



侧流分析装置的结构改进和化学改性研究进展

屈旭芳¹, 邓鑫雨¹, 庞月红¹, 王文龙¹, 冯永巍², 徐正华³, 张毅^{1*}, 乐晓春⁴

1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 食品学院, 分析食品安全学研究所, 无锡 214122

2. 无锡市食品安全检验检测中心, 无锡 214122

3. 中华人民共和国黄埔海关, 广州 510770

4. 阿尔伯特塔大学医学和牙科学院临床医学和病理系分析和环境毒理学专业, 埃德蒙顿市 T6G2G3

*通讯作者, E-mail: zhangyijnu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-01-31; 接受日期: 2021-03-15; 网络版发表日期: 2021-06-24

国家自然科学基金(编号: 21876066, 21976070)和中华人民共和国海关总署科技项目(2020HK199)资助

摘要 侧流分析(lateral flow assay, LFA)是一种重要的纸基快速检测技术, 具有操作简便、成本低廉等特点, 但存在灵敏度低和信号弱等问题. 近年来, 对LFA的技术改进与性能改善已成为即时检测领域急需解决的问题. 本文综述了利用结构改进、化学改性以及其他辅助手段改善LFA灵敏度的研究工作, 分析了相关方法的原理和检测性能, 剖析了各种改进手段存在的优缺点, 并对LFA技术发展前景进行了展望.

关键词 侧流分析, 结构改进, 化学改性, 灵敏度, 即时检测, 生物分析技术

1 引言

纸基分析装置(paper-based analytical devices, PADs)具有检测快速、结构稳定且无需额外设备等优点^[1], 在医疗、环境、卫生等领域起着重要作用. 在医疗诊断方面, PADs被广泛用于疾病标志物的检测, 包括心脏^[2]、癌症^[3]和传染病^[4]. 当前, 新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)疫情已波及全球240多个国家和地区, 是近百年来人类面临的最严重的传染病威胁之一^[5]. 快速、广泛的筛检对于控制疫情蔓延至关重要, 然而, 在许多国家和地区, 分子检测阳性的个体只占所有感染者的一小部分, 原因是实时-聚合酶链反应(RT-PCR)检测的部署非常有限和时间窗短暂^[6,7]. 此时, 纸基即时检验技术之一侧流分析试纸

迅速成为了解决困境的希望. Whitman等^[8]对比考察了10种侧流分析试纸检测抗-SARS-CoV-2抗体的特异性和灵敏度, 发现其中4种试纸在发病20天后能达到90%以上的IgG阳性检出率, 然而, 所有10种试纸在发病10天内的阳性检出率均低于70%, 偏低的阳性检出率/假阴性结果会导致大量感染者继续传播病毒. 造成偏低阳性检出率的主要原因是试纸的灵敏度或稳定性不足.

自2007年, Martinez等^[9]开始致力于PADs的制造和改善, 以提高其准确性、效率和灵敏度. 现有PADs的主要类型包括比色试纸(如pH试纸^[10])、侧流层析试纸(如验孕试纸^[11])、 μ PAD微流体装置(二维和三维结构)等. 本文主要关注侧流分析(LFA)技术, 按其分析信号类型大致分为光、热、磁、电化学四大类^[12], 表1

引用格式: Qu X, Deng X, Pang Y, Wang W, Feng Y, Xu Z, Zhang Y, Le XC. Recent advances in structural improvements and chemical modifications of lateral flow assay devices. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 905-918, doi: 10.1360/SSC-2021-0025

表 1 不同类型LFA的比较

Table1 Comparison of different types of LFA

信号类型	检测方法	报告探针	检测限	线性范围(数量级)	优点	局限性	参考文献
光	比色	金/银纳米粒子、发色团	ng/mL	1~2	操作简单、裸眼定性	灵敏度低、仅能半定量	[14,15]
	荧光	有机荧光染料、量子点、上转换/长余辉纳米材料、上转换纳米粒子	pg/mL~ng/mL	3~4	灵敏度高	光致漂白、稳定性差、需高能光源及专用读数设备	[16~21]
	化学/生物发光	酶+底物	pg/mL	2~3	灵敏度高、背景噪音低、通量高	多步操作、设计复杂、试剂稳定性差	[22~29]
	表面增强拉曼光谱	金/银纳米材料、亚甲基蓝、罗丹明6G	pg/mL	2~4	灵敏度高	配套设备昂贵	[30~32]
	电致发光	钌联吡啶、碳量子点、氮掺杂石墨烯量子点	pg/mL	4~5	灵敏度高、背景噪音低、可控性强、稳定性好	多步操作、电源等配套设备亟待微型化	[33~36]
磁	磁粒子定量	Fe ₃ O ₄ 纳米粒子	pg/mL	3~4	灵敏度高、线性宽、信噪比高	需专用磁信号发生和接收装置	[37]
热	光热分析	金纳米粒子、黑磷纳米片	pg/mL	3~4	灵敏度高、线性宽	激光光源和热成像设备成本较高、受环境温度影响	[38,39]
电化学	电化学传感	乙酰胆碱酯酶、聚苯胺@GO	pg/mL~ng/mL	2~3	灵敏度高、稳定性好	步骤繁琐、通量低	[40,41]

对比了不同类型的LFA^[13].

传统的LFA虽然具有PADs技术共有的检测快速且结构稳定等优势,但又存在纸基稳定性差、灵敏度低及液体流动效率低等弊端,特别是对于环境或者临床样本中的痕量目标物极难被定量无法进行可靠的定量检测^[42]. 酶基信号增强^[43]、基于纳米探针信号增强^[44]和样品预处理^[45]等方法可以提高LFA灵敏度, Huang等^[46]和Ye等^[47]已对上述针对信号和样品的LFA技术改进工作进行了详细论述,在此不做过多赘述.

