基于微流控技术的呼吸道病毒可视化免疫检测研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2022.02.004

潘　婷[1,2]　吴力强[2]
钱纯亘[2]　聂立波[1]

1. 湖南工业大学
生命科学与化学学院
湖南　株洲　412007
2. 深圳市亚辉龙生物科技
股份有限公司
平台预研部
广东　深圳　518100

摘　要：利用微流控芯片技术，开发了一种集成、快速、简单的免疫微流控芯片，通过胶体金显色反应对4种呼吸道病毒抗原进行可视化免疫检测。结果表明，芯片对甲型流感抗原、乙型流感抗原、呼吸道合胞病毒抗原和新型冠状病毒抗原的检出限分别为37.6 ng/mL、17.8 μg/mL、112.5 ng/mL和0.05 ng/mL，检出时间为10 min，特异性良好。此方法可实现呼吸道病毒抗原的现场快速检出，及时区分新型冠状病毒肺炎与普通呼吸道感染，可提高疫情防控效率。

关键词：免疫检测；微流控芯片；呼吸道病毒；可视化
中图分类号：R446.5；TN492　　**文献标志码**：A
文章编号：1674-7100(2022)02-0031-10
引文格式：潘　婷，吴力强，钱纯亘，等. 基于微流控技术的呼吸道病毒可视化免疫检测研究 [J]. 包装学报，2022，14(2)：31-40.

1　研究背景

呼吸道病毒是指一大类以呼吸道为侵入门户，引起呼吸道或呼吸道以外器官病变的病毒。急性呼吸道感染（acute respiratory infection，ARI）是世界范围内，引发急性病和致死性疾病的主要病因之一[1]。全球每年大约有400万人因感染呼吸道病毒而死亡[2]。5岁以下儿童中，全球每年仅流感和呼吸道合胞病毒感染，导致的总死亡人数达30万人以上[3]。

2019年末至2020年初，一种新型冠状病毒2019-nCoV（即SARS-CoV-2）的人际传播，导致了疫情爆发。世界卫生组织（WHO）统计数据显示，截至2021年9月，全球累计确诊病例超过2.3亿，累计死亡人数达470多万。

急性呼吸道感染中，90%以上由病毒引起[4]。常见的引发急性呼吸道感染的病原体有：冠状病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒、人腺病毒和鼻病毒等[5]。大多数呼吸道病毒具有感染力强、传播快、潜伏期短、发病急等特点[6]。呼吸道病毒种类繁多，且感染后症状较为相似，因此诊断区分十分困难[7-9]。快速准确的检测对阻断疾病传播起着至关重要作用[10-15]。

呼吸道病毒临床检测方法主要包括快速抗原检测和核酸扩增检测[16]。目前，新型冠状病毒肺炎的检测通常要用聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）分析仪，在专业实验室中进行，同时需要专业人员操作，这限制了医疗条件简陋的偏远地区及护理点检测的可行性[17-21]。微流控技术的快速发展，为开发成本低、用户友好的呼吸道病毒监测平台提供了新的策略。微流控芯片在微小尺度上实现流体的操控，构建出芯片实验室模型，从而将多种化学和生物学的过程集成到微全分析系统中[22-24]。微流控芯片能实现操作过程的自动化、检测目标的高

收稿日期：2022-02-09
基金项目：湖南省自然科学基金资助项目（2020JJ6102）；湖南省教育厅科学研究基金资助项目（19A144）
作者简介：潘　婷（1997-），女，湖南常德人，湖南工业大学硕士生，主要研究方向为生物传感器，
E-mail：panting5090@163.com
通信作者：聂立波（1973-），女，湖南宁乡人，湖南工业大学教授，主要从事生物传感检测技术研究，
E-mail：libonie@aliyun.com

通量和试剂的低消耗，还能与其他技术设备集成和兼容[25]。微流控芯片因具有试剂用量少、反应过程短、灵敏度高、成本低等优点，可广泛应用于化学、生物、物理、医学等自然科学领域[26-30]。

金纳米颗粒（gold nanoparticles，AuNPs）因其独特的物理和光学性质，已广泛用于病毒以及其他病原体和疾病的检测[31]。金纳米粒子具有可视化显色特性，在基于微流控技术的诊断设备开发中具有广泛的应用前景[32]。侧向流动法是最常用的基于AuNPs的体外诊断护理点检测方式，其操作简便且无需昂贵设备[33]。

Xia Y. Q. 等[34]开发了一种用于禽流感病毒检测的微流控传感器，该传感器以人字形聚二甲基硅氧烷（polydimethylsiloxane，PDMS）芯片为载体，在氧化锌纳米棒三维结构上包覆HA特异性抗体。捕获的病毒进一步用抗体包被的Au-Ag核壳纳米粒子标记。肉眼目测的检出限为2.7×10^4 EID_{50}/mL，比常规基于荧光的酶联免疫吸附测定（enzyme-liked immuno sorbent assay，ELISA）法低一个数量级。用智能手机成像系统进行比色检测，其检出限可低至8×10^3 EID_{50}/mL，病毒捕获和检测过程可在1.5 h内完成。

基于上述背景，本研究开发了一种压力驱动的微流控芯片，以实现快速、直观地检测甲型流感病毒（influenza A virus，FluA）、乙型流感病毒（influenza B virus，FluB）、呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）、新型冠状病毒（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）。

2 实验

2.1 主要实验材料与仪器设备

1）实验材料

H1N1流感抗原(病毒培养物总蛋白质量浓度1.88 mg/mL）、B流感抗原（病毒培养物总蛋白质量浓度3.56 mg/mL）、FluA抗体、FluB抗体、RSV抗体、GAM-IgG、SARS-CoV-2抗体，广东菲鹏生物股份有限公司；SARS-CoV-2抗原，深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司；RSV抗体，Hytest公司；氯化金(III)水合物、trizma® base, 美国Sigma-Aldrich公司；牛血清白蛋白，新西兰Proliant公司；氯化钠、柠檬酸三钠、氢氧化钠、碳酸钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾，上海国药集团化学试剂有限公司；硝酸纤维素膜,德国Merck公司; 聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate，PMMA）板材，成都世化亚克力科技有限公司；医疗双面胶，美国3M公司。

