

微流控技术在病原微生物检测中的研究进展

万其武^{1, 2, 4} 包旭东^{1, 2} 丁柯^{1, 3} 牟华明⁴ 罗阳¹

(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. 重庆大学附属江津医院科教外事部, 重庆 402260; 4. 重庆大学附属三峡医院心血管内科, 重庆 400044)

摘要: 快速、准确地检测病原微生物对于疫情防控和保障人民生命健康具有重大意义。近几年, 研究者们通过合理地设计微流控芯片, 将微流控技术与各种检测技术相结合, 已经开发出了多种用于病原微生物检测的技术方法。相较于传统的病原微生物检测技术, 微流控检测技术优势突出, 具有操作人员技术要求不高、样本需求量少和自动化程度高等优点, 适用于各种复杂环境下病原微生物的精准、快速检测。本文对微流控技术在病毒、细菌、真菌、衣原体及支原体等病原微生物的检测应用进行了综述, 以期对病原微生物的检测提供研究思路, 促进微流控技术在病原微生物检测中的发展, 提高对疾病的预防和控制能力。

关键词: 病原微生物; 芯片; 微流控; 自动化; 快速检测

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-0479

Research Progress in Microfluidic Technology in the Detection of Pathogenic Microorganisms

WAN Qi-wu^{1, 2, 4} BAO Xu-dong^{1, 2} DING Ke^{1, 3} MOU Hua-ming⁴ LUO Yang¹

(1. Center of Smart Laboratory and Molecular Medicine, School of Medicine, Chongqing University, Chongqing 400044; 2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044; 3. Foreign Affairs Department of Science and Technology, Jiangjin Hospital, Chongqing University, Chongqing 402260; 4. Cardiovascular Medicine Department, Sanxia Hospital of Chongqing University, Chongqing 400044)

Abstract: Rapid and accurate detection of pathogenic microorganisms is of great significance for epidemic prevention and control as well as the protection of people's lives and health. In recent years, researchers have developed a variety of technical methods for the detection of pathogenic microorganisms by reasonably designing microfluidic chips and combining microfluidic technology with various detection technologies. Compared with traditional pathogenic microorganism detection technology, microfluidic detection technology has outstanding advantages, i.e., low technical requirements for operators, less sample demand and high degree of automation, and is suitable for accurate and rapid detection of pathogenic microorganisms in various complex environments. In this paper, the application of microfluidic technology in the detection of pathogenic microorganisms such as viruses, bacteria, fungi, chlamydia and mycoplasma was reviewed, aiming to provide research ideas for the detection of pathogenic microorganisms, promote the development of microfluidic technology in the detection of pathogenic microorganisms, and improve the prevention and control ability of diseases.

Key words: pathogenic microorganisms; chip; microfluidics; automation; rapid detection

病原微生物是指能够引起人类或动物疾病的微生物, 包括病毒、细菌、真菌、衣原体和支原体等。

病原微生物可以通过空气、体液等介质传播, 危害人体健康, 造成财产损失^[1]。因此, 对病原微生物

收稿日期: 2023-05-18

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(82125022), 重庆大学附属江津医院博士后科研启动项目(2022BHQDXM01), 重庆市博士后科学基金项目(CSTB2022NSCQ-BHX0703)

作者简介: 万其武, 男, 硕士研究生, 研究方向: 疾病早期检测、分子诊断; E-mail: qiwuwan@163.com

通讯作者: 罗阳, 男, 博士, 教授, 研究方向: 疾病早期检测、分子诊断; E-mail: luoy@cqu.edu.cn;

牟华明, 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 内科学(心血管病学); E-mail: mouhm2002@aliyun.com

快速、准确以及灵敏的检测是降低其危害的重要手段^[2]。传统的病原微生物检测方法包括染色、培养、生化鉴定等方法,存在耗时长、成本高、操作复杂等缺点。微流控技术的出现为病原微生物的低成本、高通量、高效率检测提供了新的研究思路和方法^[3]。本文基于微流控技术在不同病原微生物检测中的研究进展作一综述,旨在为微流控技术在病原微生物检测中的研究提供参考,进而推动微流控技术在病原微生物检测中的应用。

1 微流控概述及其分类

1.1 微流控的简介

微流控(microfluidics)指的是使用微管道(尺寸为数十到数百微米)处理或操纵微小流体(体积为纳升到阿升)的系统所涉及的科学和技术。微流控系统通常包含阀门、微通道、反应室、压力系统和检测系统,通过控制微流控装置内流体的运动来实现样品制备、反应、分离和检测等功能。微流控技术能够控制微小流体,整合多种反应,其在病原微生物检测中可以在微观水平上精确控制样品体积并减少体内和体外环境之间的差异,进而达到缩短反应时间和降低检测成本的目的^[4],具有快速、准确、样品消耗少等优点,为病原微生物的检测提供了广阔的前景。微流控技术在病原微生物检测中的应用如图1。

