量驱动等操作, 这些都增加了两步法等温扩增芯片的设计实现难度。

2.5 数字液滴等温扩增微流控芯片

微流控芯片为快速产生大量、均匀的微液滴提供了一个理想的技术平台。单个液滴作为独立的反应单元, 由此, 显著提升了反应通量, 实现了极高效率的并行反应。基于液滴平台的数字 PCR 技术, 能够实现核酸绝对定量检测, 显著提升了传统 PCR 的应用范围。与数字 PCR

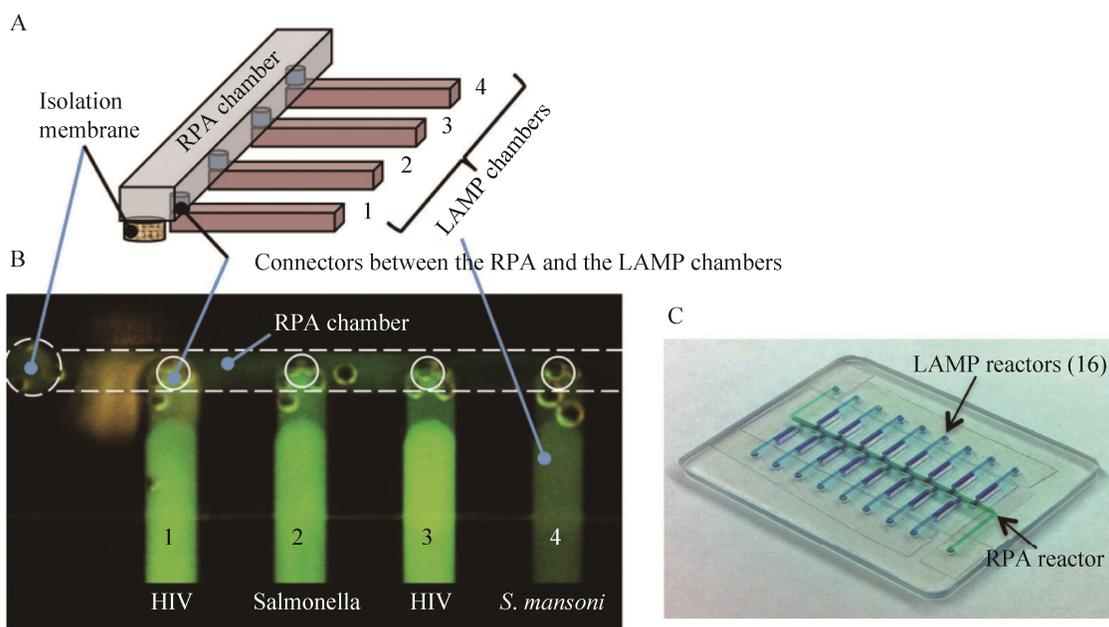


图 4 RAMP 等温扩增芯片

Figure 4 RAMP isothermal amplification chip. (A) Two-stage microfluidic chip combining RPA and LAMP. (B) Detection results of multiple pathogens based on fluorescence images. (C) Picture of RAMP chip including one major RPA reactor and 16 branching LAMP reactors^[49].

类似，基于液滴的数字等温扩增技术，通过借助微流控芯片来快速生成大量的液滴，由此构建了数字等温扩增检测平台。在单个液滴中，单独包裹了缓冲液、反应底物、引物、酶、探针等反应体系，同时包裹 1 个或 0 个核酸模板，由此作为核酸扩增的基本单位。与数字 PCR 类似，基于等温扩增方法的数字等温扩增，也可以实现核酸绝对定量检测。近年来，数字液滴等温扩增检测芯片及技术得到了大家的密切关注。如图 5A 所示，Rane 等^[51]研究了一种微流液体液滴分析检测装置，能够实现基于等温扩增方法的液滴数字化核酸检测，包括液滴生成、