鉴于LFA在多方面的突出特性以及在多领域的应用潜力,本文重点介绍对层析试纸进行结构改进和化学改性以提高灵敏度的研究工作,以期LFA性能提高、技术进步和应用拓展提供思路和借鉴.

2 侧流分析装置的基本结构及检测原理

LFA通常由四个部分组成: (1) 样品垫: 添加样品的平台,由玻璃棉、纤维膜或经过改造的膜等材料构成; (2) 结合垫: 通常由玻璃纤维、聚酯等材料构成,含有可溶出的、带有标签的生物识别元件,也有些LFA的结构设计上不含有结合垫,而是将带有标签的生物识别元件放置于离心管中,样品与其混合孵育后一起上样; (3) 硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜: 包含

对分析物浓度有响应的测试(test, T)线和稳定信号的控制(control, C)线; (4) 吸收垫: 吸收多余试剂、平衡层析膜两边压差并防止回流^[48].

以蛋白类大分子为分析物的LFA通常采用夹心法的检测机理,前提是分子具有两种以上的一抗. 以胶体金等信号标签修饰第一种一抗并放置于结合垫,以第二种一抗固定于T线,以二抗固定于C线,分析物流过结合垫时与其上标记的一抗结合、继续流动至T线时被捕获,故T线信号与强度分析物浓度正相关;过量的标记一抗被C线捕获并使C线显示信号^[49]. 以核酸为分析物的常规检测机制与蛋白类似,识别和捕获机制是核酸的杂交. 以小分子为分析物的检测常用竞争机理,如在结合垫使用标记的一抗或核酸适配体,在T线上固定分析物与BSA的复合物使之与样品中的分析物竞争结合标记的一抗或核酸适配体,因此T线的信号强度与样品中的分析物浓度负相关量^[50]. 蛋白质在NC膜上干燥后即被固定、不容易被缓冲液溶解流失,因此抗体在T线和C线的固定只需要常温干燥即可;而核酸在NC膜上干燥后仍可被溶解流失,所以核酸在T线和C线的固定可以通过在其上偶联蛋白质、或在核酸链末端带有连续多个腺嘌呤碱基而利用其碱基堆叠效应实现. 由于亲和素和生物素间特异性强、亲和力大、可分别结合各种大小分子,亲和素-生物素系统

也常被用于LFA当中。

为提高LFA方法灵敏度, 可通过改进其物理结构, 如添加额外膜结构以及设置单双检测模式, 使其在上样、扩增过程中达到浓缩、改变流路路径和提高检测效率的目的^[51~53], 或通过对NC膜材料进行化学修饰来改变表面的亲疏水特性及吸附特异性。此外, 借助其他一些辅助方法, 也可能实现更为灵敏的检测。

3 物理结构改进

3.1 添加微流体装置

传统的纸基分析装置大多利用毛细作用力来驱动液体流动或储存试剂。将微流控装置与LFA集成在一起, 能够使得液体传输更加稳定且实现多通量的同时检测, 在减少样品损耗同时提高LFA的灵敏度和检测效率^[54]。

3.1.1 单重检测

由于现有LFA试纸大多为单一分析物试纸, 所以基于微流体机制改进LFA的研究也以单分析物/单重检测模式为主。Trofimchuk等^[55]设计了一种纸基微流

控装置用于猪肉中亚硝酸盐的检测。将疏水性的蜡印刷到纤维素滤纸上, 加热使蜡渗透并嵌入纸基中, 蜡涂层在室温下固化2 min, 这一熔化固化过程形成疏水圆环边界且完全穿透试纸, 其内部为亲水性的圆孔, 反应则在此发生。由于存在咖啡环效应, 分析物经过加热后向圆环边界蒸发迁移, 使得边界的浓度逐渐增加, 通过与反应试剂结合, 所显现的颜色较内部更深, 视觉检测限大大降低。该方法能够对肉中的亚硝酸盐实现快速(15 min)且高灵敏度的检测, 检测限为1.1 mg/kg, 比无蜡时改善了约10倍。然而, 该方法的弊端是在加热分析物的过程中可能造成蜡障的损坏。

Choi等^[56]将分流器和聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)液滴集成到LFA中形成屏障以控制流体传输(图1a)。分流器存在的情况下, 样品从NC膜转移至分流器中, 增加目标物与纳米金(gold nanoparticles, GNPs)的相互作用时间, 而NC膜上的PDMS液滴会产生弯曲效应, 阻碍流体流动, 同样促进了溶液的混合。PDMS具有良好的生物相容性以及化学惰性, 液滴制作简单、快速^[57], 因此, 通过优化分流器尺寸和PDMS液滴数量实现了较理想的流体延迟, 使信号强度较未改性之前增强10倍。目前, PDMS在微