2）仪器设备

激光雕刻机，VLS3.50型，美国Universal Laser Systems公司；真空热压机，TBS-200型，浙江扬清芯片技术有限公司；电热鼓风干燥箱，DHG-9140(A)型，上海一恒科学仪器有限公司；多功能酶标仪，Synergy LX型，美国BioTek公司；微量注射泵，Pump 11 Elite型，美国Harvard Apparatus公司；场发射透射电子显微镜，JEM-F200型，日本电子株式会社；激光共聚焦显微镜，DCM8型，德国Leica公司；涡旋混合仪，VX-200型，美国Labnet公司；数控定时超声波清洗机，040S型，深圳市洁盟清洗设备有限公司；高速冷冻离心机，5804R型，德国Eppendorf公司；磁力搅拌器，PC-620D型，美国Corning公司。

2.2 实验方法

2.2.1 检测原理

基于微流控技术的可视化呼吸道病毒免疫检测原理如图1所示。

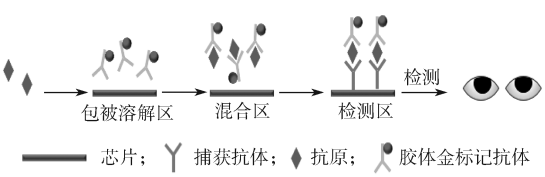


图1 基于微流控技术的可视化呼吸道病毒免疫检测原理图

Fig. 1 Schematic diagram of visual immunoassay of respiratory virus based on microfluidic technology

待检测抗原经加样口注入芯片，首先与包被溶解区的胶体金标记抗体反应，在混合区进一步充分混合形成抗原抗体复合物后，流经检测区，捕获抗体与抗原进行特异性识别，形成抗体-抗原-抗体夹心结构，并在检测区聚集。胶体金为颜色型标记材料，聚集后产生明显的显色反应，通过微流控芯片检测区检测线颜色的有无，进行样本中检测目标物的判定。

2.2.2 胶体金的制备

胶体金的制备采用柠檬酸三钠还原法。具体制备过程如下：将250 mL去离子水放入洁净的玻璃器皿中，并置于可加热磁力搅拌器上加热至沸腾，然后加入质量分数为2%的柠檬酸三钠溶液2.25 mL；当溶液再次沸腾后，迅速加入质量分数为1%的氯金酸溶液2.5 mL，溶液颜色变为酒红色，继续加热煮沸5

min；冷却至室温后用去离子水补足至原体积；将制备好的胶体金溶液室温避光保存。

2.2.3　胶体金标记抗体最佳 pH 条件优化

向盛有 1 mL 胶体金的各试管中分别加入 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 μL 浓度为 0.2 mol/L 的 K_2CO_3 溶液，混匀，得到一系列不同 pH 梯度的胶体金溶液。待 pH 值稳定后，向每管中分别加入质量浓度为 1 mg/mL 的相应抗体 10 μL，并颠倒混匀。4 ℃下静置过夜观察胶体金状态，并进行紫外可见光谱（UV-Vis）检测，不稳定的胶体金呈现出由红变蓝的聚沉现象。将使胶体金稳定的 0.2 mol/L K_2CO_3 溶液最低用量作为对应的胶体金标记抗体最佳条件，测出该条件下溶液的 pH 值，即为最佳标记 pH 值。

2.2.4　标记最佳抗体用量优化

在胶体金与抗体偶联过程中，适当的抗体用量是保证检测灵敏度及控制抗体用量成本的关键。因此对胶体金标记抗体的最佳用量进行优化。

取 10 mL 制备好的粒径均一的胶体金，滴加 0.2 mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值至最佳标记 pH 值。然后将此胶体金溶液分装入 1.5 mL 的离心管中，每管 1 mL，各管中分别加入 FluA、FluB、RSV 抗体的量均依次为 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 μg，SARS-CoV-2 抗体加入量依次为 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 μg，振荡混匀后，室温孵育 l0 min。最后，每管取出 200 μL 并加入质量分数为 10% 的 NaCl 溶液 20 μL，混合均匀后室温孵育 2 h，观察离心管中胶体金溶液的颜色变化情况，并进行 UV-Vis 检测，从而确定最佳抗体用量。

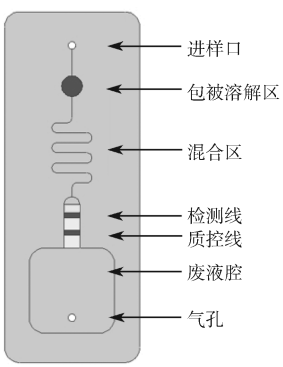
2.2.5　胶体金标记抗体表征

根据实验得出的胶体金标记抗体最佳条件，分别对本研究中呼吸道病毒检测项目的抗体进行标记。为了评估标记效果，用紫外可见光谱和透射电子显微镜，对经标记及纯化后的胶体金标记抗体进行检测和表征。

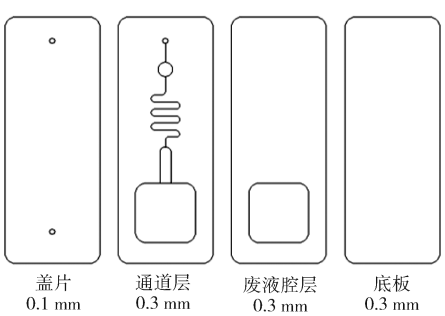
2.2.6　芯片的设计与制作

采用 AutoCAD 软件进行芯片设计。单通道微流控芯片由底板、废液腔层、通道层和盖片组成，如图 2 所示。通道层由进样口、包被溶解区、混合区、检测区构成。盖片为一矩形光板，其上开有两个孔，分别为注液孔和排气孔。底板、废液腔层、通道层和盖片键合形成了密闭微通道，构成芯片的功能区域。