转移、数字 LAMP 扩增及实时检测等。该装置能够在 110 min 内，完成 100 万个液滴的生成、反应及检测，检测 10 μL 淋球菌样品，其检测下限达到 600 拷贝数/ μL 。与基于微室结构的芯片相比，该装置通过连续流动操作模式，显著提升了能够参与反应的生成液滴总量。如图 5B 所示，Schuler 等^[52]利用离心微流控芯片生成了大量液滴，并完成了数字液滴重组酶聚合酶扩增反应 (ddRPA)，其中，液滴的直径为 120 μm 至 170 μm ，其 CV 系数为 2%–4%，产生速率为 500 个/s。利用此装置，实现了李斯特菌 DNA 绝对定量检测，总检测时间低于 30 min。与数

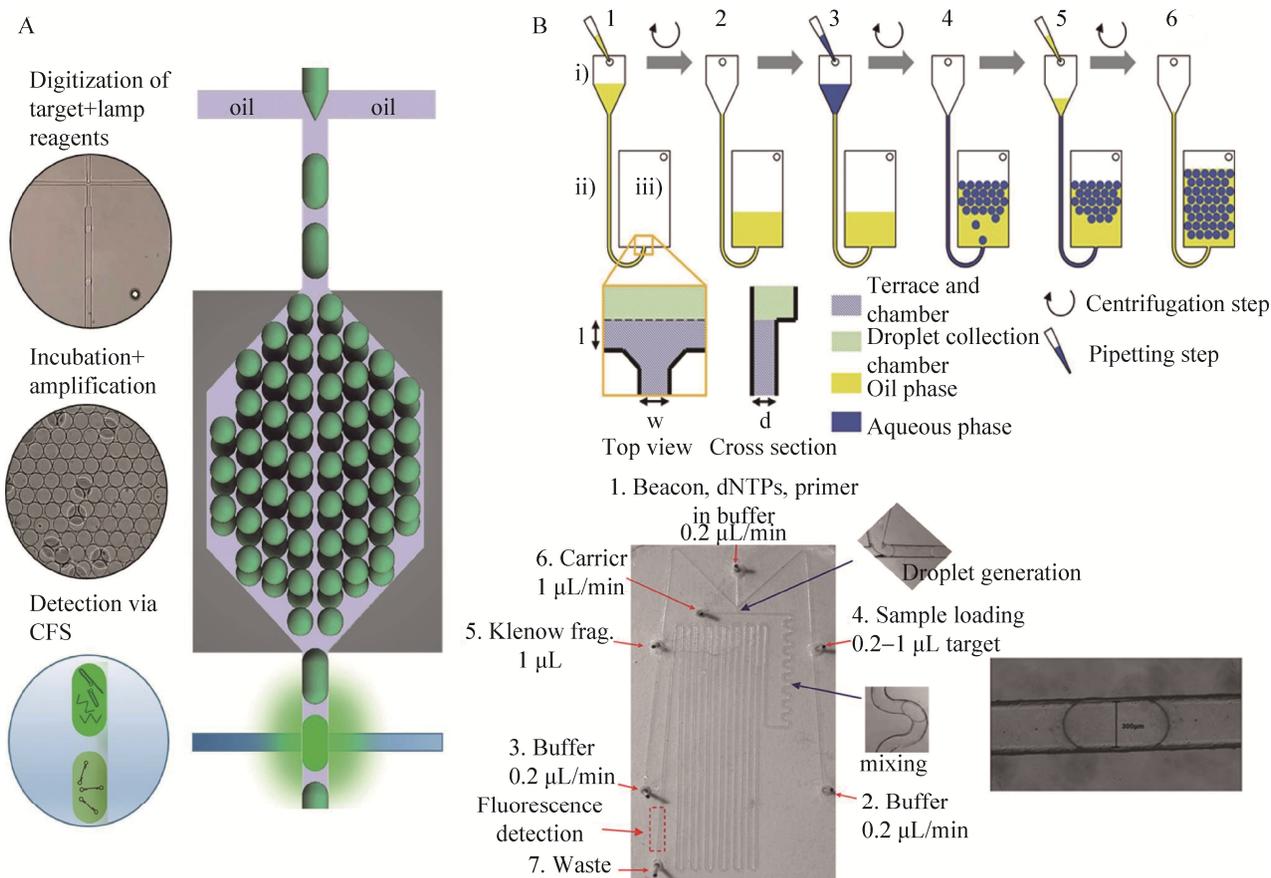


图 5 数字液滴等温扩增微流控芯片

Figure 5 Digital droplet isothermal amplification of the microfluidic chip. (A) Droplet microfluidic device for continuous flow digital LAMP analysis^[51]. (B) Droplet-based centrifugal microfluidic system for digital RPA^[52]. (C) Droplet-based microfluidic device for MicroRNA detection based on isothermal circular-strand-displacement polymerization (ICSDP) amplification^[53].