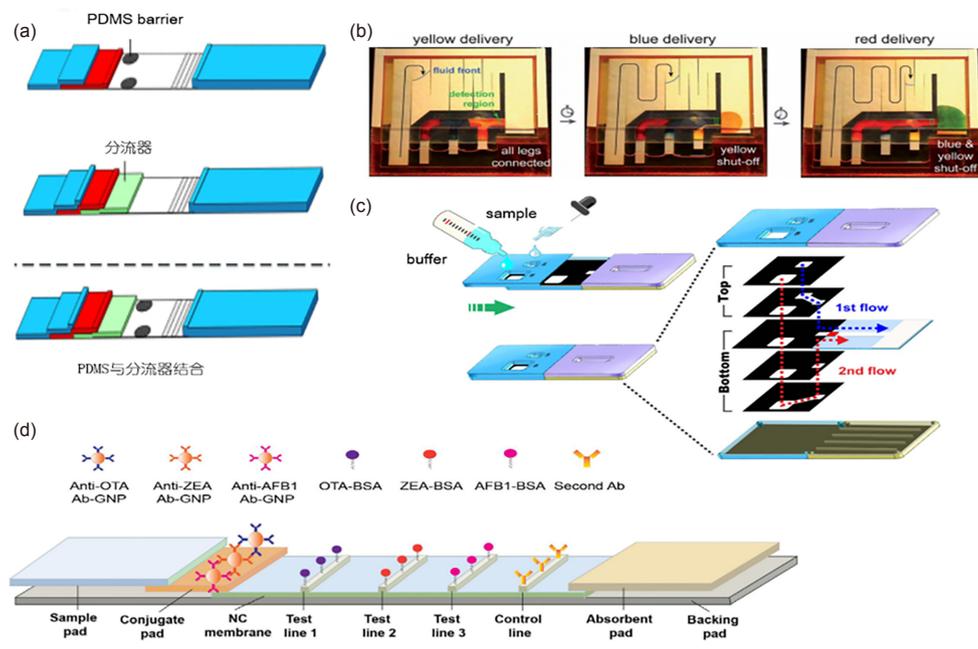


图1 微流装置结合试纸条。(a) 一维(1D)纸基微流装置^[56]; (b) 二维(2D)纸基微流装置^[60]; (c) 三维(3D)纸基微流装置^[62]; (d) 三重LFA^[63] (网络版彩图)

Figure 1 Microflow devices combined with strips. (a) One dimensional (1D) paper-based microflow device [56]; (b) 2D paper-based microflow device [60]; (c) 3D paper-based microflow device [62]; (d) triple LFA strip [63] (color online).

流控装置中应用较为广泛, 但该材料仍然存在一些问题: 在某些pH值下, PDMS对分子的吸收会加剧; 由于固有的疏水性, 其会增加蛋白质的吸收, 影响测定。

Zhang等^[58]提出, 将亲水性的棉线嵌入纸中并整合成条状形成微流通道, 并且利用十六烷基三甲基硅氧烷(hexadecyltrimethoxysilane, HDTMS)调节棉线的亲水性, 通过优化棉线的数量和HDTMS的浓度以降低样品流速, 延长反应时间, 从而提高LFA的检测灵敏度。改进后的试纸条用于检测人类免疫缺陷病毒(HIV)核酸, 与未修饰的LFA相比信号增强4倍。

以上研究工作在原试纸条结构的基础上, 对膜进行亲/疏水改性形成特定的微流通道, 以达到控制其流速、提高灵敏度的目的, 但都属于单分析物检测, 分析通量较低。

3.1.2 多重检测

近年来, 对同时测定多种分析物的需求日益增长, 加速了高通量和多路复用LFA技术的发展, 以提高应对各种突发公共卫生事件的能力^[59]。

(1) 组装多维纸网络

二维的纸网络使用传统LFA的基本材料, 并对其重新配置, 从而实现基于多种试剂、多个流通步骤程序化控制的多重检测。Lutz等^[60]开发的二维纸网络将不同长度的单个试纸条分支安装并插入共享的缓冲溶液中, 在其旁边设置一个调节芯来控制缓冲液的液面高度, 按照需要的时间顺序断开每个流体源(图1b)。该设计实现了两个基本功能: (1) 控制试剂到达检测区域的时间; (2) 控制每个试剂的关闭时间。

三维的微流控装置主要通过将具有亲水性/疏水性通道的纸张组装在一起, 实现空间上的多层同步或不同步的反应。在制作三维纸基微流控装置时, 关键在于实现层与层结合, 并且使上下层特定的亲水区域之间保持连通, 促进流体在 x - y - z 三个方向上的流动, 将一维横向流动扩展到三维^[61]。Han等^[62]开发了一种利用蜡质图案纸的分层结构提供不同的流路从而输送多种溶液的3D流体网络(图1c), 并且添加了增强试剂和可移动滑条设计, 增加了检测灵敏度及装置便携性。

(2) 设置多重检测线

上述多重检测虽然提高了检测的效率, 但大多是将多个单分析物的试纸条进行简单的组装, 没有进行

显著的结构创新, 还会增加额外的预处理过程和成本。Chen等^[63]开发了一种三重侧流免疫试纸条来同时检测黄曲霉毒素(AFB1)、玉米赤霉烯酮(ZEA)和赭曲霉毒素(OTA), 三条测试线分别固定相应的半抗原蛋白结合物, 一条控制线固定二抗, 显色试剂为三种抗体分别与金纳米粒子形成的结合物(Ab-GNPs), 三种结合物按2:1:3 (AFB1:ZEA:OTA)的比例混合并分配到结合垫上(图1d), 10 min后即可进行视觉检测或者通过试纸条读取器进行定量分析。然而, 这种改进技术主要问题在于当测定多分析物或者同源分析物时, 发生的交叉反应可能会引起抗体与分析物结合的特异性降低, 从而导致测试线信号强度减弱。因此, 需要优化试纸条中的免疫探针并筛选出高亲和力和特异性的抗体, 以减少交叉反应。

3.2 添加额外膜结构

3.2.1 预富集

对于分析物原始浓度较低的样品, 预富集技术可以有效提高分析方法的灵敏度, 拓展应用范围。传统的预富集装置通常需要复杂的操作和额外的设备, 无疑会增加检测的难度和成本^[64], 而如果将简易的预富集装置与试纸条进行有机结合, 可以显著提高检测效率。目前, 已经用于实现纸基样品预富集的方案有: 过滤吸附、尖端富集、两相层析、蒸发浓缩、选择性捕获、静电作用等^[65]。

