

引用格式: 李鑫, 尚林东, 陈福原, 等. 基于微流控技术的等温核酸即时检测系统[J]. 中国测试, 2023, 49(11): 7-15. LI Xin, SHANG Lindong, CHEN Fuyuan, et al. A real-time isothermal nucleic acid detection system based on microfluidic technology[J]. China Measurement & Test, 2023, 49(11): 7-15. DOI: 10.11857/j.issn.1674-5124.2022100117



基于微流控技术的等温核酸即时检测系统

李 鑫^{1,2}, 尚林东^{1,2}, 陈福原^{1,2}, 包晓栋^{1,2}, 邵 帅^{1,2}, 李 备^{1,2,3}

(1. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130028; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 长春长光辰英生物科学仪器有限公司, 吉林 长春 130033)

摘 要: 肆虐全球近三年的新型冠状病毒肺炎对人类健康构成全球威胁。为更加快速准确地检测鉴定新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, Covid-19), 该文提出一种基于离心式微流控芯片和比色环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)的集成化智能检测系统。检测系统主要包括微流控芯片、一步上样管、红外温控系统和光电探测器, 可以完成对检测样本的定量进样、等温扩增和实时吸光度检测等操作。该文以 Covid-19 流行病毒 RNA 模板为实验对象, 对该检测系统进行实际表征和优化, 使用 LDA、SVM 聚类分析算法对结果进行实时判定。最终实验结果表明: 该检测系统的检测限为 200 copies/mL, 完全满足现阶段新冠病毒实际检测的现实要求。

关键词: 微流控; LAMP; Covid-19; 实时检测; 聚类分析

中图分类号: N34; TB9

文献标志码: A

文章编号: 1674-5124(2023)11-0007-09

A real-time isothermal nucleic acid detection system based on microfluidic technology

LI Xin^{1,2}, SHANG Lindong^{1,2}, CHEN Fuyuan^{1,2}, BAO Xiaodong^{1,2}, SHAO Shuai^{1,2}, LI Bei^{1,2,3}

(1. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130028, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Changchun Hooke Instrument Co., Ltd., Changchun 130033, China)

Abstract: Corona Virus Disease 2019, which has ravaged the world for nearly three years, poses a global threat to human health. To identify Covid-19 with a faster and more accurate test, an integrated intelligent detection system based on centrifugal microfluidic chips and colorimetric loop-mediated isothermal amplification was presented in this paper. The detection system mainly includes microfluidic chip, one-step sample tube, infrared temperature control system and photodetector, which can complete quantitative sampling, isothermal amplification and real-time absorbance detection of the detected samples. In this paper, the Covid-19 pandemic virus RNA template was used as the experimental object, the actual characterization and optimization of the detection system were carried out, and LDA and SVM clustering analysis algorithms were used for real-time judgment of the results. The final experimental results show that the detection limit of this detection system is 200 copies/mL, which fully meets the practical requirements of Covid-19 detection at the present stage.

Keywords: microfluidic; LAMP; Covid-19; real-time detection; cluster analysis

收稿日期: 2022-10-24; 收到修改稿日期: 2022-12-28

作者简介: 李 鑫(1996-), 男, 内蒙古鄂尔多斯市人, 硕士, 研究方向为微流控疾病检测。

通信作者: 李 备(1983-), 男, 陕西宝鸡市人, 研究员, 博士, 研究方向为单细胞分选、拉曼光谱。

0 引言

在漫长的人类历史中, 传染性呼吸道疾病的传播对全世界造成了难以估量的损失^[1-2]。从 3200 多年前的流感疾病, 到 20 世纪初的西班牙流感^[3], 再到 2003 年的非典型肺炎, 乃至 2019 年开始肆虐全球的新冠肺炎^[4-5], 无不广泛而深远地影响着世界。因此, 呼吸道病毒快速检测和鉴定对于降低其传播率和死亡率是非常必要的。

目前检测方法主要分为抗体-抗原检测和核酸检测^[6]。其中, 基于抗体-抗原的检测方法主要有酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[7] 和侧向层析检测 (lateral-flow strip assays)^[8-9], 其具有检测快速和成本较低的特点, 但其敏感性较差, 易因多种原因影响产生假阳或假阴性结果^[8], 这限制了它在临床上的发挥。核酸检测主要是指基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)^[10] 技术的一类检测方法。其具有特异、敏感、产率高等特点, 但是反应时间较长、前处理步骤复杂, 同时对热循环设备精度要求也较高, 这对某些即时检测 (point-of-care testing, POCT) 应用是难以接受的。近年来快速发展的等温核酸扩增技术为我们打开了思路。其中, 环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 因其在等温扩增检测方法中灵敏度高、特异性强被广泛关注, 是目前最具前景的 PCR 替代方法^[4, 11-15]。

基于微流控和 LAMP 技术的新型检测设备因为其快速、高效、敏感、低消耗的特点, 被广泛认为是具有广阔前景的 POCT 诊断工具。然而, 这些方法却有着一定的局限性。如, Hau Van Nguyen 等^[16] 提出了高通量离心芯片提取核酸和 LAMP 反应相结合, 可使基因组 DNA 提取在 10 min 内完成。然而该结构使用了大量较为复杂的被动阀, 整个系统操作较为复杂, 不适合用于医院或社区的使用。Kuldeep Sanger 等^[17] 以大肠杆菌生产的对香豆酸 (p-Coumaric acid, pHCA) 为模型系统, 开发了一种用于生物代谢过程监测的碟式实验室 (Lab-on-a-Disc, LoD) 装置, 该装置易于使用且紧凑。通过使用在塑料 (PMMA) 基板上制备的金电极的方法, 集成样本预处理和电化学检测。采用方波伏安法, pHCA 可在 0.125~2 mmol/L 范围内线性定量。然而, 系统要求的芯片结构过于复杂, 加工工艺难度较高, 成本极高, 难以应用于 POCT。Meisam