选用聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）为基材，根据设计图（见图 2b），用激光雕刻机加工。其中通道层、废液腔层、底板厚度均为 0.3 mm，盖片厚度为 0.1 mm。芯片组装工序如下：先将通道层上下底面贴双面胶，废液腔层下底面贴双面胶，接着将芯片的底板与废液腔层贴合，用真空热压机进行热压键合，并对其上表面进行亲水处理。在处理好的芯片上表面粘贴通道层，将玻纤切割后嵌入包被溶解区，以其作为载体，滴加胶体金标记抗体。在检测区嵌入经激光切割好的硝酸纤维素膜（nitrocellulose membrane，NC 膜），膜上包被有两条捕获抗体线，质控线为 GAM-IgG（C 线），检测线为对应呼吸道病毒的包被抗体（T 线）。胶体金标记抗体进行干化处理后，再将盖片贴至上层，真空热压键合，制得完整的测试芯片。



a）芯片整体结构



b）芯片分层结构

图 2　微流控芯片的设计结构

Fig. 2　Design structure of the microfluidic chip

2.2.7　呼吸道病毒检测

采用自制微流控芯片，分别对甲型流感 H1N1 灭活病毒、乙型流感灭活病毒、呼吸道合胞病毒标准抗原、新型冠状病毒标准抗原进行检测。将配置好的 80 μL 抗原检测样本用注射泵通过加样口注入芯片，流速为 8 μL/min，反应 10 min，直至结果稳定，进行结果读取。

2.2.8　信号采集与处理

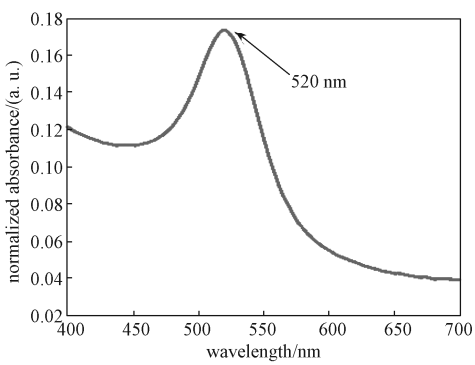
信号可通过肉眼可视化检测。但是，为了科学评估微流控免疫芯片的检测性能，本研究先利用智能手

机对检测结果进行拍照，再用 Image J 软件提取图像光密度值，最后用 Origin 2019b 软件处理数据，得到拟合曲线。

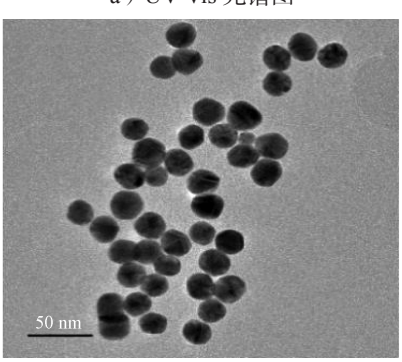
3 结果与讨论

3.1 胶体金的表征

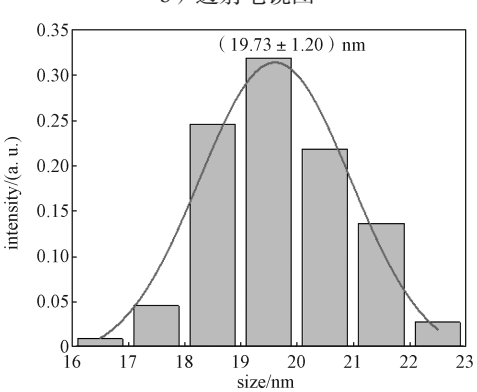
用多功能酶标仪对所制备的胶体金进行 UV-Vis 检测，并用透射电子显微镜对其形貌及分散性进行表征，结果如图 3 所示。由图 3 可知，胶体金的最大吸收峰位于 520 nm 处，其粒径大小为（19.73 ± 1.20）nm，且分散均一性良好。



a）UV-Vis 光谱图



b）透射电镜图



c）粒径分布图

图 3 胶体金的表征

Fig. 3 Characterization of AuNPs

3.2 胶体金标记抗体最佳 pH 条件

采用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金表面带有大量负电荷，胶体金对蛋白质的吸附主要取决于 pH 值。当胶体金悬浊液 PH 值接近蛋白质等电点或稍偏碱性时，二者容易形成牢固的结合物。本研究对胶体金标记抗体的最适 pH 值进行了条件优化，实验结果如图 4 所示。

由图 4 可知，随着 K_2CO_3 溶液加入量的增加，即 pH 的升高，胶体金颜色由紫变红并趋于稳定。将使 1 mL 胶体金稳定的最低 K_2CO_3 溶液加入量作为最佳标记条件，结果是 FluA、FluB、RSV 和 SARS-CoV-2 抗体标记的最佳 K_2CO_3 溶液加入量分别为 9, 12, 12, 6 μL，对应的 pH 值分别为 7.7, 8.1, 8.2, 7.2。

3.3 标记抗体最佳用量

蛋白质用量影响胶体金与蛋白质结合的稳定性。为达到理想标记效果，本研究对胶体金标记抗体的最适用量进行了条件优化，实验结果如图 5 所示。由图 5 可知，随着抗体用量的增加，胶体金由蓝变红并趋于稳定。选取能使胶体金稳定的最低抗体用量为标记最佳抗体用量，结果是每 1 mL 胶体金中 FluA、FluB、RSV 和 SARS-CoV-2 抗体的最佳用量分别为 4, 4, 4, 15 μg。实际应用中为达到更好的结合效率，在此基础上增加 5%~10% 的抗体用量。