字液滴聚合酶链式反应 (ddPCR) 相比, 数字液滴等温扩增检测, 无论在检测装置的简便性方面, 还是在检测总时间方面, 都具有显著的优势。如图 5C 所示, Giuffrida 等^[53]对 K562 细胞中的 microRNA-210 进行了等温扩增检测, 该方法能够检测 20 nL 液滴中, 低至 10^{-18} mol 的微 RNA 靶序列。与传统核酸扩增方法相比, 基于液滴的数字扩增检测技术具有以下突出的优势: (1) 实现核酸绝对定量检测, 无需依赖校准曲线; (2) 提高低拷贝核酸模板检测的灵敏度和精准度; (3) 具有高耐受性, 由于目标序列被分配到多个微滴中, 显著降低了体系间的影响以及背景序列和抑制物对反应的干扰, 扩增基质效应显著减小。

与液滴数字 PCR 类似, 基于微流控技术也可以实现液滴数字等温扩增, 而且, 由于其反应温度显著低于 PCR 反应温度, 因此, 液滴数字等温扩增中, 液滴破碎概率显著降低, 这有利于提升检测的精准度。一方面, 液滴数字等温扩增需要液滴产生单元、液滴扩增单元及液滴检测单元等多个功能模块的相互配合, 整体的系统复杂度与检测成本较高; 另一方面, 与数字 PCR 相比, 液滴数字等温扩增技术的成熟度偏低, 还需要继续加强方法学与试剂的研究, 以进一步提升液滴数字等温扩增检测的反应均一性、稳定性和重复性等关键性能, 提升核酸绝对定量检测的精准度。

3 基于微流控芯片的等温扩增应用

3.1 病原体检测

为了实现病原体的即时检测, 在最大化减少检测时间的同时, 获取理想的检测灵敏度^[54], 可以将基于等温扩增的核酸检测方法应用于食品安全检测中, 如食源性病原体检测。例如, 密歇根棒状杆菌 (CMS) 是一种重要的细菌性

植物病原体, 可引起马铃薯环腐病。用于快速诊断 CMS 的血清学检测方法因灵敏度低, 其检测效果受限。基于 LAMP 等温核酸扩增, 基于简单加热方法, 在短时间内通过高效核酸扩增, 即可实现高灵敏度检测, 而且, 对专业化实验室的环境依赖性显著降低^[55]。Nguyen 等研究了一种基于等温扩增方法的全集成便携式离心微流控芯片系统, 可以实现食品中大肠杆菌等多种病原体的多重检测。该微流控芯片检测系统, 包括一个便携式检测仪与一个集成式离心微流控芯片^[56]。其中, LAMP 等温扩增相关的各类试剂存储在微流控芯片的反应腔室, 借助离心力的有序控制, 实现了芯片上与各个反应步骤相关的试剂运动与转移, 由此, 完成核酸检测相关的各步反应, 包括核酸提取、试剂混合、LAMP 等温扩增及检测等。通过多组反应模块的设置, 此一次性芯片允许进行高通量模式下的食源性细菌检测。