Madadi 等^[18] 提出了一种基于 LoD 平台的从全血中分离人白细胞 (white blood cell, WBC) 的新方法, 采用毛细管和虹吸阀集成控制液体流动。一步分离细胞分离液中的选择性沉淀, 无需标记。然而使用细胞分离液培养基分离单核细胞 (mononuclear cells, MNCs) 和中性粒细胞时, 纯度分别为 83% 和 96%, 整个系统对于白细胞的纯化效率较低, 也没有简化操作流程。除以上缺点, 集成微流控装置的气泡以及热控问题也是一大难题。气泡不仅会影响结果的判读, 还有可能对反应过程造成影响。热控加热器选择不当也会造成许多问题, 如最常见的电热加热虽然使用方便容易集成, 但有较高的热质量, 会导致温度变化慢。化学或物理加热有些则直接接触样本影响反应过程。

受以上启发, 为了规避人为行为在检测实验中的影响, 同时提升检测效率, 降低检测成本, 本文提出一种基于微流控和 LAMP 技术的“样本进-结果出”的全流程核酸检测系统。该系统能够在 30 min 内完成现场病原体检测, 包括一步上样、微流离心、红外光学加热、LAMP 扩增、光学检测分析等。最终对检测结果进行 SVM、LDA 算法建模分析, 实时给出检测结果。为了进一步体现检测系统的性能, 本文在相同条件下使用相同样品与市面上常见的商品级 LAMP 检测仪检测结果进行对比。

1 材料和方法

1.1 微流芯片系统的设计和制造

LAMP 微流控芯片的结构如图 1(a) 所示。该检测系统由一步上样管和检测芯片组成。一步上样管包括三部分: 定量按压装置、单向阀装置与定量罐腔室。定量按压装置包括按压盖、按压柱、弹簧以及定量腔室。单向阀装置由微型鸭嘴阀、微通道底座以及密封圈组成。一步上样管除弹簧、密封圈等通用零件外均由 3D 打印而成, 材质为 ABS 塑料 (acrylonitrile butadiene styrene plastic, ABS)。微流控检测芯片制作所需的主要材料有 PDMS 硬质板材和压敏膜 (pressure-sensitive adhesive, PSA)。芯片由芯片顶层、芯片基底和芯片底层三层组合而成, 由 PSA 粘接, 如图 1(b) 所示。其中, 芯片顶层和芯片底层厚 3 mm, 芯片基底厚 2 mm, 质量 60 g。芯片顶层气孔直径为 1 mm, 连通腔室的通道宽度为 300 μm , 深为 300 μm , 4 个反应单元彼此间的相差均为 90°, 以确保离心分流均匀。PDMS 上所有微

结构图案深度均为 300 μm 。使用 3D CAD 软件 (Solidworks 2021) 设计绘制一步上样管主要结构, 如图 1(c) 所示。其原理是, 按压时按压柱和定量罐腔室之间的体积减小, 压缩复位弹簧, 从而通过排气控制溶液的挤出量, 使液体的挤出量为定量 (质量约 35 g), 此外, 单向阀装置的作用是防止检测样本试剂回流, 控制试剂蒸发。

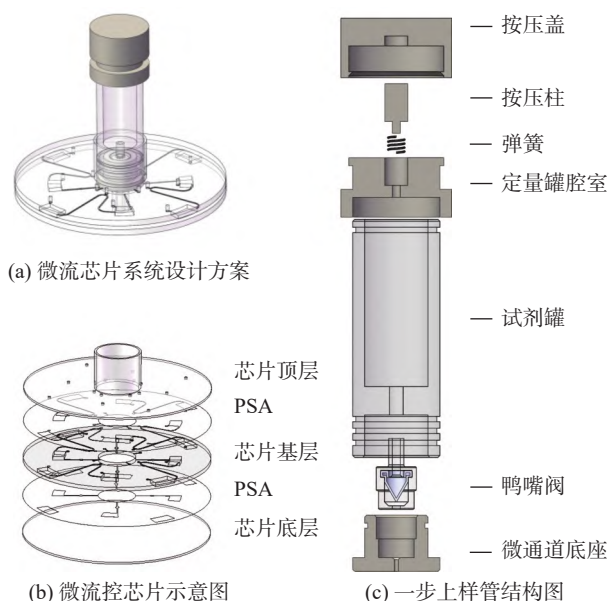


图 1 微流芯片检测系统

以有 4 个反应单元的芯片基层为例, 介绍芯片的进样反应过程。芯片上 4 个反应检测单元具有完全一样的结构和布局, 即所有微通道及腔室都呈螺旋状, 分别均匀分布于芯片上, 每个单元的进样均由中心区域统一进样, 每条进样通道都包含两个 LAMP 腔室。当芯片处于初始状态时, 样品由中心区域通过离心力突破毛细阀进入样本试剂混合区, 通过芯片正逆交替旋转及超声震动物理提取病毒 RNA, 并使冻干试剂与样本溶液充分混合。接着降低转速, 直至混合溶液流至虹吸阀顶部后, 提高转速, 混合溶液通过虹吸阀进入反应观测室, 芯片持续旋转, 通过红外 LED 进行红外无接触式加热, 并对反应检测区进行双光路光电吸光度检测。