两相层析富集利用不同体积配比的双水相体系(aqueous two-phase systems, ATPS)结合层析过程, 最终因两相不相容而在纸基上分离, 分析物会随其中一相侧流并富集在纸基的特定区域上^[66]。Pereira等^[67]设计了3D纸芯并集成到LFA中, 利用非离子型Triton X-114胶束水两相系统(ATPS)来浓缩疟疾生物标志物——疟原虫乳酸脱氢酶。在PBS溶液中, Triton X-114胶束ATPS形成了顶部贫胶束相和底部富胶束相, 分子根据其物理和化学特性(如疏水性和尺寸)在两相之间分配, Ab-GNPs与目标分子形成复合物, 并且这些复合物分配至胶束相的顶部实现预浓缩(图2a)。通过3D纸芯采样增大垂直于流动方向的横截面积, 以帮助微观相的合并, 并在较短的时间内使纸芯吸取更多的溶液。该方法使疟原虫乳酸脱氢酶的检测灵敏度提高了10倍。

透析是另一种有效的富集方法。Tang等^[68]利用半透膜、玻璃纤维和聚乙二醇(PEG)缓冲液设计了一套

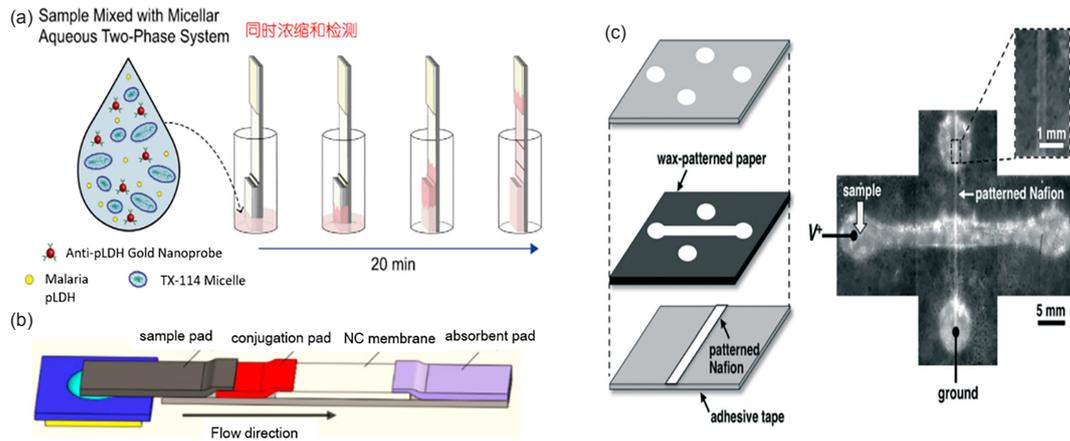


图2 基于不同富集原理的LFA. (a) 双水相芯片富集^[67]; (b) 半透膜透析富集^[68]; (c) 离子浓度极化富集^[70] (网络版彩图)

Figure 2 LFA based on different enrichment principles. (a) Enrichment by aqueous two-phase systems (ATPS) [67]; (b) enrichment by dialysis using semi-permeable membranes [68]; (c) enrichment by ion concentration polarization (ICP) [70] (color online).

透析富集体系并整合到LFA中, 可以成功实现样品预浓缩(图2b). PEG具有吸湿性, 可吸收样品溶液中的水分子, 使其能定向地通过选择性半透膜进入PEG相而使样品中的大分子得以浓缩. 该装置在HIV核酸检测中实现了10倍信号增强, 检测限为0.1 nM, 而在肌红蛋白(MYO)检测中实现了4倍信号增强, 检测限为1.56 ng/mL. 由于PEG主要充当透析液, 因此样品与PEG的体积比会影响其浓缩效果, 目前两者的比例在1:10时效果最好.

离子浓度极化(ion concentration polarization, ICP)通过施加外部电场, 具有离子选择性的膜会使其周围的电解液中离子浓度产生变化, 造成电场分布不均, 使得分析物的迁移速度不同. 在电渗和电泳的作用下, 分析物运动最终达到平衡并堆积在膜界面区形成富集^[69]. Han等^[70]基于该原理开发了一种纸基预浓缩装置, 包括胶带顶层, 中间蜡纸层以及底部附着有Nafion的胶带层(图2c). 由于Nafion膜具有磺酸根基团的簇状网络, 因此具有较高的阳离子选择性, 当电场作用在阳离子交换膜上时, ICP被启动来预先浓缩纸通道中的目标分析物, 实现了1000倍的浓缩. 该方法不需要添加额外的预浓缩试剂, 因此对检测特异性影响较小, 但需要额外添加电场作用.

3.2.2 上样

常规LFA装置主要包括样品垫、结合垫、检测垫和吸收垫四个基本结构, 而Tsai等^[71]通过在基本结构

之外增加一个堆叠垫来改善灵敏度, 其结构如图3a所示. 受聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)中堆积凝胶的启发, 在LFA结合垫和检测垫之间增加一个额外的堆叠垫, 这种设计有助于将抗体和抗原堆积在垫上, 从而增强抗原/抗体的相互作用程度. 以检测C反应蛋白(CRP)为例, 其视觉检测限达到15.5 ng/mL, 较常规LFA信号增强了2倍.