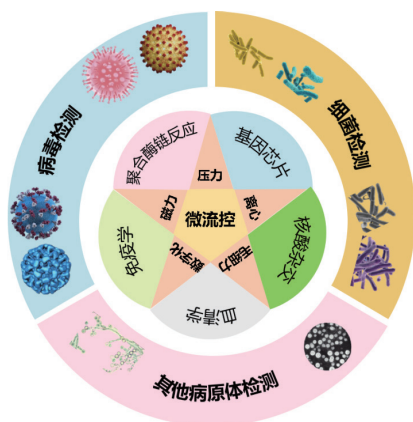


图1 微流控在病原微生物检测中应用

Fig. 1 Application of microfluidic in the detection of pathogenic microorganisms

1.2 微流控技术的分类

微流控技术发展迅速,种类繁多,应用十分广泛,对于微流控技术种类的划分还没有统一的标准。基于微流控芯片的驱动方式可将其分为主动型微流控和自驱型微流控。主动型微流控一般利用的是外源性驱动力进行微流体的操控,主要包括压力型微流控、离心型微流控、磁力型微流控、数字化微流控等。各类型微流控特点如下:(1)压力型微流控:利用气体压力或液压或气液压混合,来控制液体在芯片中的运动;(2)离心型微流控:一般为对称盘式构型,利用旋转产生的离心力来驱动液体在芯片中的运动;(3)磁力型微流控:利用磁场来控制流体中的磁性物质,以驱动流体的运动;(4)数字化微流控:基于微升至纳升范围内的液滴精准操作,来实现复杂的实验室分析的独立平台,其微滴由液体表面张力特性形成。上述是常见的几种微流体驱动方式,研究人员通常将多种驱动方式组合来实现特定的目标功能。

自驱型微流控通常利用表面亲疏水特性或毛细力来进行流体的输运与处理,具有自驱动、无需外接动能、操作方便和容易控制等特点。其原理是基于纸质材料的易塑形、多孔、亲水、毛细管作用等特性进行物理或化学加工后构建出的平面(2D)或立体(3D)的纸基微流道,该微流道集样品前处理、分离、分析等功能于一体,可实现微量样本的快速检测。目前文献所报道的微流控装置多是外源驱动型微流控,而高通量、低能耗或无需外源驱动的微流控检测技术是未来主要发展趋势。