3.4 胶体金标记抗体结果表征

根据最佳标记 pH 及标记抗体最佳用量，进行了抗体小样标记，并对标记后的胶体金与抗体偶合物进行了 UV-Vis 检测，结果如图 6 所示。

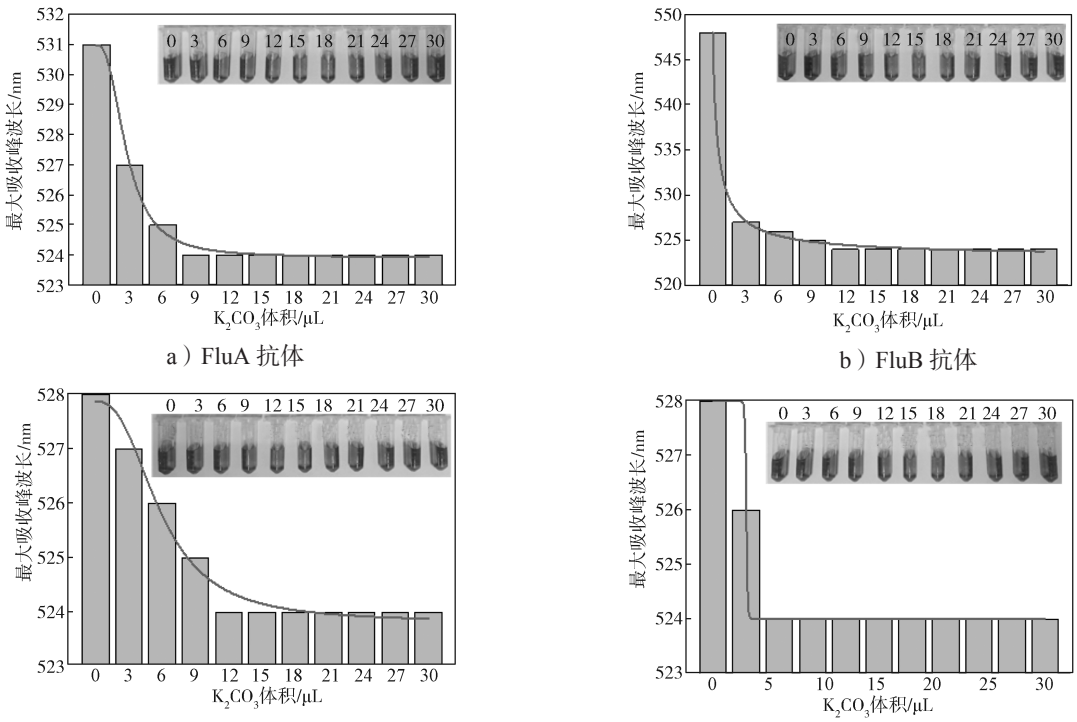
由图 6 可知，胶体金的最大吸收峰波长为 520 nm，胶体金标记抗体的最大吸收峰波长为 524 nm，表明抗体与胶体金成功偶联。

对标记后的偶合物进行透射电镜表征，结果如图 7 所示。由图 7 可知，标记后粒径为（21.31 ± 1.50）nm，比裸胶体金的粒径略有增加，粒径均一，且分散性好。

3.5 检测灵敏度

采用本研究制作的芯片分别对 FluA、FluB、RSV、SARS-CoV-2 4 种呼吸道病毒进行抗原浓度梯度检测，每个浓度进行 3 次重复测试，采用 Image J 软件对检测结果进行光密度值提取，并计算出平均光密度值，结果如图 8 所示。