另外, 对疟疾寄生虫^[57]、HPV 诊断^[58]和粪便中的细菌^[59]检测等, 等温扩增方法也能够获取理想的检测灵敏度和特异性。

3.2 新型冠状病毒等温扩增检测

作为极其危险的急性呼吸道传染性疾, COVID-19 由急性呼吸系 SARS-CoV-2 引起, 已经造成了严重的全球公共卫生问题。截至 2021 年 7 月 8 日, 全球 COVID-19 确诊病例为 184 820 132 例, 死亡 4 002 209 例^[60]。当前 RT-PCR 是 COVID 分子诊断的标准方法。由于 PCR 方法检测时间较长, 而且涉及专业化检测仪器, 一般需要在专业化实验室完成, 因此, 其环境适应性及应用场所具有一定的局限性。由于 COVID-19 能够在各类基层环境快速传播, 基于等温扩增原理的现场快速核酸检测方法, 能够简单、便捷完成核酸诊断, 且对环境依赖程度低, 这有利于实现 COVID-19 的即时检测, 提升新型冠状

病毒肺炎的整体防控水平。

到目前为止,已经有多个基于等温扩增方法的 SARS-CoV-2 快速检测装置。清华大学的 Xing 等提出了一种多重、离心式等温扩增微流控芯片系统 (RTisochipTM-W)^[61],基于 NASBA 等温扩增反应,能够在 90 min 内,分别完成对 16 个样本中 19 种常见呼吸道病毒的检测,包括 SARS-CoV-2。RTisochipTM-W 微流控系统具有检测灵敏度高、特异性强等优点。Lucira 基于 LAMP 等温扩增方法,研制了一种微型化的“样品进-结果出”新冠病毒检测装置, Lucira COVID-19。Lucira COVID-19 能够在 30 min 内(强阳性测试时间为 11 min),完成 SARS-CoV-2 检测^[62]。Kim 等提出了一种快速且超灵敏的微流控检测芯片^[63],通过 RCA 等温扩增,可在 15 min 内成功检测出检测下限为 0.7 amol/L 的 SARS-CoV-2 样品。Augustine 等将 LAMP 等温扩增方法与侧向流纸条相结合,实现 POCT 现场快速检测^[64]。随着基于等温扩增原理的便携式、集成化、一体化的核酸检测装置应用于个人乃至家庭场景下新冠病毒的 POCT 现场快速检测,预计将来会有更多的低成本、简单便捷型等温扩增核酸检测装置用于个人、家庭、社区环境中,实现各类病原体的 POCT 现场快速检测。

3.3 等温扩增与基因编辑技术 (CRISPR) 结合

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 基因编辑技术,为第三代基因编辑技术^[65],这种突破性技术是基于一种特殊编辑酶,该酶能够把一小段作为引导工具的 RNA 引入 DNA,从而能在特定位置切断核酸序列,或者进行相关改变,从而达到有针对性的编辑、改变特定基因序列的目的。研究数据表明,基于 CRISPR 的基因编辑技术其

效率显著高于 TALEN (转录激活因子类感受器核酸酶) 等其他基因编辑技术。将等温扩增与基因编辑相结合,通过发挥两者的优势,有利于进一步提升核酸检测的灵敏度与特异性^[66]。2017 年,美国麻省理工学院张锋教授将 RPA 与 CRISPR 相结合,产生了一个新的检测平台,称为 SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter unLOCKing)。检测结果表明,RPA 与 CRISPR/Cas13a 的基因编辑系统相结合,其检测灵敏度达到了 attomolar 级,能够有效识别单个碱基差异^[46]。2018 年张峰等对 SHERLOCK 进行完善,基于多重荧光定量检测方法,实现了多个靶标检测,实现了检测限低至 2 amol/L 的寨卡病毒 RNA 的检测。此外,RPA 与 CRISPR 相结合的快速扩增 (RAMP) 系统,对核酸提取模板的纯度与质量的容忍性更强,无需复杂的样品预处理操作,即可实现便捷的核酸扩增与检测^[67]。Huang 等^[68]将等温指数扩增反应 (EXPAR) 与基因编辑相结合,利用 Cas9 对 ssDNA 的作用原理,将 CRISPR/Cas9 与 EXPAR 结合,成功应用于 DNA 甲基化和单增李斯特菌 mRNA 的快速检测,检测特异性高,检测灵敏度达到 0.82 amol/L。随着基因编辑技术与等温扩增技术的各自提升,及相互之间的不断优化融合,核酸检测整体性能(灵敏度、特异性、分辨率、准确度等)将会得到进一步提升,在 POCT 现场快速检测、肿瘤药物筛选、抗生素筛选等各个领域,发挥日益重要的作用^[69-70]。