芯片在封装前用乙醇和去离子水冲洗所有芯片, 之后将芯片用氮气干燥, 在试剂混合腔室置入冻干试剂与阳性质控, 用 PSA 粘接三层芯片, 使用硅胶密封; 最后在微流芯片上粘贴 PTFE 防水透气膜。通过将 PTFE 膜加工成很小的贴片, 以达到和微流控芯片的高兼容性, 其具有极高的病毒过滤效率, 同时防水透气, 可以降低系统的气溶胶污染问题。

该检测系统的优势在于集成操作步骤, 减少检测系统人为操作误差, 降低对人为操作的依赖性, 提高检测系统的效率, 从而优化检测系统, 提高准确率。

1.2 LAMP 检测系统设计

LAMP 检测系统由上位机、微流芯片检测系统、红外 LED (100 W, 940 nm)、LED (LED430L, LED560L, Thorlabs)、光电探测器 (SM05PD2A, Thorlabs)、红外测温探头 (BRW600-400A)、直流步进电机 (PKP223D15A2, Oriental motor)、数据采集卡 (USB-6003, National Instruments)、控制电路和信号放大电路 (反向放大器, 200 倍) 组成 (图 2)。

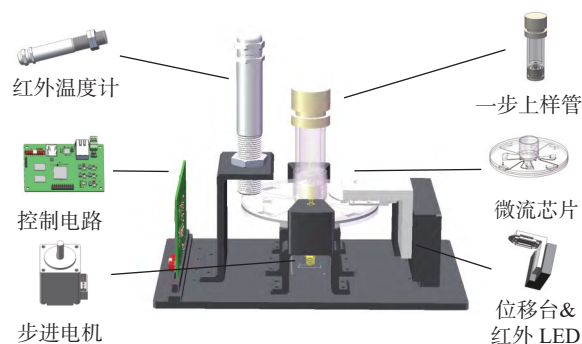


图 2 微流芯片检测系统

其主要工作流程如图 3 所示, 上位机通过串口向控制电路发送指令, 修改电机的各项参数 (速度、加速度等)、启动及停止电机, 实现对芯片的转动控制和光学检测系统的控制。样本溶液在离心力作用下由中心位置转移至芯片混合室, 与冻干试剂融合、离心混匀, 之后通过先降低转速再提高转速, 使混合溶液通过虹吸阀, 进入微流芯片检测室。最后在检测室进行扩增和吸光度检测。此外, 检测时 LED 光源非持续性发光, 采用旋转检测方式, 芯片上 4 个单元逆时针依次经过检测位置, 单片机控制光源开启, 光源通过透镜汇聚照射到光电探测器, 经信号放大模块放大后, 通过 USB-6003 数据采集卡上传数据, 并进行实时分析。

1.3 材料及方法

1.3.1 材料

样本: Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3), 102023, Twist Bioscience; Sterile Water (DNA/RNase-Free), GeneSc Bio-tech。

试剂耗材: 新冠快检试剂 Novel Coronavirus 2019-nCov Rapid Detection Kit (LAMP) -OQ8/16T,

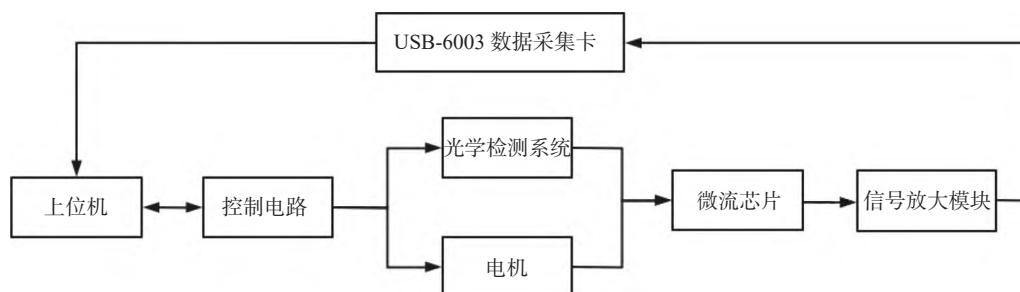


图3 微流芯片检测系统工作流程图

捷诺圣华。

仪器：微流控等温核酸检测平台、GE-96LAMP 仪。

1.3.2 方法

使用新冠快检试剂，以 Twist Synthetic SARS-CoV-2 阳性质控为样本，将其稀释到 8000 copies/mL, 4000 copies/mL, 2000 copies/mL 三份，以无菌水作为阴性对照（无菌水）进行实验。使用微流控等温核酸检测平台，同时使用 GE-96LAMP 仪作为对照。该实验主要测试微流控等温核酸检测平台温控-扩增能力和仪器判读结果能力。

使用离心式微流控系统应用构建好的 LAMP 可视化检测方法，以目标病毒（新型冠状病毒 RNA）为阳性模板，以非目标（MERS 病毒、金黄色葡萄球菌、坂崎肠杆菌、H1N1 病毒）作为待测样本模板，无菌水作为阴性对照（NTC）进行特异性验证。