2 微流控技术在病原微生物检测中的应用

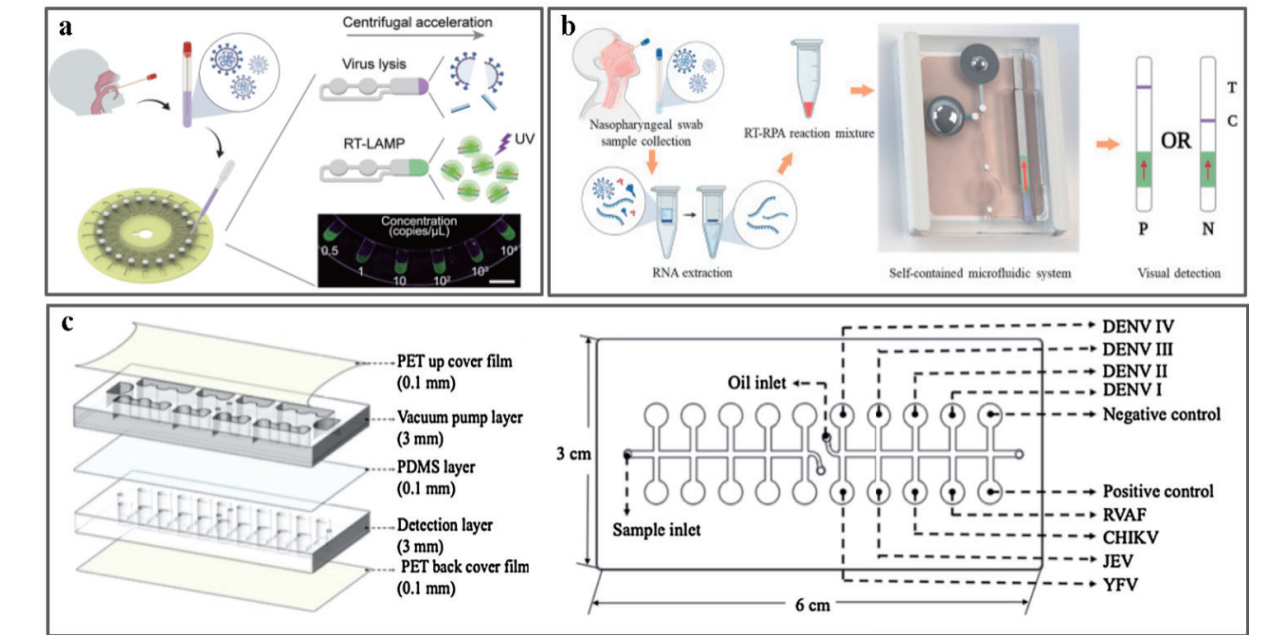
2.1 微流控技术检测病毒

基于微流控技术的病毒检测方法主要针对病毒细胞数量、表面特异性蛋白和特异性核酸片段来开展检测^[5-6]。基于病毒细胞培养的空斑测定法是病毒鉴定和诊断的金标准,但存在通量低、所需样品量大等问题,因此 Su 等^[7]设计了可以同时培养5种病毒的聚二甲硅氧烷芯片,该芯片系统不仅实现了病毒的高效鉴定,还完成了病毒的分离和抗病毒药物的筛选,具有通量高和检测样本量少的优点。

微流控芯片培养法解决了传统培养法存在的一些问题，但仍存在培养周期长等限制，所以需要开发耗时少、精确度高的检测方法。而靶向病毒表面特异蛋白的微流控技术可以很好地解决目前培养法存在的问题，因而，Saraf 等^[8]基于适体和适体功能化的金纳米粒子与目标蛋白形成三明治夹心结构，然后和银试剂反应获得比色信号，设计了对寨卡病毒和基孔肯雅病毒等病毒包膜蛋白进行多重检测的微流控检测芯片，该芯片系统在 2 h 内完成了对磷酸化缓冲盐水和小牛血中寨卡病毒和基孔肯雅病毒的高特异性检测。为了在微流控检测系统中实现对多靶标蛋白的灵敏识别，Guan 等^[9]设计了一个集成两种单克隆抗体（mAb）的微流体系统，用于肠道病毒 71（EV71）的灵敏检测。该系统将 EV71 的主要衣壳蛋白 VP1 的单克隆抗体 1F4 和 2H2 分别与羧基官能化磁珠和羧基官能化量子点偶联，最后通过荧光强度来直接评估靶标蛋白的浓度。该微流体系统在 30 min 内对 VP1 的检测限（LOD）达到 10

pg/mL，与使用相同抗体的夹心酶联免疫吸附试验的结果（310 pg/mL）相比，提升了 31 倍。

随着技术的不断完善与发展，基于病毒表面特异蛋白的微流控技术在耗时、特异性以及灵敏度等方面均有很大的提升，但是面对低丰度、高感染性的病毒靶标时，仍存在灵敏度不够的问题，而以精确度高著称的核酸检测法可以弥补蛋白检测法存在的缺陷^[10]。基于此，Tian 等^[11]开发了一种检测病毒特异性核酸序列的全自动离心微流控系统（图 2-a），所有检测流程被整合到封闭的自动化微流体系统之中，当口咽拭子样品被注入微流控盘后，该系统自动进行样品处理、反转录环介导等温扩增、荧光信号检测等检测流程，其在 70 min 内完成了对 21 个样本的高灵敏检测，最低检测限达到 0.5 copies/ μ L。而当面对致病率极高的病毒时，快速且高效地筛查出阳性患者是有效开展防疫工作的保障，因此，Li 等^[12]基于一个独立的微流控系统开发了一种简单、灵敏和无需仪器的病毒检测系统（图 2-b）。



a: 用于样本应答病毒核酸检测的全自动离心微流体系统^[11]；b: 对 SARS-CoV-2 进行无仪器、基于 CRISPR 诊断的微流控系统^[12]；c: 一种利用 RT-LAMP 检测载体病毒的自供电快速加载微流控芯片^[13]

a: Fully automated centrifugal microfluidic system for sample response viral nucleic acid detection^[11]；b: a microfluidic system based on CRISPR diagnosis without instruments for SARS-CoV-2^[12]；c: a self-powered fast-loading microfluidic chip using RT-LAMP to detect carrier viruses^[13]

图 2 病毒检测微流控系统

Fig. 2 Microfluidic system for virus detection

该系统将等温扩增、CRISPR 技术和侧向流动检测集成在一个封闭的微流体芯片中,当 RNA 病毒样本加入到微流控芯片后,通过侧向流动试纸,肉眼即可直接观测检测结果。这种操作简单、灵敏度高、成本低的微流控系统有望被推广应用到大规模的病毒筛查检测中。