4 总结与展望

微流控芯片通过集成不同功能单元,能够在同一张芯片上实现样品进样、富集、反应、检测及信号读取等多个步骤,由此实现生物样品检测过程的自动化与一体化,这为实现基于

等温扩增的核酸检测自动化、快速化、高通量、多靶标、全集成化提供了一个优势技术平台。本综述中,首先总结了几类代表性的等温扩增技术,并对比分析了其优缺点。在此基础上,针对5类代表性等温扩增微流控芯片,对其工作原理及特点分别进行了细致分析。最后,总结了等温扩增微流控芯片在病原体检测中的应用,以及等温扩增和CRISPR基因编辑技术的交叉融合的发展趋势。

与PCR技术相比,等温扩增技术基于单一恒定温度来完成核酸扩增,这显著降低了微流控系统的装置复杂度;另一方面,等温扩增技术的核酸扩增效率往往高于PCR技术,这能够有效缩短核酸检测的总时间。此外,借助微流控系统在流体驱动、批量化反应操作、反应过程集成化等方面的优势,能够进一步提升等温扩增检测的整体性能,为等温扩增在各类POCT现场快速检测环境中的推广与应用打下坚实的基础。与PCR技术相比,等温扩增反应不受热循环周期控制,理论上,不能够建立基于严格扩增周期的精准定量扩增曲线。等温扩增过程往往通过反应时间来指示核酸扩增量,这难以实现精准的定量检测,更加适合于半定量或定性检测。某些等温扩增方法,如LAMP等温扩增涉及多个引物,往往需要通过优化引物设计来确保核酸检测的特异性与灵敏度,这提高了其技术实现难度。另外,作为一种新型核酸扩增技术,某些等温扩增方法,其反应组分如酶、缓冲液及反应条件等各类影响因素,还需要针对具体扩增对象进行针对性的优化改进,其技术成熟度还低于传统PCR技术。未来,随着等温扩增技术的日益成熟,基于微流控芯片的等温扩增技术在包括POCT在内的各类核酸诊断应用场景中,会逐步展示出更好的适应性、灵敏度、特异性及准确度。

微流控芯片在样品自动化处理、流体控制、多反应并行、试剂存储及功能集成等方面具有显著的优势,尤其是,一次性、低成本微流控芯片在POCT现场快速检测领域具有独到的优势。基于聚合物(如PC、PMMA等)的微流控芯片,允许通过注塑工艺实现批量化制造,性能的一致性好、成本低,已经在核酸检测、免疫检测和生化分析等多个领域得到了一定的应用。将等温扩增检测技术推广到微流控平台,通过将两者进行有机结合,充分发挥两者的优势,有利于进一步提升POCT核酸检测的水平。尤其是,与PCR微流控芯片相比,等温扩增微流控芯片对于核酸扩增反应温度条件的要求显著降低,这既有利于降低芯片的设计难度,也有利于降低配套温控装置的复杂度及成本。同时,等温扩增微流控芯片无需复杂的升降温过程,因此其扩增时间往往也会更短,这有利于实现更加快速、便捷的核酸检测。随着微流控芯片加工方法与工艺的不断优化、核酸检测方法的不断简化和等温扩增方法的不断成熟,基于等温扩增的微流控芯片系统在核酸检测领域会发挥日益重要的作用。

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 Sensorss*, 2019, 4(11): 2952-2957.
- [2] Ganguli A, Mostafa A, Berger J, et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2. *PNAS*, 2020, 117(37): 22727-22735.
- [3] Li J, MacDonald J, Von Stetten F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Anal*, 2018, 144(1): 31-67.
- [4] Liu C, Mauk MG, Hart R, et al. A low-cost microfluidic chip for rapid genotyping of malaria-transmitting