1.4 样本预处理及实验流程

具体的实验流程如下：检测前将冻干小球以及带有阳性质控的冻干小球提前装入相应的混合腔室，冻干小球包括 Bst DNA 聚合酶、内引物 FIP、BIP、内引物 F3、B3、dNTPs、反应缓冲液等 LAMP 反应混合物。将无菌水和稀释后的 Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA 装入一步上样管内。通过机械按压将样本与无菌水的混合液定量通过鸭嘴阀运输到微流芯片预置腔内，然后芯片进行离心回转。当芯片转速为 450 r/min 时，样本溶液突破毛细阀均匀分流至混合腔内；在混合腔内，冻干试剂溶解，经电机带动芯片在 300 r/min 正反转变化 10 s 进行混合。待冻干试剂和样本溶液充分混合后，电机转速转变为 50 r/min，使反应溶液充分填充虹吸阀通道；之后提高转速到 600 r/min，使反应溶液进入检测腔室内；当混合液体进入检测腔时，使用红外 LED（100 W, 940 nm）加热微流芯片，进行实时恒温 LAMP 反应，观察实时光电信号扩增曲线。通过集成光电传感器

进行比色分析，并在电脑上进行显示，整个过程在 30 min 内自动完成，快于传统的 PCR 设备。

2 结果与讨论

2.1 LAMP 检测系统的特点

在 Covid-19 检测实验之前，对微流控检测系统的性能进行评估。首先是一步上样管的试剂定量作用，每个混合腔室的 LAMP 反应体系容量是 25 μL ，共 4 个反应腔，共计 100 μL 。由于上样管长期使用，会使弹簧弹力发生变形，加之本身是塑料，不耐摩擦，因而会产生误差。使用称重法对一步上样管的准确性进行检测，在室温为 20 $^{\circ}\text{C}$ 的室内，采用双蒸水（密度 0.9982 kg/m^3 ）和称量容器及高灵敏度分析天平对上样管进行检测。表 1 为称重法各液滴质量及其体积，实验发现，定量挤压的效果良好。

表1 称重法液滴质量及其体积

液滴编号	质量/mg	体积/ μL	液滴编号	质量/mg	体积/ μL
1	99.021	99.2	6	97.025	97.2
2	109.802	110	7	95.029	95.2
3	99.021	99.2	8	93.831	94
4	97.824	98	9	93.831	94
5	97.824	98	10	92.633	92.8

LAMP 检测需要 60~65 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温，因此对热控制模块^[19]（用光电温度计（SD-947, Reed Instruments, USA））进行测量和记录。实验发现该模块的升温速率为 2.2 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ，温度波动在 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ ，其误差分布图^[20]如图 4 所示。

市面主流 PCR 设备的升温速率如表 2 所示。相对于商业级的核酸扩增设备^[21-24]来说，该升温速率是可以接受的，并且优于其他低成本的便携式加热设备（袖珍加热器^[25]或即时加热包^[26]）。

2.2 光学吸光度检测分析性能

检测系统采用双通道吸光度^[27]检测，可消除单

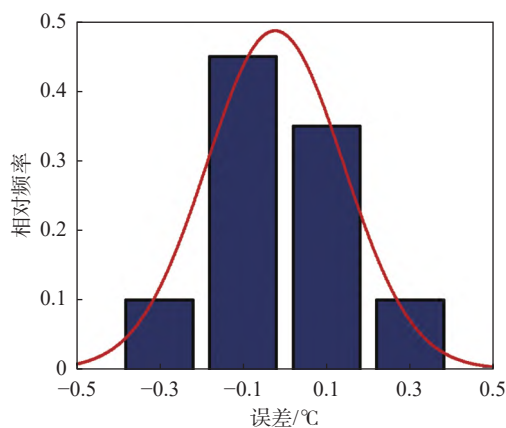


图 4 微流检测系统温控误差分布

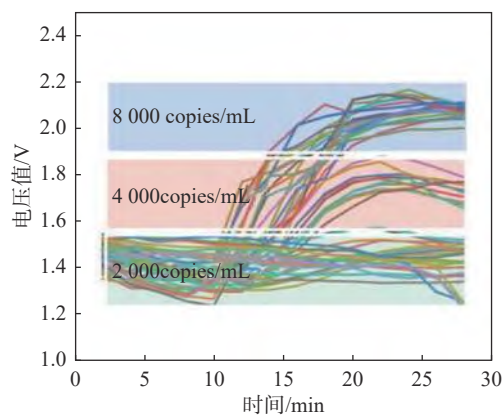
表 2 商业级核酸扩增设备升温速率

型号	7300	7500	Stepone plus	LightCycler 480 II	Viiia	CFX96
上市年份	2004	2004	2007	2008	2010	2018
升温速度/($^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$)	1.6	2.5	5.5	4.6	5.5	5

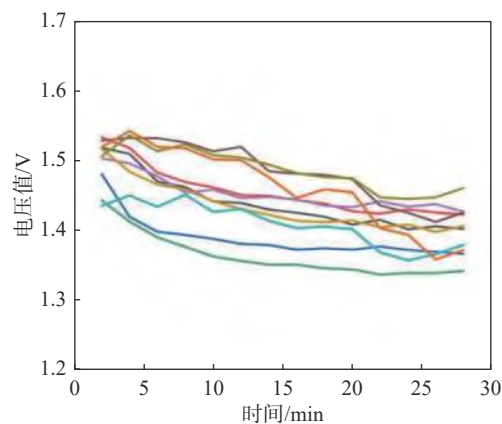
色光源测量引起的误差, 其主/副波长为 430 nm/560 nm^[28], 分析方法为全流程检测法。