由图 8 可知，肉眼可见胶体金的颜色随着抗原质量浓度的降低而变浅， 阴性则无反应现象。实验组

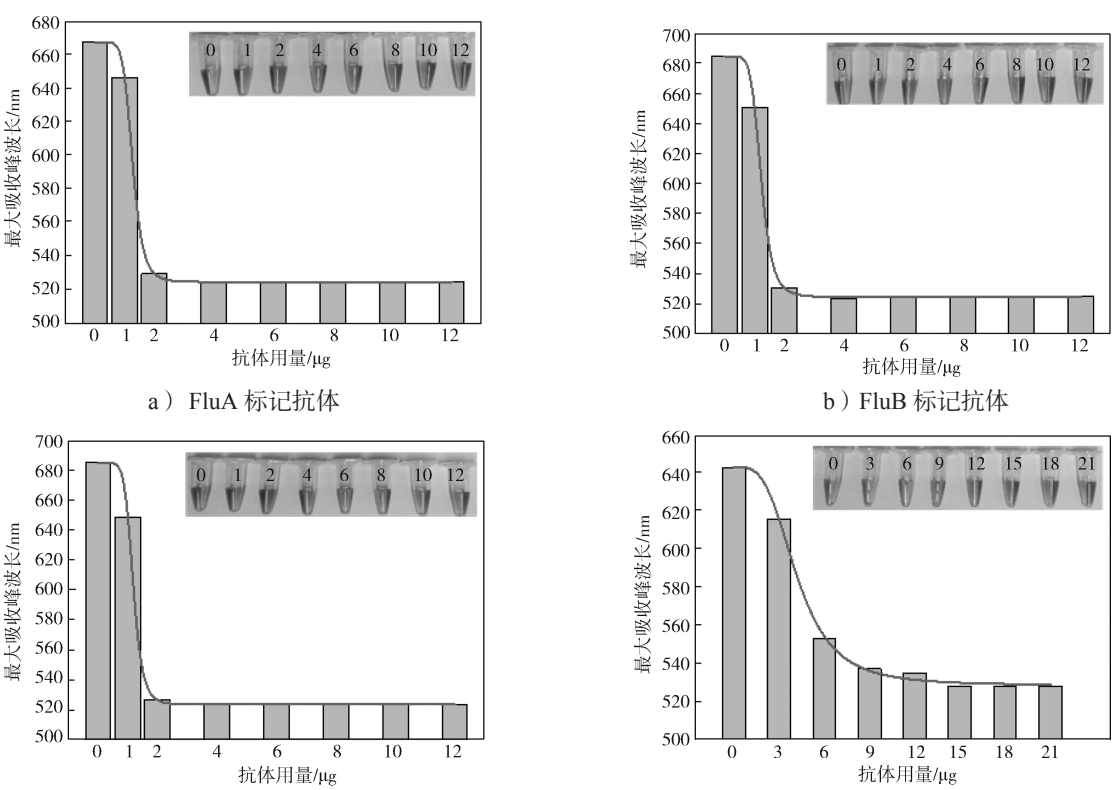


a）FluA 抗体　　b）FluB 抗体

c）RSV 抗体　　d）SARS-CoV-2 抗体

图 4　胶体金标记不同抗体的 pH 条件优化

Fig. 4　Optimization of pH values of different antibodies labeled with AuNPs



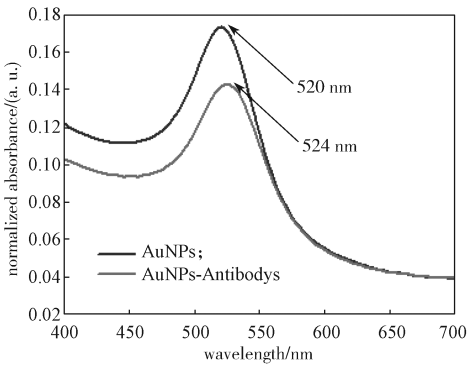
a） FluA 标记抗体　　b）FluB 标记抗体

c）RSV 标记抗体　　d）SARS-CoV-2 标记抗体

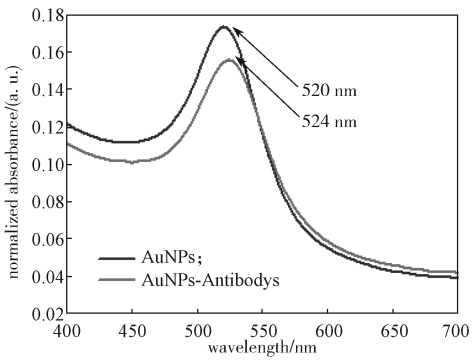
图 5　不同病毒标记抗体的用量优化

Fig. 5　Optimization of antibody amounts of different viruses

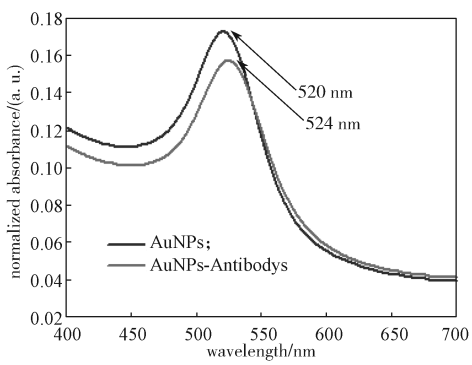
彩图



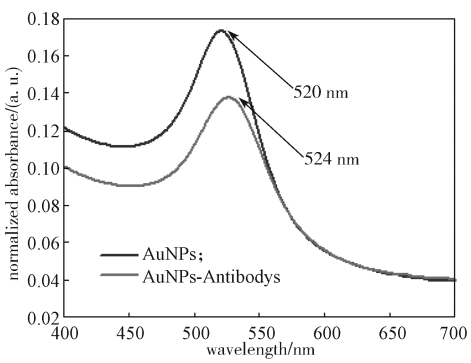
a）FluA 标记抗体



b）FluB 标记抗体



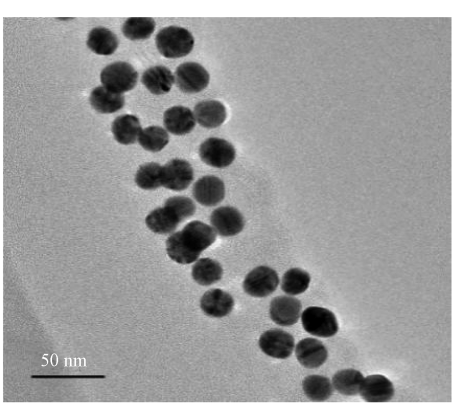
c）RSV 标记抗体



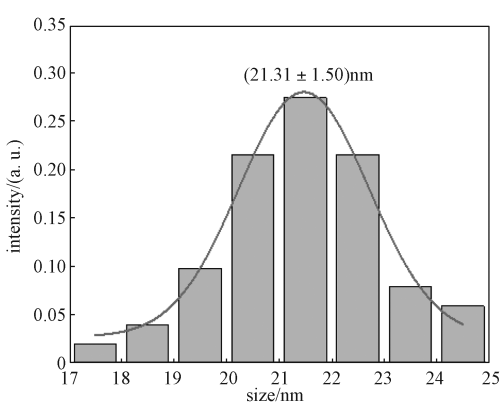
d）SARS-CoV-2 标记抗体

图 6　胶体金标记抗体的 UV-Vis 光谱图

Fig. 6　UV-Vis spectra of AuNPs -labeled antibodies



a）透射电镜图



b）粒径分布图

图 7　胶体金标记抗体的表征

Fig. 7　Characterization of AuNPs-labeled antibody

的平均光密度明显高于阴性对照组的，说明芯片可实现对 4 种病毒的检出。当 FluA 抗原质量浓度为 37.6 ng/mL 时，可检出信号，而当质量浓度为 18.8 ng/mL 时，无检测信号，即检出限为 37.6 ng/mL。同样可得，芯片对 FluB 检出限为 17.8 μg/mL，对 RSV 标准抗原和 SARS-CoV-2 标准抗原检出限分别 112.5 ng/mL 和 0.05 ng/mL。此外，本检测从进样到显色，直至显色结果稳定，总检出时间为 10 min。

3.6　检测特异性

为了验证微流控芯片的检测特异性，配制不同浓度抗原，每个浓度进行 3 次重复测试，结果如图 9 所示。FluA 灭活病毒、FluB 灭活病毒、RSV 标准抗原、SARS-CoV-2 标准抗原的质量浓度分别为 9.4 μg/mL, 178.0 μg/mL, 900.0 ng/mL, 2.5 ng/mL。