Mei等^[72]开发了一种基于两种不同尺寸的GNPs结合物的侧流分析试纸, 即双金标试纸, 用于检测双酚A. 作者在结合垫和检测垫之间放置一块增强垫(图3b), 偶联双酚A抗体且有BSA封闭的15 nm GNPs分散在结合垫上, 偶联BSA抗体的40 nm GNPs分散在增强垫上, 较大的GNPs通过免疫反应能进一步标记较小的GNPs. 第二种GNPs的应用使得T线和C线的颜色信号增强以及灵敏度显著提高, 对于双酚A的视觉检测限达到0.5 ng/mL, 较传统的LFA灵敏度提高10倍. Wu等^[73]也开发了一种增强机理相似的双金标侧流分析试纸用于检测外泌体(图3c), 实现了外泌体的可视化和定量检测, 检测限为每微升 1.3×10^3 个粒子, 比常规的侧流法改善了13倍.

Tang等^[74]在结合垫与检测垫之间添加一个海绵垫(图3d), 由于海绵结构的孔半径大于结合垫的孔半径因而具有更小的毛细作用力^[75], 从而延缓流体流动并增加试剂间的相互作用. 通过优化海绵垫的厚度、长度和疏水性, 与未修饰的LFA相比, 在乙肝病毒(HBV)核酸测试中获得了10倍的信号增强.

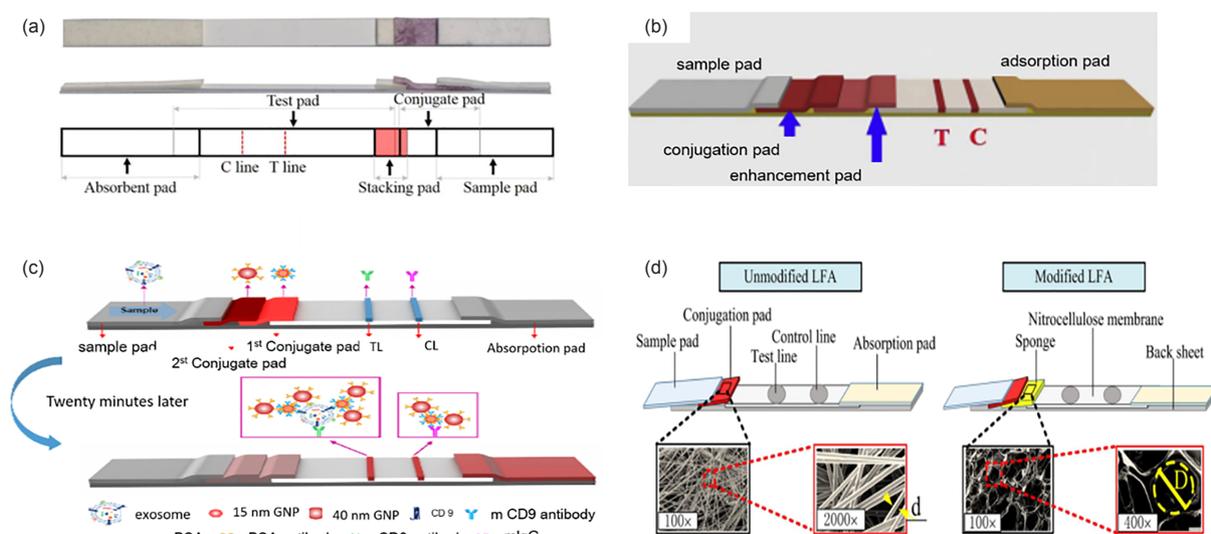


图 3 基于不同信号放大原理的LFA. (a) 含堆叠垫的LFA^[71]; (b) 含增强垫的LFA^[72]; (c) 双金标LFA^[73]; (d) 含海绵垫的LFA^[74] (网络版彩图)
Figure 3 LFA incorporating signal enhancement techniques. (a) LFA with stacking pads [71]; (b) LFA with enhancement pads [72]; (c) LFA with double GNPs-labels [73]; (d) LFA with sponge shunt [74] (color online).

3.3 改变试纸形状

对试纸的各部位、尤其是NC膜的几何形状加以改变, 增大和减小膜的宽度, 对样品溶液流速和测试区的信号强度都会产生影响, 进而影响方法灵敏度。

Katis等^[76]利用激光直写技术在NC膜的检测区域分配液体光聚合物以形成特定形状(漏斗状)、不渗透的流体通道, 通过收缩通道来改变流体的流速和检测区面积(图4a, b), 较慢的流速和较小的检测区面积导致装置的灵敏度增加和检测限降低。改进后的侧流装置用于CRP夹心法检测。与常规侧流装置相比, 检测限改善了30倍。

常规LFA的宽度大约在3 mm左右, Zadehkafi等^[77]设计了一组实验探究了五个不同宽度的检测垫(梯形)对人绒毛膜促性腺激素检测限的影响, 并根据沿层析纸测得的速度变化解释了观察到的检测限变化趋势(图4c)。他们发现增加检测垫的宽度会降低流速并增加分析物与样品之间相互作用的时间, 但是会增加膜材料的消耗以及分析物和抗体在单位膜面积所占的比例下降; 另一方面, 减小检测垫的宽度可以增强分析物与抗体之间的相互作用程度, 但流速增加, 因此相互作用时间会减少, 检测垫宽度较窄时流速高于正常条带, 检测限改善了2倍, 颜色强度增加55%~150%。因此, 可

以通过适当缩小检测垫横截面来实现LFA检测性能一定程度的提高。

4. 化学组成改进

4.1 静电纺丝包裹特殊材料

传统的层析膜大多为NC膜, 其质地较脆、易老化、固定效果较弱。静电纺丝技术使LFA分离膜的定制化制备成为可能, 在聚合物中掺杂不同物质可以得到具有不同特性的电纺纤维膜。静电纺丝的形成过程如下(图5a): 将聚合物溶液装入注射器中, 在注射器针头和收集器之间施加电压, 当溶液从针尖喷出时, 外加电压在液体内部诱导电荷, 从而引起泰勒锥的形成, 从针尖释放的细丝被收集器接受并均匀分布形成所需尺寸和厚度的材料。影响电纺丝的因素主要是聚合物分子量、溶液性质、电压、喷射针尖和收集器之间的距离、环境温度和湿度等^[78]。