采用 LAMP 微流检测系统检测了不同浓度的 SARS-CoV-2 RNA 阳性质控在波长 430、560 nm LED 光源照射下光电信号变化趋势。其中图 5 为不同样本在不同光源照射下光电信号变化图。测试中, 阴性样本 20 个, 阳性样本有 80 个, 浓度为 8000 copies/mL 的样本有 40 个, 4000 copies/mL 和 2000 copies/mL 的样本各 20 个。图 5(a)和图 5(b)分别为阳性样本和阴性对照在 560 nm 光源照射下光电信号变化图。由图可知, 阳性样本在波长 560 nm 的绿色光源照射下, 电压随着 SARS-CoV-2 RNA 阳性质控的浓度的增加而提高; 阴性对照电压值平稳下降。波长 430 nm 光源照射则反之, 阳性样本在波长 430 nm 的蓝色光源照射下, 电压平稳下降; 阴性对照电压值平稳上升, 如图 5(c)和图 5(d)。

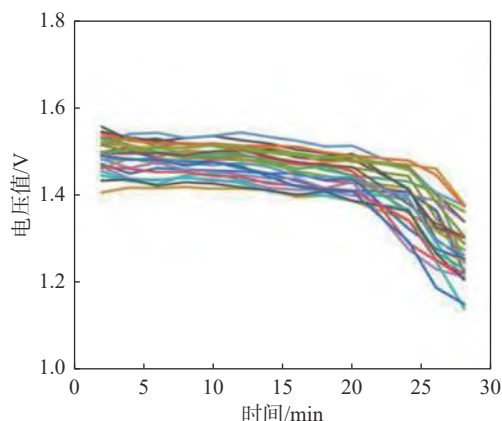
为了更好地进行检测判别, 需消除检测系统中的误差(如电压、温度、结构定位精度、光路稳定性等因素), 对光电信号进行了归一化处理, 使数据变得具有可比性, 同时保持数据之间的相对关系。



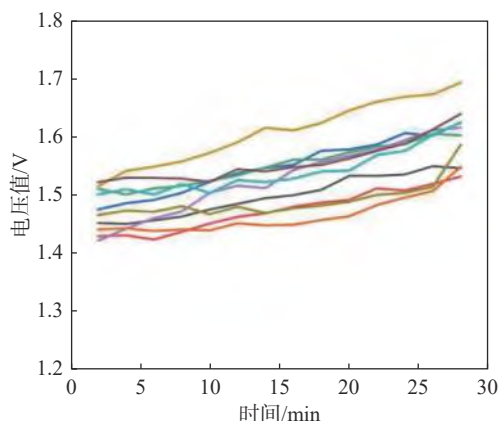
(a) 560 nm 光源下阳性样本光电信号变化



(b) 560 nm 光源下阴性样本光电信号变化



(c) 430 nm 光源下阳性样本光电信号变化



(d) 430 nm 光源下阴性样本光电信号变化

图 5 不同光源下阴阳性样本光电信号变化趋势图

图 6 为不同阳性样本在 560 nm 的绿色光源照射下光电信号变化趋势图。

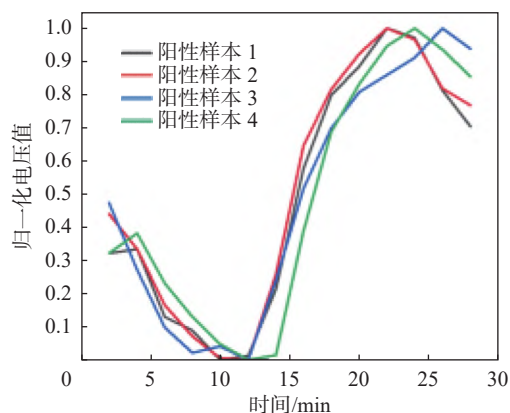
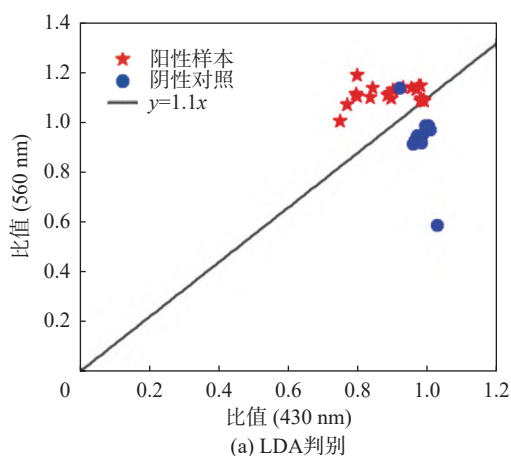


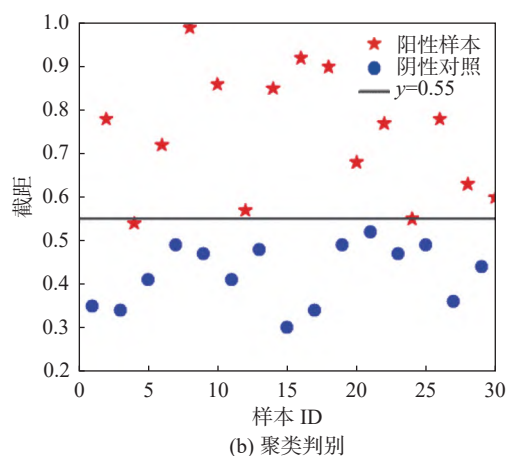
图 6 560 nm 光源下阳性样本电压值变化归一化数据

图 7 为 LAMP 检测系统阴阳性判别结果图。其中, 图 7(a)使用线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA^[29-33])及支持向量机(support vector machine, SVM^[29, 34])进行判别。因为反应后的阴阳性样本和反应前的阴阳性样本对 560 nm 和 430 nm 波长的光源吸光度趋势相反(图 5), 因此采用两种样本反应后的光电信号电压值除以反应前光电信号电压值的比值来进行数据判别。LDA 将高维数