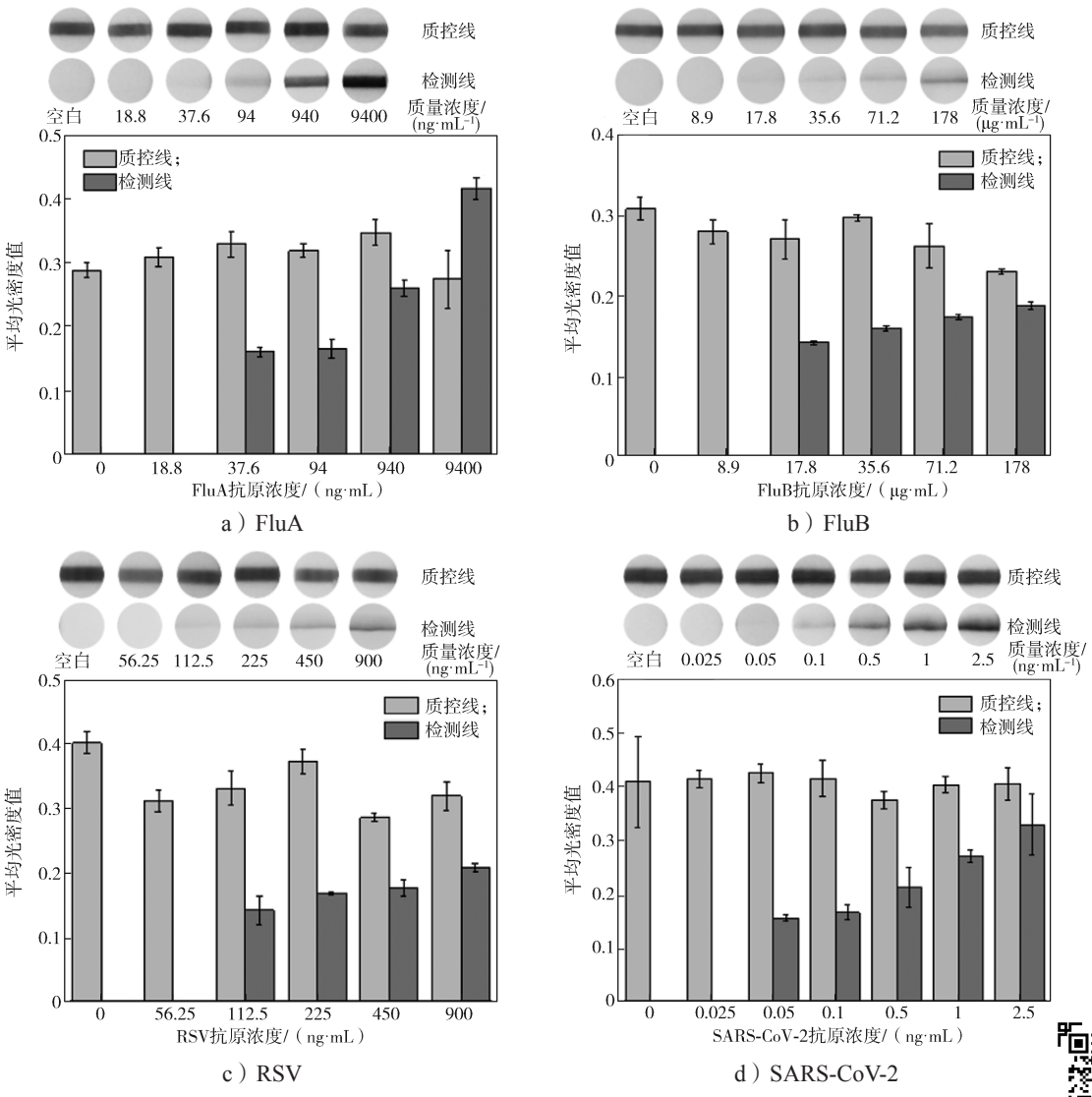
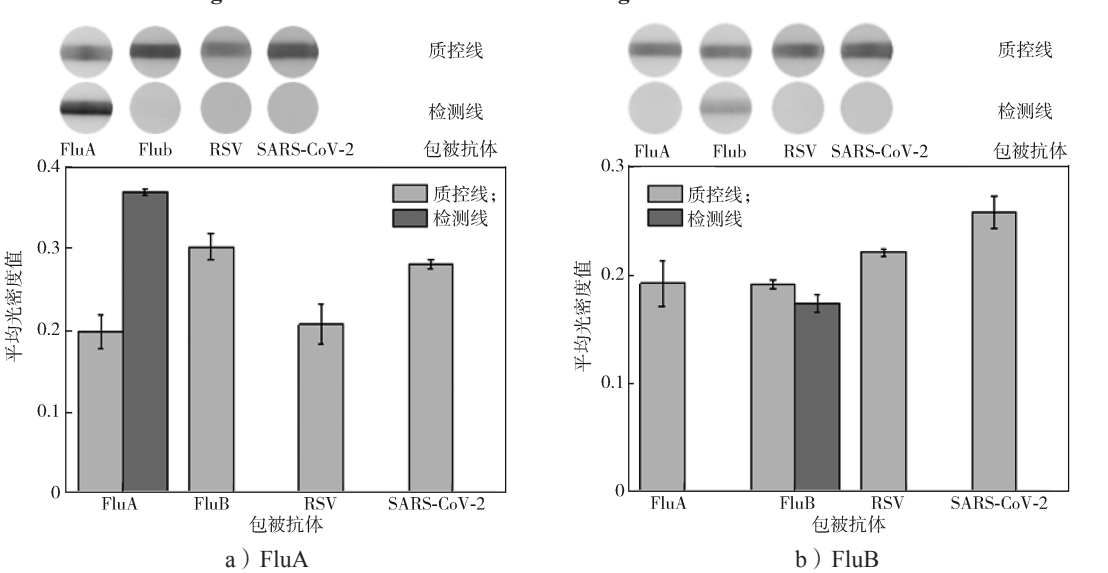
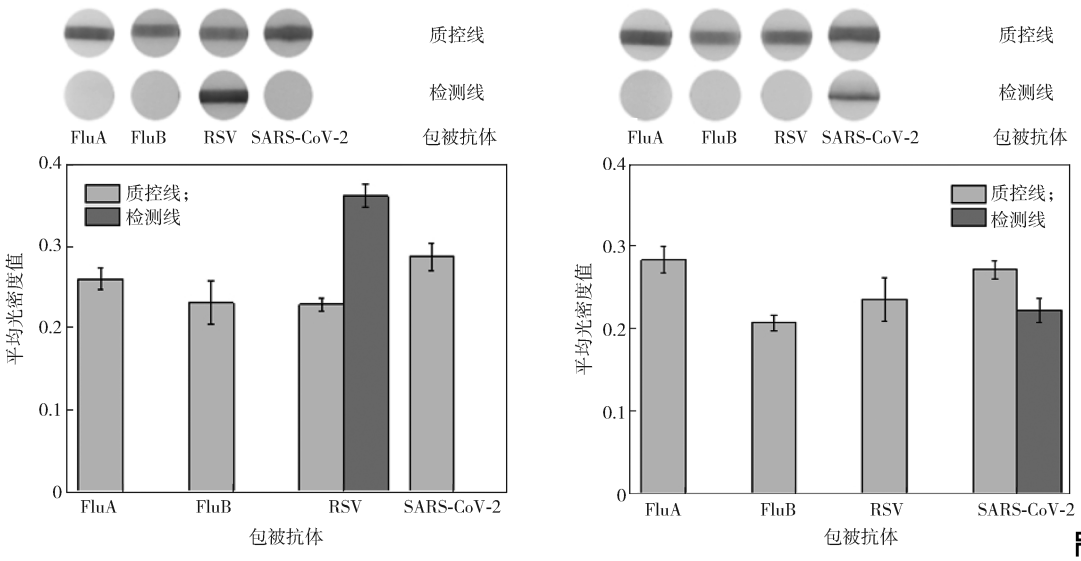