Reinholt等^[79]将聚乙二醇(PEG)和三元共聚物聚苯乙烯8k-聚乙炔-丁烯共混, 得到了特殊化学性质的聚乳酸(PLA)静电纺丝纳米纤维膜(图5b)。通过添加PEG来调节PLA纳米纤维的表面性能, 以增加亲水性, 同时加入两亲性聚合物聚苯乙烯8k-聚乙炔-丁烯来消除生物物种的非特异性结合。但其制造较为复杂, 且需

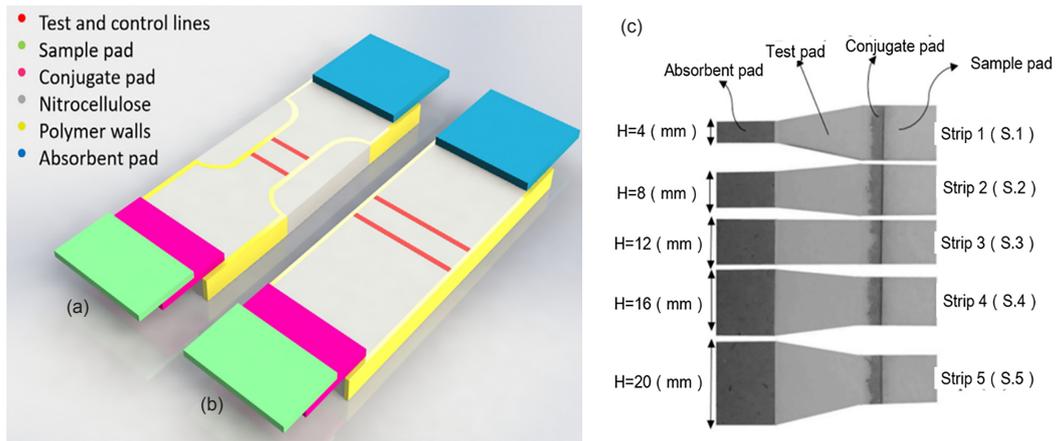


图 4 宽度改进的LFA试纸条. (a) 检测垫中部收缩的LFA试纸条^[76]; (b) 标准的LFA试纸条^[76]; (c) 样品垫、检测垫和吸收垫尺寸各不相同的五种试纸条^[77] (网络版彩图)

Figure 4 Improvements in LFA strips by optimizing the shape and size. (a) LFA strip with shrinkage in the middle of the test pad [76]; (b) Standard LFA strip [76]; (c) Five LFA strips with different sizes of sample pad, test pad and absorption pad [77] (color online).

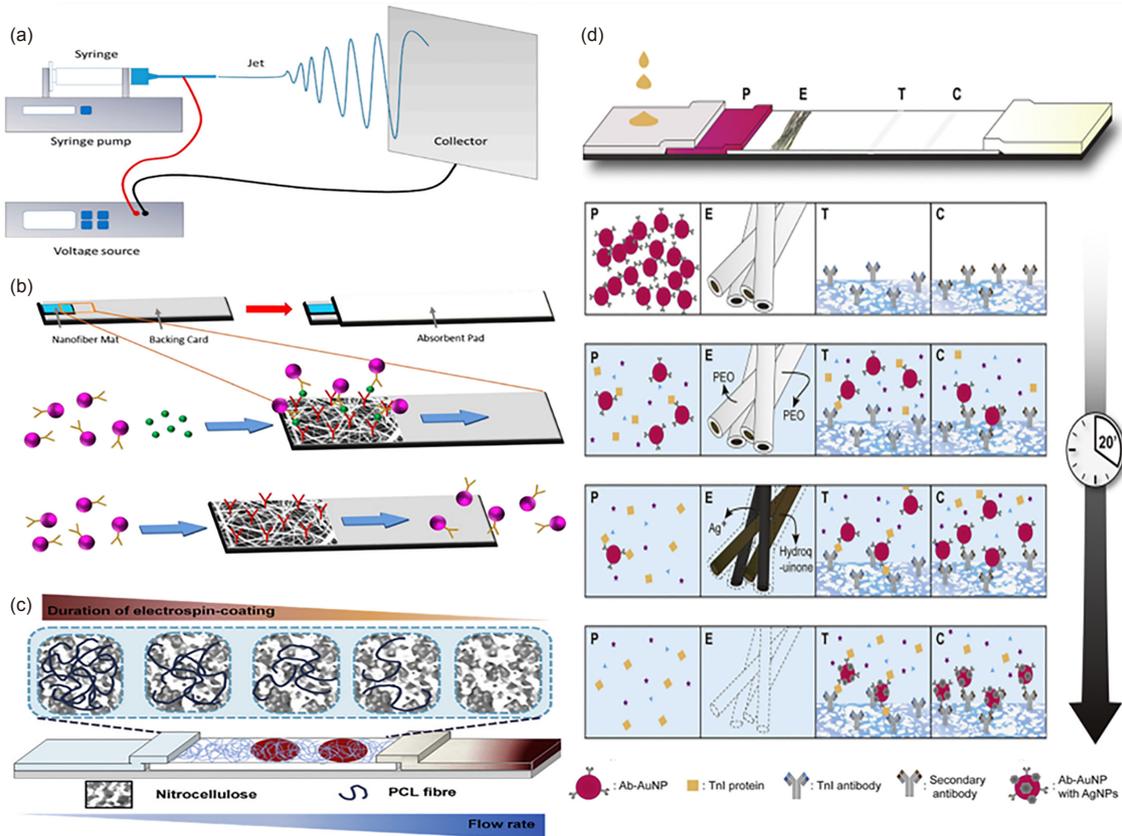


图 5 静电纺丝纳米纤维修饰LFA. (a) 静电纺丝装置示意图^[78]; (b) 静电纺丝纳米纤维涂覆的LFA^[79]; (c) 聚己内酯(PCL)静电纺丝涂层纤维素膜^[80]; (d) 混合纳米纤维沉积LFA^[81] (网络版彩图)