(a) LDA 判别

据投影到低维空间, 投影后各个类别的类内方差小, 而类间均值差别大; SVM 是一个经典两类分类算法, 其找到的分割超平面具有更好的鲁棒性。通过结合 LDA 和 SVM 进行可视化分类, 目前线性参数为 $A=1.1$, $B=-1$, $C=0$, 即 $1.1 \times x - 1 \times y + 0 = 0$, 且此时 A 、 B 、 C 不是最优解, 即阴阳样本没有达到最大区分, 也就是说, 随着测试样本的增多, 判别准确率没有达到最大值, 因此随着硬件、试剂的改变, 要达到最准确的判别, A 、 B 、 C 值需要改变, 该方法对阳性样本判别较好。图 7(b)使用聚类分析^[35]进行判别。通过对光电信号采集趋势的归一化处理发现, 阳性样本均有一个较明显的反曲点(如图 6 所示), 即使切线穿越曲线的点(即连续曲线的凹弧与凸弧的分界点), 通过将找出的拐点与曲线首尾点的连线进行连接, 计算截距。将计算的值通过 K-Means 对数据进行分析处理, 计算欧氏距离。随着给定样本的增加, 更新聚类中心的位置, 降低阴阳样本的类簇误差平方和(sum of squared error, SSE), 直至聚类结束。结果发现, 该方法可以较好地地区分阴性样本, 通过将两种简易的判别方法相结合, 可以提高判别准确率。



(b) 聚类判别

图 7 LAMP 检测系统判别结果

2.3 LAMP 检测方法的特异性和敏感性

阳性对照在 18~22 min 后变为黄色(如图 8(a)所示)。图中, N 表示阴性样本(Negative), P 表示阳性样本(Positive)。值得注意的是, 随着反应时间的延长(30 min 左右), 由于加热对反应体系的影响, 颜色强度略微变淡, 且阴性对照完全不显示颜色变化, 很容易与阳性对照区分开。因此, 可在 LAMP 反应时间为 20 min 进行阳性判读, 30 min 进行阴性

判读。

为了证明离心式微流控芯片的特异性, 采用 SARS-CoV-2 RNA 阳性质控、MERS 病毒、金黄色葡萄球菌、坂崎肠杆菌进行 LAMP 反应。图 8(b)为 4 种不同的病原体的颜色变化。由于只有目标基因 SARS-CoV-2 RNA 能够识别并成功扩增变色, 因此, 阳性信号(黄色)仅由 SARS-CoV-2 RNA 模板获得。而其他病原体的颜色与阴性对照相同, 从而