图 8　不同病毒抗原浓度的检测结果

Fig. 8　Detection results of different antigen concentrations of viruses

彩图





c）RSV　　d）SARS-CoV-2

图9　不同病毒的检测特异性

Fig. 9　Detection specificity of different respiratory viruses

彩图

由图9可知，病毒特异性检测以其他3种病毒作为干扰物，每种病毒的检测线只有相应病毒出现信号，其他3种干扰病毒无信号，说明不同检测项目之间无相互干扰，特异性良好。

4　结语

本研究以微流控芯片为载体，实现了呼吸道病毒可视化免疫检测。通过芯片设计将进样区、包被溶解区、混合区、检测区集成在微流控芯片上。芯片结构的设计中引入蛇形混合区，通过对流体流速的控制使目标物与包被抗体能更加充分地反应，提高检测的灵敏度。以注射泵作为流体驱动力，通过精准的流体控制实现了甲型流感H1N1、乙型流感灭活病毒、呼吸道合胞病毒、新型冠状病毒标准抗原的可视化检出，总检出时间为10 min，单次所消耗样本量为80 μL。所研制的免疫微流控芯片具有特异性高、样品量少、操作简便、检测快速、无交叉反应等特点。

相较于传统的免疫学检测试纸，本研究中微流控芯片的制备步骤相对较多，但这仅限于实验室制备，工业生产时可采用注塑成型法替代，以便于快速大批量制备，降低成本。对于传染性病原体的检测，集成式的芯片提供相对封闭的检测环境，可有效防止疾病的扩散。在后续研究中，可通过微流控芯片结构的设计实现多项目的联合检测，提高筛查效率；还可开发简易的自动化集成设备，用于医疗资源相对缺乏地区疾病筛查及床旁快速检测。

参考文献：

[1] LJUBIN-STERNAK S，MEŠTROVIĆ T，LUKŠIĆ I，et al. Seasonal Coronaviruses and Other Neglected Respiratory Viruses: A Global Perspective and a Local Snapshot[J]. Frontiers in Public Health，2021，9：691163.

[2] WYLIE K M. The Virome of the Human Respiratory Tract[J]. Clinics in Chest Medicine，2017，38(1)：11-19.

[3] AZAR M M，LANDRY M L. Detection of Influenza A and B Viruses and Respiratory Syncytial Virus by Use of Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA)-Waived Point-of-Care Assays: A Paradigm Shift to Molecular Tests[J]. Journal of Clinical Microbiology，2018，56(7)：e00367-18.

[4] ZHANG Z，MA P，AHMED R，et al. Advanced Point-of-Care Testing Technologies for Human Acute Respiratory Virus Detection[J]. Advanced Materials，2022，34(1)：2103646.

[5] LI Y，REEVES R M，WANG X，et al. Global Patterns in Monthly Activity of Influenza Virus, Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza Virus, and

Metapneumovirus: A Systematic Analysis[J]. Lancet Glob Health，2019，7(8)：e1031−e1045.

[6] ZHANG N R，WANG L L，DENG X Q，et al. Recent Advances in the Detection of Respiratory Virus Infection in Humans[J]. Journal of Medical Virology，2020，92(4)：408−417.

[7] TURCATO G，PANEBIANCO L，ZABOLI A，et al. Correlation Between Arterial Blood Gas and CT Volumetry in Patients with SARS-CoV-2 in the Emergency Department[J]. International Journal of Infectious Diseases，2020，97：233−235.

[8] HULO P，TOUCHEFEU Y，CAUCHIN E，et al. Acute Ulceronecrotic Gastritis with Cytomegalovirus Reactivation: Uncommon Toxicity of Immune Checkpoint Inhibitors in Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer[J]. Clinical Colorectal Cancer，2020，19(4)：e183−e188.

[9] RICHARD M，FOUCHIER R A M. Influenza A Virus Transmission via Respiratory Aerosols or Droplets as It Relates to Pandemic Potential[J]. FEMS Microbiology Reviews，2016，40(1)：68−85.

[10] KO F，DREWS S J. The Impact of Commercial Rapid Respiratory Virus Diagnostic Tests on Patient Outcomes and Health System Utilization[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics，2017，17(10)：917−931.

[11] LU S M，LIN S，ZHANG H R，et al. Methods of Respiratory Virus Detection: Advances Towards Point-of-Care for Early Intervention[J]. Micromachines，2021，12(6)：697.

[12] PINSKY B A，HAYDEN R T. Cost-Effective Respiratory Virus Testing[J]. Journal of Clinical Microbiology，2019，57(9)：e00373−19.

[13] YANG J M，KIM K R，KIM C S. Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Influenza Virus[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering，2018，23(4)：371−382.