- mosquitoes. PLoS One, 2012, 7(8): e42222.
- [5] Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. Lab Chip, 2012, 12(14): 2469-2486.
- [6] Fakruddin M, Mazumdar RM, Chowdhury A, et al. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)-prospects and applications. 2012, 2(1): 106-121.
- [7] Silva Nunes Bezerra G, Barbosa Júnior WL, Virginia Batista Vieira A, et al. Loop-mediated isothermal amplification methods for diagnosis of visceral leishmaniasis (*kala-azar*)-a systematic review. Expert Rev Mol Diagn, 2020, 20(5): 455-465.
- [8] Zhang H, Xu Y, Fohlerova Z, et al. LAMP-on-a-chip: revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. Trends Analyt Chem, 2019, 113: 44-53.
- [9] Zheng F, Li S, Wang S, et al. Cross-priming isothermal amplification combined with nucleic acid test strips for detection of meat species. Anal Biochem, 2020, 597: 113672.
- [10] Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. Nat Genet, 1998, 19(3): 225-232.
- [11] Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. EMBO Rep, 2004, 5(8): 795-800.
- [12] Hill CS. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. Expert Rev Mol Diagn, 2001, 1(4): 445-455.
- [13] Walker GT, Little MC, Nadeau JG, et al. Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. PNAS, 1992, 89(1): 392-396.
- [14] Qian C, Wang R, Wu H, et al. Nicking enzyme-assisted amplification (NEAA) technology and its applications: a review. Anal Chim Acta, 2019, 1050: 1-15.
- [15] Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro LA, Carrascosa J, et al. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. Biosens Bioelectron, 2016, 79: 300-306.
- [16] Jung JH, Park BH, Oh SJ, et al. Integration of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip on a centrifugal microdevice for influenza A virus identification. Lab Chip, 2015, 15(3): 718-725.
- [17] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc, 2008, 3(5): 877-882.
- [18] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Bioph Res Co, 2001, 289(1): 150-154.
- [19] Wang L, Zhang CY, Chen GF, et al. Development of a rapid screening test for *Karenia mikimotoi* by using loop-mediated isothermal amplification and lateral flow dipstick. J Appl Psychol, 2020, 32(5): 3143-3155.
- [20] Wu X, Wang Y, Yin Q, et al. A diagnostic test that uses isothermal amplification and lateral flow detection *sdaA* can detect tuberculosis in 60 min. J Appl Microbiol, 2021, 130(6): 2102-2110.
- [21] Zasada AA, Wiatrzyk A, Czajka U, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric and lateral flow dipstick visualization as the potential point-of-care testing for *Corynebacterium diphtheriae*. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 308.
- [22] Giuffrida MC, Spoto G. Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: recent advances. Biosens Bioelectron, 2017, 90: 174-186.
- [23] Phaneuf CR, Mangadu B, Tran HM, et al. Integrated LAMP and immunoassay platform for diarrheal disease detection. Biosens Bioelectron, 2018, 120: 93-101.
- [24] Choi G, Prince T, Miao J, et al. Sample-to-answer palm-sized nucleic acid testing device towards low-cost malaria mass screening. Biosens Bioelectron, 2018, 115: 83-90.
- [25] Zhang L, Tian F, Liu C, et al. Hand-powered centrifugal microfluidic platform inspired by the spinning top for sample-to-answer diagnostics of nucleic acids. Lab Chip, 2018, 18(4): 610-619.
- [26] Seo JH, Park BH, Oh SJ, et al. Development of a high-throughput centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for multiplex foodborne pathogenic bacteria detection. Sensor Actuat B-Chem, 2017, 246: 146-153.
- [27] Heo HY, Chung S, Kim YT, et al. A valveless rotary microfluidic device for multiplex point mutation identification based on ligation-rolling circle amplification. Biosens Bioelectron, 2016, 78: 140-146.