目前常见的微流控系统通常需要外源驱动,所以动力供应会限制微流控技术的应用和发展。基于此,Yao 等^[13]设计了一种自供电快速加载微流控芯片(图 2-c),可同时检测裂谷热病毒、基孔肯亚病毒和登革热病毒 I、II、III 和 IV 亚型等 8 种病毒,无需外源驱动,50 min 内即可完成检测,灵敏度可达 50–100 copies/ μL 。Kim 等^[14]研究发现具有毛细作用力的纸基微流控在无外源驱动条件下即可实现对病毒的捕获和检测,利用其独有的特性开发了一种手持式纸基微流控系统,可直接捕获空气中的液滴进行检测。通过在空气中喷洒含有病毒的人类唾液样本来模拟自然环境,验证发现该系统从捕获病毒到智能手机完成数据分析总耗时 30 min。这项技术为提高微流控系统的病毒检测效率提供了新思路。

2.2 微流控技术检测细菌

细菌是许多疾病的病原体,可以通过皮肤、消化道、呼吸道、血液等方式传播疾病,具有较强的传染性^[15]。快速、高灵敏、高特异性的病原菌现场检测已成为迫切需要,现有的细菌检测方法存在操作繁琐、耗时长等问题,无法满足即时检测的需求;微流控芯片技术由于其小型化、便携性好和低试剂消耗,为各分析物提供了一种方便、快捷的检测工具。常见的基于微流控的细菌检测方法有阻抗检测法、表面蛋白检测法以及核酸检测法等方法。

微流控芯片上细菌的信号转导通常通过光学、声学、阻抗或电化学测量来实现,其中基于阻抗的芯片传感器具有响应快速、制造简单和灵敏度高等优点。近年来,基于阻抗的细菌芯片传感器得到了长足发展,其原理是通过检测细菌直接沉积在或穿过电极阵列而引起的阻抗变化实现对靶标的灵敏检测。Boehm 等^[16]展示了一种基于电阻抗的方法来同时识别和检测细菌的全功能微流控系统。当该系统感应腔表面被抗体功能化后,样品溶液中的细菌

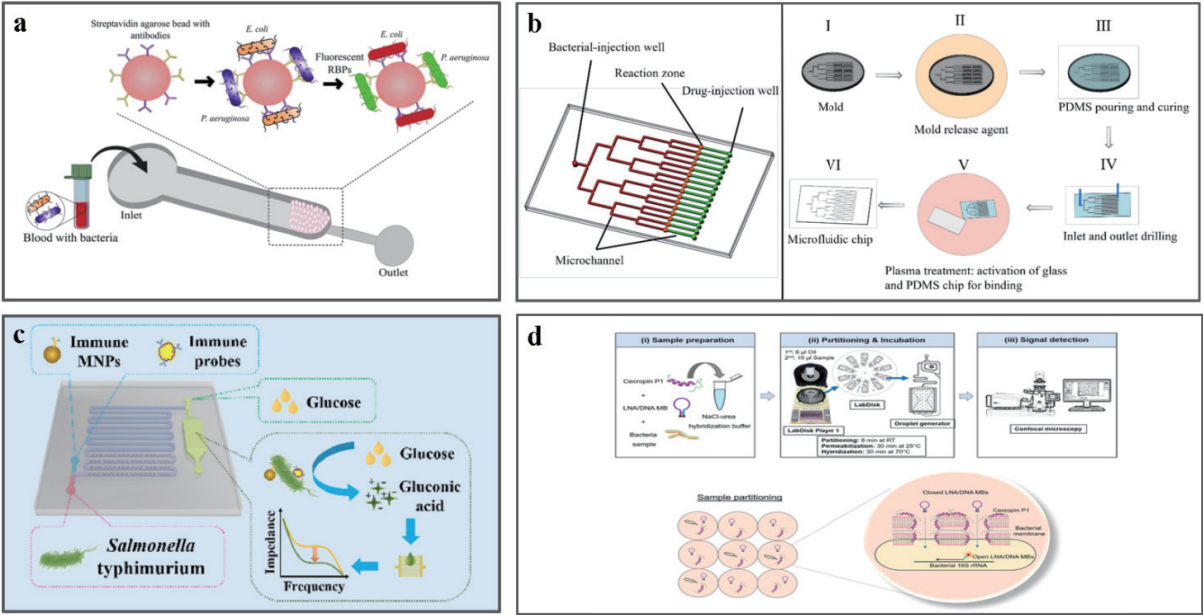
可以被选择性地捕获到测量腔内,从而增加了感应腔的电阻率,即可完成靶标菌的检测,该传感系统具有操作简单、选择性好及拓展性强等优点。