[14] AVEYARD P，GAO M，LINDSON N，et al. Association Between Pre-Existing Respiratory Disease and Its Treatment, and Severe COVID-19: A Population Cohort Study[J]. The Lancet Respiratory Medicine，2021，9(8)：909−923.

[15] SHI T，MCALLISTER D A，O'BRIEN K L，et al. Global, Regional, and National Disease Burden Estimates of Acute Lower Respiratory Infections Due to Respiratory Syncytial Virus in Young Children in 2015: A Systematic Review and Modelling Study[J]. Lancet，2017，390：946−958.

[16] ZHU N，ZHANG D Y，WANG W L，et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019[J]. New England Journal of Medicine，2020，382(8)：727−733.

[17] BU W T，LI W，LI J N，et al. A Low-Cost, Programmable, and Multi-Functional Droplet Printing System for Low Copy Number SARS-CoV-2 Digital PCR Determination[J]. Sensors and Actuators B：Chemical，2021，348：130678.

[18] FUNARI R，CHU K Y，SHEN A Q. Detection of Antibodies Against SARS-CoV-2 Spike Protein by Gold Nanospikes in an Opto-Microfluidic Chip[J]. Biosensors and Bioelectronics，2020，169：112578.

[19] LEE D，CHU C H，SARIOGLU A F. Point-of-Care Toolkit for Multiplex Molecular Diagnosis of SARS-CoV-2 and Influenza A and B Viruses[J]. ACS Sensors，2021，6(9)：3204−3213.

[20] WANG C，LIU M，WANG Z F，et al. Point-of-Care Diagnostics for Infectious Diseases：From Methods to Devices[J]. Nano Today，2021，37：101092.

[21] XIE X，GJORGJIEVA T，ATTIEH Z，et al. Microfluidic Nano-Scale qPCR Enables Ultra-Sensitive and Quantitative Detection of SARS-CoV-2[J]. Processes，2020，8(11)：1425.

[22] ANDERSON C E，BUSER J R，FLEMING A M，et al. An Integrated Device for the Rapid and Sensitive Detection of the Influenza Hemagglutinin[J]. Lab on a Chip，2019，19(5)：885−896.

[23] GARG N，BOYLE D，RANDALL A，et al. Rapid Immunodiagnostics of Multiple Viral Infections in an Acoustic Microstreaming Device with Serum and Saliva Samples[J]. Lab on a Chip，2019，19(9)：1524−1533.

[24] KIM D H，LU N S，MA R，et al. Epidermal Electronics[J]. Science，2011，333(6044)：838−843.

[25] MANNSFELD S C B，TEE B C K，STOLTENBERG R M，et al. Highly Sensitive Flexible Pressure Sensors with Microstructured Rubber Dielectric Layers[J]. Nature Materials，2010，9(10)：859−864.

[26] BAO B，WANG Z C，THUSHARA D，et al. Recent Advances in Microfluidics-Based Chromatography: A Mini Review[J]. Separations，2020，8(1)：3.

[27] GUO S C，TAO S C，DAWN H. Microfluidics-Based on-a-Chip Systems for Isolating and Analysing Extracellular Vesicles[J]. Journal of Extracellular Vesicles，2018，7(1)：1508271.

[28] KASHANINEJAD N, SHIDDIKY M J A, NGUYEN N T. Advances in Microfluidics-Based Assisted Reproductive Technology: From Sperm Sorter to Reproductive System-on-a-Chip[J]. Advanced Biosystems，2018，2(3)：1700197.

[29] WANG H L，VU S，PIGNANELLI J，et al. Fabrication and Characterization of Autonomously Self-Healable and Stretchable Soft Microfluidics[J]. Advanced Sustainable Systems，2018，6(2)：2100074.

[30] ZHANG G，SUN J M. Lipid in Chips: A Brief Review of Liposomes Formation by Microfluidics[J]. International Journal of Nanomedicine，2021，16：7391−7416.

[31] AHMED S R，KIM J，SUZUKI T，et al. Enhanced Catalytic Activity of Gold Nanoparticle-Carbon Nanotube Hybrids for Influenza Virus Detection[J]. Biosensors and Bioelectronics，2016，85：503−508.

[32] KHORIS I M，TAKEMURA K，LEE J，et al. Enhanced Colorimetric Detection of Norovirus Using In-Situ Growth of Ag Shell on Au NPs[J]. Biosensors and Bioelectronics，2019，126：425−432.

[33] CHAVAN S G，KIM D，HWANG J，et al. Enhanced Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus via Lateral Flow Chip and Fluorometric Biosensors Based on Self-Assembled Protein Nanoprobes[J]. ACS Sensors，2019，4(11)：2937−2944.

[34] XIA Y Q，CHEN Y Z，TANG Y M，et al. Smartphone-Based Point-of-Care Microfluidic Platform Fabricated with a ZnO Nanorod Template for Colorimetric Virus Detection[J]. ACS Sensors，2019，4(12)：3298−3307.

（责任编辑：邓光辉）

Visualization of Respiratory Virus Immunoassay Based on Microfluidic Technology

PAN Ting[1,2]，WU Liqiang[2]，QIAN Chungen[2]，NIE Libo[1]

（1. College of Life Science and Chemistry，Hunan University of Technology，Zhuzhou Hunan 412007，China；
2. Department of Pre-Research Platform，Shenzhen YHLO Biotechnology Company Limited，Shenzhen Guangdong 518100，China）

Abstract：An integrated, rapid and simple immune microfluidic chip was developed by using microfluidic chip technology to detect four respiratory virus antigens visually through colloidal gold colorimetric detection. The results showed that the lowest detection limits for influenza A antigen, influenza B antigen, RSV antigen and severe acute respiratory syndrome coronavirus antigen were 37.6 ng/mL, 17.8 μg/mL, 112.5 ng/mL and 0.05 ng/mL, respectively, and the detection time was 10 min, indicating good specificity. This method can realize the rapid detection of respiratory viral antigens on site and distinguish COVID-19 from common respiratory infections in a timely manner, which can improve the efficiency of epidemic prevention and control.

Keywords：immunoassay；microfluidic chip；respiratory virus；visualization