- [28] Liu DC, Zhu YZ, Li N, et al. A portable microfluidic analyzer for integrated bacterial detection using visible loop-mediated amplification. *Sensor Actuat B-Chem*, 2020, 310: 127834.
- [29] Bhatla N, Singhal S. Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2020, 65: 98-108.
- [30] Mayboroda O, Katakis I, O'Sullivan CK. Multiplexed isothermal nucleic acid amplification. *Anal Biochem*, 2018, 545: 20-30.
- [31] Ereku LT, Mackay RE, Craw P, et al. RPA using a multiplexed cartridge for low cost point of care diagnostics in the field. *Anal Biochem*, 2018, 547: 84-88.
- [32] 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.
- [33] Dou M, Sanjay ST, Dominguez DC, et al. Multiplexed instrument-free meningitis diagnosis on a polymer/paper hybrid microfluidic biochip. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87: 865-873.
- [34] Sayad A, Ibrahim F, Mukim Uddin S, et al. A microdevice for rapid, *Monoplex* and colorimetric detection of foodborne pathogens using a centrifugal microfluidic platform. *Biosens Bioelectron*, 2018, 100: 96-104.
- [35] Xie C, Chen S, Zhang L, et al. Multiplex detection of blood-borne pathogens on a self-driven microfluidic chip using loop-mediated isothermal amplification. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(11): 2923-2931.
- [36] Xiong HW, Ye X, Li Y, et al. Rapid differential diagnosis of seven human respiratory coronaviruses based on centrifugal microfluidic nucleic acid assay. *Anal Chem*, 2020, 92(21): 14297-14302.
- [37] Chen C, Liu P, Zhao X, et al. A self-contained microfluidic in-gel loop-mediated isothermal amplification for multiplexed pathogen detection. *Sensor Actuat B-Chem*, 2017, 239: 1-8.
- [38] Mahalanabis M, Do J, ALMuayad H, et al. An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification. *Biomed Microdevices*, 2010, 12(2): 353-359.
- [39] Jin ZJ, Ding GT, Li GY, et al. Rapid detection of foodborne bacterial pathogens using visual high-throughput microfluidic chip. *J Chem Technol Biot*, 2020, 95(5): 1460-1466.
- [40] Oh SJ, Park BH, Jung JH, et al. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection. *Biosens Bioelectron Science*, 2016, 75: 293-300.
- [41] Zhao XY, Dong T, Yang ZC, et al. Aptamer-NASBA LOC as a prospective tool for systemic therapy of cancer: quantitative detection on signaling molecular profiling. 2012 annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society. August 28–September 1, 2012, San Diego, CA, USA. *IEEE*, 2012: 578-581.
- [42] Mao R, Ge G, Wang Z, et al. A multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification array for detection of malaria-related parasites and vectors. *Acta Trop*, 2018, 178: 86-92.
- [43] Yang B, Fan YL, Li Y, et al. Rapid and simultaneous analysis of twelve virulence factor genes by a microfluidic-CFPA chip for identifying diarrheagenic *Escherichia coli*. *Analyst*, 2020, 145(11): 3814-3821.
- [44] Hui J, Gu Y, Zhu Y, et al. Multiplex sample-to-answer detection of bacteria using a pipette-actuated capillary array comb with integrated DNA extraction, isothermal amplification, and smartphone detection. *Lab Chip*, 2018, 18(18): 2854-2864.
- [45] Ye X, Li Y, Wang LJ, et al. All-in-one microfluidic nucleic acid diagnosis system for multiplex detection of sexually transmitted pathogens directly from genitourinary secretions. *Talanta*, 2021, 221: 121462.
- [46] Gulliksen A, Keegan H, Martin C, et al. Towards a “sample-in, answer-out” point-of-care platform for nucleic acid extraction and amplification: using an HPV E6/E7 mRNA model system. *J Oncol*, 2012, 2012: 905024.
- [47] Liu Q, Zhang XL, Chen LP, et al. A sample-to-answer labdisc platform integrated novel membrane-resistance valves for detection of highly pathogenic avian influenza viruses. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, 270: 371-381.
- [48] Chen JG, Xu YC, Yan H, et al. Sensitive and rapid detection of pathogenic bacteria from urine samples using multiplex recombinase polymerase amplification. *Lab Chip*, 2018, 18(16): 2441-2452.
- [49] Song J, Liu C, Mauk MG, et al. Two-stage isothermal enzymatic amplification for concurrent multiplex