Figure 5 LFA modified with electrostatic spinning nanofibers. (a) Schematic of an electrospinning setup [78]; (b) LFA coated with electrospun nanofibers [79]; (c) electrospin-coating nitrocellulose (NC) membrane with polycaprolactone (PCL) [80]; (d) hybrid nanofiber-deposited LFA [81] (color online).

要对纳米纤维和抗体的共价结合进行研究来充分了解其机理。

Yew等^[80]在NC膜上静电纺聚己内酯(PCL)形成疏水涂层, 以降低流速从而增加靶标与GNPs检测探针偶联物之间的相互作用时间, 导致更多GNPs标记的目标物与捕获探针结合(图5c)。通过这种方法检测寨卡病毒cDNA, 检测限达到0.5 nM, 与未改性的试纸条相比, 灵敏度提高了约10倍。

Kim等^[81]利用静电纺丝法生产出核-壳杂化纳米纤维, 其壳为水溶性聚合物, 核中包含银还原试剂。将杂化纤维沉积在LFA试纸的结合垫和测试线之间, 样品溶液的流过使杂化纤维的壳层溶解、银还原试剂释放并在检测线上的GNPs附近还原银离子生成银纳米粒子, 从而使显色增强(图5d)。用此方法检测心脏病生物标志物肌钙蛋白I, 比常规LFA的视觉检测限改善了10倍。

静电纺丝技术较其他传统方法具有易于制造和操作(如不使用额外的分流)、检测快速和集成生物传感器与静电纺丝涂覆的NC膜为一体简化程序的优点。但在研究过程中仍然存在一些问题: (1) 电纺丝涂附的条件需要优化; (2) 难以在注射头中装载合适的聚合物溶液, 电纺出具有不同吸附特异性的纳米纤维膜; (3) 尚未实现简单、连续、大规模制造功能化的纳米纤维。

4.2 复合纳米粒子

GNPs稳定性强、可产生易于观察的颜色、能与多种生物大分子结合且不影响其活性, 常被用作比色或可视检测的抗体标记, 但仅依靠GNPs为显色标记的方法在很大程度上受到表面等离子体共振活性的限制, 还可能受到深色样品的颜色干扰。为了解决这些问题, 一些基于纳米粒子的LFA改性策略被开发^[82]。例如, 由于光与GNPs之间的强相互作用, 通过激光激发等离子体金纳米粒子, GNPs的表面电子在光电场的作用下集体振荡, 可导致增强的电磁场和热效应而使信号增强^[83]。然而大多数纳米探针的改性都基于复合纳米粒子的修饰, Hao等^[84]报道了一种将双功能磁-金纳米复合物(MGNH)用于LFIA中同时进行磁分离和比色检测的新方法。主要分为两个步骤, 其一是免疫磁珠分离(IMS), 使用磁性纳米粒子对目标物进行富集; 其二是进行LFIA检测。整个过程首先将MGNH-mAbs与含OTA的样品溶液孵育导致MGNH-mAbs-OTA复合物

的形成; 然后, 在外部磁场下收集MGNH-mAbs-OTA复合物和剩余的MGNH-mAbs并重新悬浮于PBS中用于后续检测。当缺少OTA时, 固定在T线上的OTA-BSA捕获更多的MGNH-mAbs探针。在OTA存在的情况下, MGNH-mAbs探针首先与样品溶液中的游离OTA结合, 形成MGNH-mAbs-OTA复合物, 导致T线处捕获的MGNH-mAbs探针减少。磁分离的引入有效去除了来自样品的色素干扰, 对于深色样品葡萄汁中赭曲霉毒素A的检测限为0.094 ng/mL。Liu等^[85]采用后修饰法合成了新型Au/Pt-Si复合纳米粒子(Au/Pt-SiNPs), 该复合材料颜色深、稳定性好、表面修饰方便且具有良好的亲水性, 使得T线颜色强度大大提高, 将其作为报告探针用于可视、定量的免疫分析测定乙肝表面抗原(HBsAg), 检测限为0.13 ng/mL。

Takalkar等^[86]将单链DNA探针自组装固定在Au/Si纳米粒子复合材料的表面, 形成的DNA-Au/Si纳米粒子偶联物用于构建检测miRNA的侧流核酸生物传感器。当目标miRNA与结合垫上的DNA-GNP-SiNR结合时, miRNA与DNA检测探针杂交形成miRNA-DNA-GNP-SiNR复合物, 通过毛细管力向前传输被T线上的DNA探针捕获, 在检测区产生了特征颜色, 可以对miRNA进行可视化检测, 检测到10 pM的miRNA靶标, 检测限较基于GNPs的侧流核酸生物传感器改善了6倍。

尽管以复合纳米粒子作为标签可以使得T线上的颜色强度进一步加深, 有利于可视化检测, 但缺点是复合纳米粒子的合成较为复杂。

4.3 添加化学试剂改性膜

纸基通常依靠静电、疏水相互作用、极性相互作用等非共价键作用将蛋白质或核酸分子吸附在NC膜表面。但是, 上述吸附作用力不强, 会出现脱落现象。由于LFA的层析膜大多为硝酸纤维素膜, 纤维素链中的羟基基团提供了修饰的许多可能性, 并且根据所使用的化学物质和条件, 可以实现膜的功能化以提高检测特异性^[87]。