基于阻抗的细菌微流控检测法部分解决了传统基于培养检测方法存在的问题,但仍存在特异性和灵敏度不够的问题。而基于细菌表面抗体的微流控检测方法能特异、高效、快速地对体积复杂样本进行检测,且无需专业操作人员^[17]。基于此原理,Costa 等^[18]开发了一种基于高特异性受体结合蛋白(RBPs)的微流控识别系统(图 3-a),用于快速检测大肠杆菌和铜绿假单胞菌,该系统将两种重组 RBP(Gp54 和 Gp17)与不同的荧光蛋白融合,并通过测量获得的不同荧光信号实现对铜绿假单胞菌和大肠杆菌的灵敏检测,检测限达到 10^3 CFU/mL。为了进一步增加检测通量和灵敏度,Kim 等^[19]将蛋白偶联的荧光颗粒装载于纸基微流体芯片,并通过智能手机荧光显微镜计算颗粒聚集的程度,其对金黄色葡萄球菌的检测限为 10^2 CFU/mL,而大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的检测限达到 10 CFU/mL。随着病原菌高灵敏度检测需求的到来,Song 等^[20]提出了一种具有单细胞分辨率的微流控芯片系统(图 3-b),通过计数细胞而不是细菌斑块或浊度来跟踪细菌状态,检测时间从 2 h 缩短到约 30 min,实现了对致病菌的快速、高灵敏检测。

随着低浓度样本检测需求的出现,对微流控检测有了新的要求:高灵敏度和高选择性,基于核酸序列互补原理的核酸微流控系统因快速、精确的检测优势成为了热点研究技术。Sun^[21]团队开发了一种基于多信号放大策略的微流控化学发光生物传感器,通过细菌竞争性结合触发催化发夹组装(CHA)和催化反应,实现了多重信号扩增,其检测限低至 130 CFU/mL,耗时仅需 1.5 h,但是该方法只能实现定性检测。基于此,Liu 等^[22]在此基础上开发了一种基于免疫磁性分离、酶催化和电化学阻抗分析的微流控生物传感器(图 3-c),将细菌样品、被捕获抗体修饰的磁性纳米颗粒和被检测抗体和葡萄糖氧化酶修饰的酶探针同时添加到微流控芯片后,通过交叉指状微电极和电化学阻抗分析仪确定目标细菌浓度。整个检测过程耗时缩短至 1 h,最低检测限达到 73 CFU/mL,其不仅缩短了检测时间,提高了灵

敏度，而且还实现了定量检测。为了进一步提高灵敏度，Kao 等^[23]研究了一种新型的微流控免洗荧光原位杂交（FISH^[24]）液滴检测系统（图 3-d）。其将样品与试剂混合并装入微流体盒中，通过离心使微流体乳化，将样品制成微液滴用于细菌包封，使用

锁定核酸的 LNA/DNA 分子信标和基于 NaCl 尿素的杂交缓冲液，然后进行原位渗透、杂交和信号检测。该检测系统以大肠杆菌、肺炎克雷伯菌和奇异变形杆菌为对象进行验证，检测限为 3×10^3 bacteria/mL，该系统达到单细胞灵敏度水平。



a : 用于血液中大肠杆菌和铜绿假单胞菌的多重检测的微流控平台^[18]；b：用于检测单细胞水平耐药性的微流控芯片^[20]；c：基于磁分离、酶催化和电化学阻抗分析的鼠伤寒沙门氏菌微流体生物传感器^[22]；d：使用 LNA/DNA 分子信标进行细菌检测和绝对定量的一锅数字微流控系统^[23]
a: Microfluidic platform for multiple detection of *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in blood^[18]. b: Microfluidic chip for detecting drug resistance at single cell level^[20]. c: *Salmonella typhimurium* microfluidic biosensor based on magnetic separation, enzyme catalysis and electrochemical impedance analysis^[22]. d: One-pot digital microfluidic system using LNA/DNA molecular beacons for bacterial detection and absolute quantification^[23]

图 3 细菌检测微流控系统
Fig. 3 Microfluidic system for bacterial detection

2.3 微流控检测其他病原微生物

除病毒、细菌等常见病原微生物检测外，微流控技术近年来也被广泛应用于真菌、支原体及衣原体等其他病原微生物的检测研究。

真菌感染可导致严重的临床结果，如引发多器官衰竭和感染性休克，因此对真菌的快速检测是治疗真菌感染疾病的关键^[25]。常规真菌检测方法包括血培养、平板培养和聚合酶链式反应，这些方法普遍存在耗时长、检测设备昂贵等问题。随着微流控芯片技术的发展，科学家将微流控芯片与真菌检测相结合，实现了更高的检测效率和准确性。Soares 等^[26]报道了一种新型的超快速单步荧光竞争性免

疫分析方法，利用微流控室中固定的、经功能化纳米多孔琼脂糖珠修饰的蛋白质来检测黄曲霉素 B₁，检测时间为 2 min，检测限为 1 ng/mL。为了实现对真菌的灵敏检测，Schell 等^[27]开发了一种数字微流控实时 PCR 平台，用于检测血液中白色念珠菌的 DNA，与金标准法相比，总灵敏度达到 94%。随着各种真菌毒素特异性单克隆抗体的开发以及针对单一或多种真菌毒素的免疫亲和柱的建立，微流控芯片高通量、高灵敏度、灵巧和快速的优势将在真菌的同步检测中更加突出。