- molecular detection. *Clin Chem*, 2017, 63(3): 714-722.
- [50] El-Tholoth M, Bau HH, Song JZ. A single and two-stage, closed-tube, molecular test for the 2019 novel coronavirus (COVID-19) at home, clinic, and points of entry. *ChemRxiv*, DOI: 10.26434/chemrxiv.11860137.VI.
- [51] Rane TD, Chen L, Zec HC, et al. Microfluidic continuous flow digital loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Lab Chip*, 2015, 15(3): 776-782.
- [52] Schuler F, Schwemmer F, Trotter M, et al. Centrifugal step emulsification applied for absolute quantification of nucleic acids by digital droplet RPA. *Lab Chip*, 2015, 15(13): 2759-2766.
- [53] Giuffrida MC, Zanolini LM, D'Agata R, et al. Isothermal circular-strand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(6): 1533-1543.
- [54] Paul R, Ostermann E, Wei Q. Advances in point-of-care nucleic acid extraction technologies for rapid diagnosis of human and plant diseases. *Biosens Bioelectron*, 2020, 169: 112592.
- [55] Sagcan H, Turgut Kara N. Detection of potato ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 20393.
- [56] Nguyen HV, Nguyen VD, Lee EY, et al. Point-of-care genetic analysis for multiplex pathogenic bacteria on a fully integrated centrifugal microdevice with a large-volume sample. *Biosens Bioelectron*, 2019, 136: 132-139.
- [57] Selvarajah D, Naing C, Htet NH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for diagnosis of uncomplicated malaria in endemic areas: a meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Malar J*, 2020, 19(1): 211.
- [58] Chen CM, Ouyang S, Lin LY, et al. Diagnostic accuracy of LAMP assay for HBV infection. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(7): e23281.
- [59] Ngari MG, Mwangi IN, Njoroge MP, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) diagnostic test for detection of whipworm, *Trichuris trichiura*, in faecal samples. *J Helminthol*, 2020, 94: e142.
- [60] World Health Organization, coronavirus disease (COVID-19) pandemic numbers at a glance, 10 April 2021. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- [61] Xing WL, Liu YY, Wang HL, et al. A high-throughput, multi-index isothermal amplification platform for rapid detection of 19 types of common respiratory viruses including SARS-CoV-2. *Engineering (Beijing)*, 2020, 6(10): 1130-1140.
- [62] Lucira™ COVID-19 All-In-One Test Kit Instruction for Use. <https://www.lucirahealth.com/wp-content/uploads/2020/11/Lucira-HCP-Instructions-For-Use-IFU.pdf> (Accessed on 05 March 2021).
- [63] Kim HS, Abbas N, Shin S. A rapid diagnosis of SARS-CoV-2 using DNA hydrogel formation on microfluidic pores. *Biosens Bioelectron*, 2021, 177: 113005.
- [64] Augustine R, Hasan A, Das S, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology (Basel)*, 2020, 9(8): 182.
- [65] Zhang M, Eshraghian EA, Jammal OA, et al. CRISPR technology: the engine that drives cancer therapy. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111007.
- [66] Subsoontorn P, Lohitnavy M, Kongkaew C. The diagnostic accuracy of isothermal nucleic acid point-of-care tests for human coronaviruses: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 22349.
- [67] Yin K, Ding X, Li ZY, et al. Dynamic aqueous multiphase reaction system for one-pot CRISPR-Cas12a based ultrasensitive and quantitative molecular diagnosis. *Anal Chem*, 2020, 92(12): 8561-8568.
- [68] Huang M, Zhou X, Wang H, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection. *Anal Chem*, 2018, 90(3): 2193-2200.
- [69] Chen Q, Tian T, Xiong E, et al. CRISPR/Cas13a signal amplification linked immunosorbent assay for femtomolar protein detection. *Anal Chem*, 2020, 92(1): 573-577.
- [70] Wang XS, Xiong EH, Tian T, et al. CASLFA: CRISPR/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay. *ACS Nano*, 2019, 14(2): 2497-2508.

(本文责编 陈宏宇)