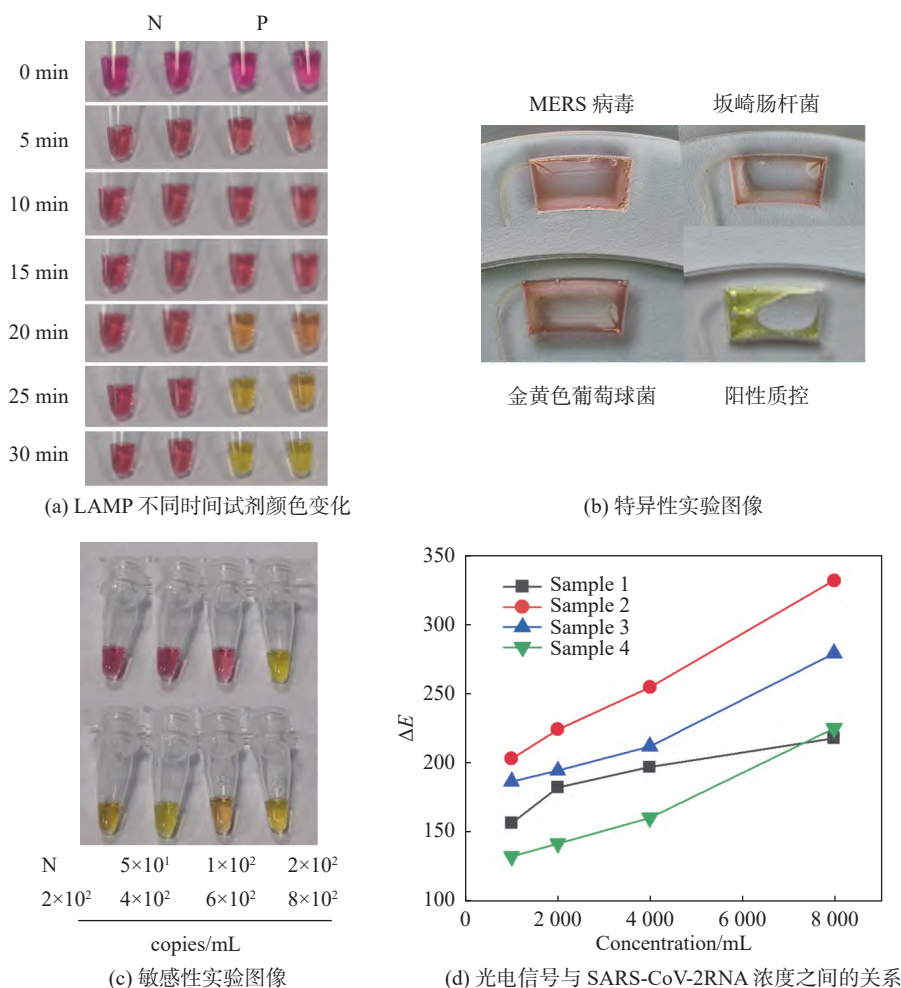


图 8 比色 LAMP 检测图像

证明了该方法的高特异性。

用稀释 SARS-CoV-2 RNA 阳性质控(原液浓度为 10 000 copies/mL)研究吸光度 LAMP 检测的敏感性。将病原体浓度分为 0(无菌水)、50、100、200 copies/mL 和 200、400、600、800 copies/mL 两组,在芯片上进行吸光度比色检测,数据采集卡将检测过程中的光电信号实时传输到计算机,最终在计算机上进行结果计算和判别。只有阳性对照和浓度高于 2×10^2 copies/mL 的样本出现粉-黄色变化(图 8(c))。该检测限可与其他核酸检测系统的检测限相比较。与商业级荧光定量 PCR 相比(检测限 25 copies/mL),这种微流控检测系统也具有更高的灵敏度。此外,该系统可在 30 min 内完成芯片上核酸检测,也无需额外的富集步骤来克服有限制的敏感性。

如图 8(d)所示,结合图 5(a)不同浓度下阳性样本反应后电压值差异,可知 SARS-CoV-2 RNA 浓度和光电信号变化量之间存在线性关联。从这些结

果可以看出,该系统表现出了可与荧光检测相媲美的定性和定量诊断能力。

3 结束语

本文开发了一种一体化、“样本进-结果出”的用于快速、准确和特异的病毒分子检测系统。通过自研离心式微流控芯片与控制系统,对 SARS-CoV-2 RNA 进行了基于吸光度检测的特异性、灵敏性检测分析。目前检测样本共 100 个,阴性样本 20 个,不同浓度阳性样本 80 个,判别准确率达 98%,并具有较高的特异性和较低检测限(200 copies/mL)。相对于现有的核酸检测鉴定系统,该系统能够在微流控芯片上进行比色吸光度检测,用程序控制电机及温控装置及加人员进行流程自动化控制,用光电探测器检测结果,使用计算机进行整个检测过程的控制和监控。可在 30 min 内完成采样、反应、检测及结果输出等一系列工作。该 LAMP 平台在基因或传染病的现场和 PoN 检测中显示了巨大的潜力。

进一步的工作将致力于将样品预处理结合到芯片, 优化芯片体积以及讨论扩增时间、扩增产物量与光电信号的关系, 从而进行实时的量化分析。与传统的实验室设备相比, 目前的设备尺寸 $R=10\text{ cm}$, $h=8\text{ mm}$, 微流检测部分质量仅为 95 g 。因此, 本装置提供了一种精确、便携的护理点核酸扩增装置的解决方案。

参考文献

- [1] 陈秋竹, 吴思娴, 余洋, 等. 新型冠状病毒肺炎 COVID-19 的实验室诊断技术及相关疾病的鉴别诊断 [J]. *中国测试*, 2020, 46(3): 64-72.
- [2] ZHANG Z, MA P, AHMED R, et al. Advanced point-of-care testing technologies for human acute respiratory virus detection[J]. *Adv Mater*, 2022, 34(1): e2103646.
- [3] TAUBENBERGER J K, MORENS D M. 1918 influenza: the mother of all pandemics[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(1): 15-22.
- [4] LU R, WU X, WAN Z, et al. A novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2826.
- [5] ROHAİM M A, CLAYTON E, SAHİN I, et al. Artificial intelligence-assisted loop mediated isothermal amplification (AI-LAMP) for rapid detection of SARS-CoV-2[J]. *Viruses*, 2020, 12(9): 972.
- [6] CHEN Q, HE Z, MAO F, et al. Diagnostic technologies for COVID-19: a review[J]. *RSC Adv*, 2020, 10(58): 35257-35264.
- [7] ZHOU C, FANG Z, ZHAO C, et al. Sample-to-answer robotic ELISA[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(33): 11424-11432.
- [8] RASTON N H A, NGUYEN V T, GU M B. A new lateral flow strip assay (LFSA) using a pair of aptamers for the detection of Vaspın[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 93: 21-25.
- [9] 常芮, 蔡伊娜, 王周平, 等. 基于适配体胶体金侧向层析试纸快速检测卡那霉素的方法研究 [J]. *分析测试学报*, 2021, 40(12): 1728-1735.
- [10] ERILL I, CAMPOY S, RUS J, et al. Development of a CMOS-compatible PCR chip: comparison of design and system strategies[J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2004, 14(11): 1558-1568.
- [11] 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[J]. *Biology (Basel)*, 2020, 9(8): 182.
- [12] GONZALEZ-GONZALEZ E, LARA-MAYORGA I M, RODRIGUEZ-SANCHEZ I P, et al. Colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for cost-effective and quantitative detection of SARS-CoV-2: the change in color in LAMP-based assays quantitatively correlates with viral copy number[J]. *Anal Methods*, 2021, 13(2): 169-178.
- [13] LI Y, FAN P, ZHOU S, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens[J]. *Microb Pathog*, 2017, 107: 54-61.
- [14] MAUTNER L, BAILLIE C K, HEROLD H M, et al. Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. *Virology*, 2020, 17(1): 160.
- [15] NAWATTANAPAIBOON K, PASOMSUB E, PROMBUN P, et al. Colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a visual diagnostic platform for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2[J]. *Analyst*, 2021, 146(2): 471-477.
- [16] VAN NGUYEN H, SEO T S. High-throughput human DNA purification on a centrifugal microfluidic device for rapid forensic sex-typing[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 181: 113161.
- [17] SANGER K, ZÓR K, BILLE JENDRESEN C, et al. Lab-on-a-disc platform for screening of genetically modified E. coli cells via cell-free electrochemical detection of p-Coumaric acid[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 253: 999-1005.
- [18] MADADI M, FATHIPOUR M, GHASEMI J B. Separation of human granulocytes and mononuclear cells from whole blood using percoll on a centrifugal microfluidic disc[J]. *Microchemical Journal*, 2021, 167: 106316.
- [19] 李志刚, 吴晓松, 汪磊, 等. 用于血液病毒核酸检测的微流控 PCR 温度控制技术 [J]. *电子测量技术*, 2020, 43(13): 152-156.
- [20] 李凌梅, 胡建华, 路瑞军, 等. 杠杆表检定数据处理和快速定级的 Excel 模板 [J]. *国外电子测量技术*, 2016, 35(10): 21-24.
- [21] MAES L, CAROLUS T, DE PRETER V, et al. Technical and clinical validation of three commercial real-time PCR kits for the diagnosis of neuroborreliosis in cerebrospinal fluid on three different real-time PCR platforms[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36(2): 273-279.
- [22] PARK J E, KIM J Y, YUN S A, et al. Performance evaluation of the real-q cytomegalovirus (CMV) quantification kit using two real-time PCR systems for quantifying CMV DNA in whole blood[J]. *Ann Lab Med*, 2016, 36(6): 603-606.
- [23] SIMOES DUTRA CORREA H, BRESCIA G, CORTELLINI V, et al. DNA quantitation and degradation assessment: a quantitative PCR protocol designed for small forensic genetics laboratories[J]. *Electrophoresis*, 2020, 41(9): 714-719.
- [24] STARR C R. Optimizing the roche LightCycler(R) single-tube multiplexed RT-PCR assays[J]. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2015, 9(1): DM01-DM03.
- [25] HATANO B, MAKI T, OBARA T, et al. LAMP using a

- disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for anti-bioterrorism[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2010, 63(1): 36-40.
- [26] YEH E C, FU C C, HU L, et al. Self-powered integrated microfluidic point-of-care low-cost enabling (SIMPLE) chip[J]. *Science Advances*, 2017, 3(3): e1501645.
- [27] ALAWSI T, MATTIA G P, AL-BAWI Z, et al. Smartphone-based colorimetric sensor application for measuring biochemical material concentration[J]. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2021, 32: 100404.
- [28] 许文艳, 盛涛, 刘升, 等. 基于多波长光谱传感器的水质检测系统 [J]. *国外电子测量技术*, 2022, 41(6): 112-116.
- [29] GERHARDT N, SCHWOLOW S, ROHN S, et al. Quality assessment of olive oils based on temperature-ramped HS-GC-IMS and sensory evaluation: Comparison of different processing approaches by LDA, kNN, and SVM[J]. *Food Chemistry*, 2019, 278: 720-728.
- [30] MAHMODI K, MOSTAFAEI M, MIRZAEI-GHALEH E. Detection and classification of diesel-biodiesel blends by LDA, QDA and SVM approaches using an electronic nose[J]. *Fuel*, 2019, 258: 116114.1-116114.10.
- [31] SAWETWONG P, CHAIRAM S, JARUJAMRUS P, et al. Enhanced selectivity and sensitivity for colorimetric determination of glyphosate using Mn-ZnS quantum dot embedded molecularly imprinted polymers combined with a 3D-microfluidic paper-based analytical device[J]. *Talanta*, 2021, 225: 122077.
- [32] SHAH J H, SHARIF M, YASMIN M, et al. Facial expressions classification and false label reduction using LDA and threefold SVM[J]. *Pattern Recognition Letters*, 2020, 139: 166-173.
- [33] 王瑞, 龙华, 邵玉斌, 等. 基于 Labeled-LDA 模型的文本特征提取方法 [J]. *电子测量技术*, 2020, 43(1): 141-146.
- [34] SHAMBULINGA M, SADASHIVAPPA G. Supervised hyperspectral image classification using svm and linear discriminant analysis[J]. *International Journal of Advanced Computer Science and Applications*, 2020, 11(10): 403-409.
- [35] 李楠, 邓威, 王晨, 等. 基于 K-means 聚类与概率神经网络的模拟电路故障诊断方法 [J]. *中国测试*, 2021, 47(3): 98-103.

(编辑:商丹丹)

(上接第 6 页)

- [10] PENG L, YANG M, GUO S, et al. The effect of interfacial tension on droplet formation in flow-focusing microfluidic device[J]. *Biomedical microdevices*, 2011, 13: 559-564.
- [11] LI X B, LI F C, YANG J C, et al. Study on the mechanism of droplet formation in T-junction microchannel[J]. *Chemical Engineering Science*, 2012, 69(1): 340-351.
- [12] JANGIR P, JANA A K. CFD simulation of droplet splitting at microfluidic T-junctions in oil-water two-phase flow using conservative level set method[J]. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*, 2019, 41: 1-16.
- [13] OSHER S, SETHIAN J A. Fronts propagating with curvature-dependent speed: algorithms based on Hamilton-Jacobi formulations[J]. *Journal of Computational Physics*, 1988, 79(1): 12-49.
- [14] JOCHER G, CHAURASIA A, STOKEN A, et al. Ultralytics/yolov5: v6. 1-TensorRT, TensorFlow edge TPU and OpenVINO export and inference[Z]. Zenodo, 2022.

(编辑:商丹丹)