支原体致病机制为支原体顶端吸附于细胞表面，将其微管侵入细胞，从而夺取细胞营养物质，再释

放出过氧化氢等引发细胞溶解、坏死,导致炎症发生。其主要的检测方法有培养法、血清法及 PCR 等方法,存在操作繁琐、需要专业操作人员及周期长等问题。Wulff-Burchfield 等^[28]基于 PCR 平台构建出的快速、便携和全自动的微流控实时检测系统,通过生物素化捕获探针和链霉素和素偶联磁珠联合 Taqman 探针和引物,对咽拭子样本中的肺炎支原体特异性 DNA 进行快速检测,准确率达到 98%,该微流控平台与 PCR 灵敏度一致,但速度提高了 3 倍,为肺炎支原体检测侧提供了一种准确且灵敏的检测方法。为了进一步提高微流控系统对支原体的检测效率,Wang 等^[29]设计了一种 3D 打印微流体系统,通过在 PCR 室预加载指定的引物和探针,80 min 内完成了对肺炎支原体及其突变型的灵敏检测。该系统具有操作简单、速度快等优点,为感染现场和医院急诊科提供了一种快速、便携的检测手段。

衣原体是一种专性细胞内病原体,是当今世界上细菌性传播疾病发病率最高的病原体,根据世界卫生组织统计,全球每年有超过 1 亿例衣原体感染病例发生。衣原体筛查最常用的检测方法是核酸扩增试验,这种方法具有良好的敏感性和特异性,但只能在专门的实验室中完成,且需要一天甚至更长时间才能得出结果。因此,迫切需要一种敏感、快速且具有成本效益的诊断方法。基于此,Dean 等^[30]等开发了一种基于微流体的多重检测沙眼衣原体的方法,该微流控系统在 20 min 的扩增反应中同时检测出 9 个沙眼衣原体位点,实现了对衣原体病菌的快速检测。为了实现多靶标同步检测,Ye 等^[31]建立了一个多功能微流控核酸诊断系统,其在单个集成的微流控芯片上完成了核酸的纯化、分离、扩增和检测。该微流控系统高度自动化,能直接从泌尿生殖道分泌物中同时检测出沙眼衣原体、淋病奈瑟菌、人支原体和解脲支原体。其诊断效果与 PCR 一致,从样本提取到结果分析总耗时不到 50 min。这种具有高度集成、自动化、无需预处理样本的新型衣原体诊断工具,可以改善性传播疾病的预防和控制状况,实现早诊断早治疗。

2.4 小结

微流控平台在经历了芯片设计的蓬勃发展后,

随着近几年新型检测技术不断涌现,流体机理理论也日趋成熟和完备。目前,已发展出三大主流应用技术:微流控芯片技术,以及基于微流控芯片技术发展而来的液滴微流控技术和纸基微流控技术。这些技术在病原微生物的快速检测中实现了多功能集成、高通量和无能耗自驱动的功能,展现了微流控技术在单细胞分析水平中的发展前景。

从整个微流控技术领域的发展角度来,未来随着材料科学与电子测量技术的发展,多重信号放大融合的多靶标检测的微流控平台可能开辟出更有发展应用前景的 POCT 新途径:(1)多纳米技术与新材料的融合。临床诊断和环境监测中的许多样品都比较复杂,其中存在多种不同的物质,由于背景信号较强,可能会干扰检测过程。集成先进的纳米技术有利于样品的富集,同时选择用于信号转换的材料可以大大提高微流控传感的效率。(2)同时分析多种不同类型重要生物标志物。在临床诊断、治疗和预后中,进行多靶标检测以确保准确评估是必不可少的。因此,将蛋白质、核酸等多种生物标志物的检测以全自动的方式整合到一个平台上,不仅可以在不同层面提供有价值的疾病信息,提高检测的可信度,还可以促进 POCT 的实际应用。合理设计的微流控芯片,结合先进的检测技术和多功能材料,有望实现广泛的临床应用。

3 总结与展望

3.1 微流控检测病原微生物的优势

与传统的病原微生物检测方法相比,微流控检测技术极大地提升了检测便利化水平。例如,针对乙肝病毒检测和基因分型存在操作复杂、耗时间长的问題,多功能集成离心式微流控平台的出现,成功地基于全血样本一步实现了血清分离、吸附、洗涤、洗脱、检测 DNA 等一系列功能,极大地缩短了检测时间,提升了诊疗效率^[32];而自供电快速加载微流控芯片的研发实现了对包括登革热病毒在内的 8 种病毒的同时检测,显著地提高了检测通量,缩短了诊断时间^[13],让在野外或者医疗条件差的偏远地区亦可实现对致病病菌的快速自助检测。总之,微流控的优点主要包括:(1)集多个检测步骤于一体,在微流控芯片上进行反应,操作更加便捷,将

实验室功能整合到微流控平台上,实现了检测自动化、一体化;(2)封闭式自动化管理不仅减少了污染,保证了安全,同时微通道多样性满足了对不同病原体的检测需求,保证了各通道的独立性,在实现快速检测的同时能够对多个靶标进行检测,具有高通量性;(3)基于微流控技术的病原微生物检测减少了对实验环境的要求,降低了对专业技术人员的依赖,极大地提高了对突发公共卫生事件的处理效率和可靠性。基于病原微生物检测的微流控技术发展迅速,弥补了传统检测技术的缺陷,使得病原微生物的检测朝着即时、快速分析、自动化、高通量、高特异性、高精度、无损便携、低成本和便捷化方向发展。

3.2 存在的问题及发展前景

微流控检测装置是微流控检测系统的核心,其开发的难点在于,必须根据病菌的特点量身设计微流控装置或芯片的结构,同时实现高灵敏度和高精度检测。基于此,微流控技术还需要在以下几个方面进行改进:(1)在保证细胞活力方面,一些微流控装置不能完全保证靶细胞的内部结构成分不被破坏,增加了精确检测细胞的难度,需要根据靶细胞特性精确结构设计。(2)在自动化方面,目前系统设计、样品装样、细胞培养、数据采集和分析的全过程消耗掉大量的时间和人力,需要提高微流控系统的自动化程度。(3)在成本方面,目前微流控的开发成本较高,多数微流控研究成果还停留在实验室,无法推广应用。因此,开发便携、低成本的微流控装置是成果转化的关键。(4)在质量控制方面,目前微流控检测技术尚缺乏成熟的管理体系和统一的行业标准,因此需要进一步提高精确度和稳定性助力临床推广应用,建立行业标准。

最近,机器学习和数学建模等人工智能工具从更新的角度分析病原菌给微流控技术带来了前所未有的机会。基于数学建模建立单拟合参数的适用数学模型,探索某一细菌在表面积体积比方面特有的动态特性,实现对表面积和体积合成适应之间时间延迟的预测,进而作为微流控系统检测其他病菌的适用策略。此外,还可以将待测细胞与计算机连接,建立一个网络遗传系统,进而实现细胞周期的自动

同步。因此,我们认为优化微流体与人工智能算法的结合可能是未来潜在的发展趋势,对促进疾病检测、环境监测、食品安全检测等多领域的快速发展具有重要意义。

参考文献

- [1] Zhang DX, Bi HY, Liu BH, et al. Detection of pathogenic microorganisms by microfluidics based analytical methods [J]. *Anal Chem*, 2018, 90 (9): 5512-5520.
- [2] Trinh TND, Lee NY. Advances in nucleic acid amplification-based microfluidic devices for clinical microbial detection [J]. *Chemosensors*, 2022, 10 (4): 123.
- [3] Fernandes AC, Semenova D, Panjan P, et al. Multi-function microfluidic platform for sensor integration [J]. *N Biotechnol*, 2018, 47: 8-17.
- [4] Ahmed I, Akram Z, Bule M, et al. Advancements and potential applications of microfluidic approaches—a review [J]. *Chemosensors*, 2018, 6 (4): 46.
- [5] Ait M L, Mozokhina A, Tokarev A, et al. Virus replication and competition in a cell culture: application to the SARS-CoV-2 variants [J]. *Appl Math Lett*, 2022, 133: 108217.
- [6] Li X, Zhao XY, Yang WH, et al. Stretch-driven microfluidic chip for nucleic acid detection [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118 (9): 3559-3568.
- [7] Su WD, Qiu JJ, Mei Y, et al. A microfluidic cell chip for virus isolation via rapid screening for permissive cells [J]. *Virol Sin*, 2022, 37 (4): 547-557.
- [8] Saraf N, Villegas M, Willenberg BJ, et al. Multiplex viral detection platform based on a aptamers-integrated microfluidic channel [J]. *ACS Omega*, 2019, 4 (1): 2234-2240.
- [9] Guan XJ, Wu F, Mao M, et al. A microfluidic platform for the ultrasensitive detection of human enterovirus 71 [J]. *Sens Actuatur Rep*, 2021, 3: 100046.
- [10] Eivazzadeh-Keihan R, Pashazadeh-Panahi P, Mahmoudi T, et al. Dengue virus: a review on advances in detection and trends - from conventional methods to novel biosensors [J]. *Mikrochim Acta*, 2019, 186 (6): 329.
- [11] Tian F, Liu C, Deng JQ, et al. A fully automated centrifugal microfluidic system for sample-to-answer viral nucleic acid testing [J]. *Sci China Chem*, 2020, 63 (10): 1498-1506.

- [12] Li ZY, Ding X, Yin K, et al. Instrument-free, CRISPR-based diagnostics of SARS-CoV-2 using self-contained microfluidic system [J] . *Biosens Bioelectron*, 2022, 199: 113865.
- [13] Yao YH, Zhao N, Jing WW, et al. A self-powered rapid loading microfluidic chip for vector-borne viruses detection using RT-LAMP [J] . *Sens Actuat B*, 2021, 333: 129521.
- [14] Kim S, Akarapipad P, Nguyen BT, et al. Direct capture and smartphone quantification of airborne SARS-CoV-2 on a paper microfluidic chip [J] . *Biosens Bioelectron*, 2022, 200: 113912.
- [15] Zhang Y, Hu XZ, Wang QJ. Review of microchip analytical methods for the determination of pathogenic *Escherichia coli* [J] . *Talanta*, 2021, 232: 122410.
- [16] Boehm DA, Gottlieb PA, Hua SZ. On-chip microfluidic biosensor for bacterial detection and identification [J] . *Sens Actuat B*, 2007, 126 (2) : 508-514.
- [17] Mairhofer J, Roppert K, Ertl P. Microfluidic systems for pathogen sensing: a review [J] . *Sensors*, 2009, 9 (6) : 4804-4823.
- [18] Costa SP, Caneira CRF, Chu V, et al. A microfluidic platform combined with bacteriophage receptor binding proteins for multiplex detection of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in blood [J] . *Sens Actuat B*, 2023, 376: 132917.
- [19] Kim S, Romero-Lozano A, Hwang DS, et al. A guanidinium-rich polymer as a new universal bioreceptor for multiplex detection of bacteria from environmental samples [J] . *J Hazard Mater*, 2021, 413: 125338.
- [20] Song KN, Yu ZQ, Zu XY, et al. Microfluidic chip for detection of drug resistance at the single-cell level [J] . *Micromachines*, 2022, 14 (1) : 46.
- [21] Sun DL, Fan TT, Liu F, et al. A microfluidic chemiluminescence biosensor based on multiple signal amplification for rapid and sensitive detection of *E.coli* O157: H7 [J] . *Biosens Bioelectron*, 2022, 212: 114390.
- [22] Liu YJ, Jiang D, Wang SY, et al. A microfluidic biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium* based on magnetic separation, enzymatic catalysis and electrochemical impedance analysis [J] . *Chin Chem Lett*, 2022, 33 (6) : 3156-3160.
- [23] Kao YT, Calabrese S, Borst N, et al. Microfluidic one-pot digital droplet FISH using LNA/DNA molecular beacons for bacteria detection and absolute quantification [J] . *Biosensors*, 2022, 12 (4) : 237.
- [24] Cao DJ, Wu S, Xi CL, et al. Preparation of long single-strand DNA concatemers for high-level fluorescence *in situ* hybridization [J] . *Commun Biol*, 2021, 4 (1) : 1224.
- [25] Zhou WT, Le J, Chen Y, et al. Recent advances in microfluidic devices for bacteria and fungus research [J] . *Trac Trends Anal Chem*, 2019, 112: 175-195.
- [26] Soares RRG, Santos DR, Pinto IF, et al. Point-of-use ultrafast single-step detection of food contaminants: a novel microfluidic fluorescence-based immunoassay with integrated photodetection [J] . *Procedia Eng*, 2016, 168: 329-332.
- [27] Schell WA, Benton JL, Smith PB, et al. Evaluation of a digital microfluidic real-time PCR platform to detect DNA of *Candida albicans* in blood [J] . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31 (9) : 2237-2245.
- [28] Wulff-Burchfield E, Schell WA, Eckhardt AE, et al. Microfluidic platform versus conventional real-time polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens [J] . *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 67 (1) : 22-29.
- [29] Wang AY, Wu ZH, Huang YH, et al. A 3D-printed microfluidic device for qPCR detection of macrolide-resistant mutations of *Mycoplasma pneumoniae* [J] . *Biosensors*, 2021, 11 (11) : 427.
- [30] Dean D, Turingan RS, Thomann HU, et al. A multiplexed microfluidic PCR assay for sensitive and specific point-of-care detection of *Chlamydia trachomatis* [J] . *PLoS One*, 2012, 7 (12) : e51685.
- [31] 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 [J] . *Talanta*, 2021, 221: 121462.
- [32] Li L, Miao BG, Li Z, et al. Sample-to-answer hepatitis B virus DNA detection from whole blood on a centrifugal microfluidic platform with double rotation axes [J] . *ACS Sens*, 2019, 4 (10) : 2738-2745.

(责任编辑 朱琳峰)