Yang等^[88]将羧甲基纤维素(CMC)修饰到纸基上, 使之成为亲水环境中固定生物分子以提高其功能性和稳定性的交联剂。这种CMC改性的纤维素材料也可以与1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/N-羧基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)交联, 在纸基表面生成NHS酯

基, 可将其与配体或目标分析物共价偶联, 以实现捕获分子的牢固定位. Wang等^[89]通过戊二醛交联将抗体共价固定在壳聚糖修饰的纸基上, 增强了纸上抗体的稳定性, 实现了DNA、蛋白质和小分子的快速检测. Fu等^[90]利用5种不同试剂对PADs纤维素纸基表面进行化学修饰, 通过表面分析监测改性过程, 在5种表面化学修饰的纸基上进行了荧光实验和比色酶联免疫吸附测定(ELISA)以比较不同修饰方法固定蛋白的效率并进行稳定性实验, 经研究证明高碘酸钾(KIO₄)改性的纤维素纸具有最好性能. 该研究的结论对LFA的NC膜上进行化学改性以提升蛋白质等生物大分子的检测灵敏度有借鉴意义.

5 辅助方法

5.1 核酸扩增辅助技术

聚合酶链式反应(PCR)是常用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术, 具有特异性强、灵敏度高等特点. 常规PCR扩增核酸后需用凝胶分离结合电泳成像以确定扩增产物, 尽管荧光定量PCR能够精确检测样本中目标核酸的拷贝数且避免了电泳等步骤, 但因所需仪器价格昂贵、对操作人员技术要求较高, 使其在常规使用中受限. 将PCR等核酸扩增技术与LFA结合, 可以实现以核酸为目标物的高灵敏、可视化检测.

PCR与LFA结合的策略之一如图6a, b所示^[91]: 对样品中目标核酸片段进行PCR扩增得到带有Fam标签的扩增子; 将扩增子热变性为单链DNA (标记Fam)并与带有Biotin修饰的短链探针杂交形成复合物; 杂交复合物与试纸样品垫上的链霉亲和素-GNPs结合形成三明治状复合物; 上述溶液经过迁移在T线被Fam特异性抗体捕获, 从而呈现红色强度与目标核酸拷贝数正相关的T线; 剩余未结合的链霉亲和素-GNPs与C线上的生物素特异性结合使C线显色(图6c). 当T线和C线均可见时, 结果为阳性. 如果仅C线可见, 则结果为阴性. 该方法用于掺假肉类中猪肉的检测, 检测限可达10 fg目标DNA.

在应对新冠疫情、实现病毒快速检测领域, PCR-LFA技术具有巨大潜力. Yu等^[92]开发了侧流条带膜方法用于检测SARS-CoV-2, 根据SARS-CoV-2的基因组区域的RdRp基因、ORF3a基因和N基因的RNA模板

分别设计引物并组合在一起得到Cy5标记的PCR产物, 将其与优化好的探针在DNA芯片上杂交(图6d), 30 min后所产生的荧光信号用软件分析, 最终得到每个基因的检测限为10 copies/test. 该方法同时检测三种基因可以避免与其他冠状病毒发生交叉反应, 也可以避免SARS-CoV-2核酸突变导致的假阴性结果.

Qin等^[93]提出了一种可视化策略, 用于将多重聚合酶链反应(mPCR)与LFS集成来同时检测牛肉中的多个掺假成分(鸡肉、猪肉、鸭肉, 图6e). 该方法设计了三对核酸标记的正向引物NAT-FP (NAT-FP_{Chicken}、NAT-FP_{Pork}和NAT-FP_{Duck}), 包括与GNP探针偶联物杂交的NAT序列, C12间隔区以及用于触发聚合扩增的特定引物序列的三个功能区. 同样, 三对核酸标记的反向引物NAT-RP还需要具有三个功能区, 包括与固定在T线上捕获探针互补的NAT序列, C12间隔区和用于扩增的特异性引物序列. 一旦掺入目标物(如鸡肉), 其DNA模板首先与设计好的引物对扩增, 扩增子(dsDNA)与两个NAT序列共同标记, 这两个NAT序列可以被GNP探针和T线上的捕获探针完全识别并呈现红色. 该方法可以将肉样品中低至0.01% (wt%)的掺假比例与没有掺假的阴性对照区分开. 此外, 在致病菌检测领域, 扩增技术与LFA的结合也为LFA这种快检技术赋予了新的活力.

Azinhairo等^[94]将重组酶聚合酶等温扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)与LFA相结合开发了一种检测食品接触表面单核细胞增生李斯特菌的新方法. 探针包含标记为Fam或FITC的发光元件, 反向引物包含生物素. 然后将RPA扩增的片段同时用两种分子(Fam和生物素)标记并将其加载到试纸上. 用Fam和生物素标记的RPA扩增片段与试纸检测区域的金标Fam抗体特异性结合, 分析物被GNP捕获并与T线的固定化生物素结合显色, 剩余未捕获的GNPs被特异性抗体固定在C线显色. 他们测试和优化了食品表面细菌的回收方法、富集步骤. RPA技术耗时少且不需要复杂的设备, 结果与标准培养技术和qPCR分析性能相当, 可检测到1.1 pg/ μ L的纯单核细胞增生李斯特菌DNA, LOD₅₀为4.2 CFU/cm², LOD₉₅为18.2 CFU/cm².

5.2 物理辅助技术

传统试纸条为平面直条形且以毛细作用为唯一的液体驱动力. Shen等^[95]提出了一种新型的离心辅助侧

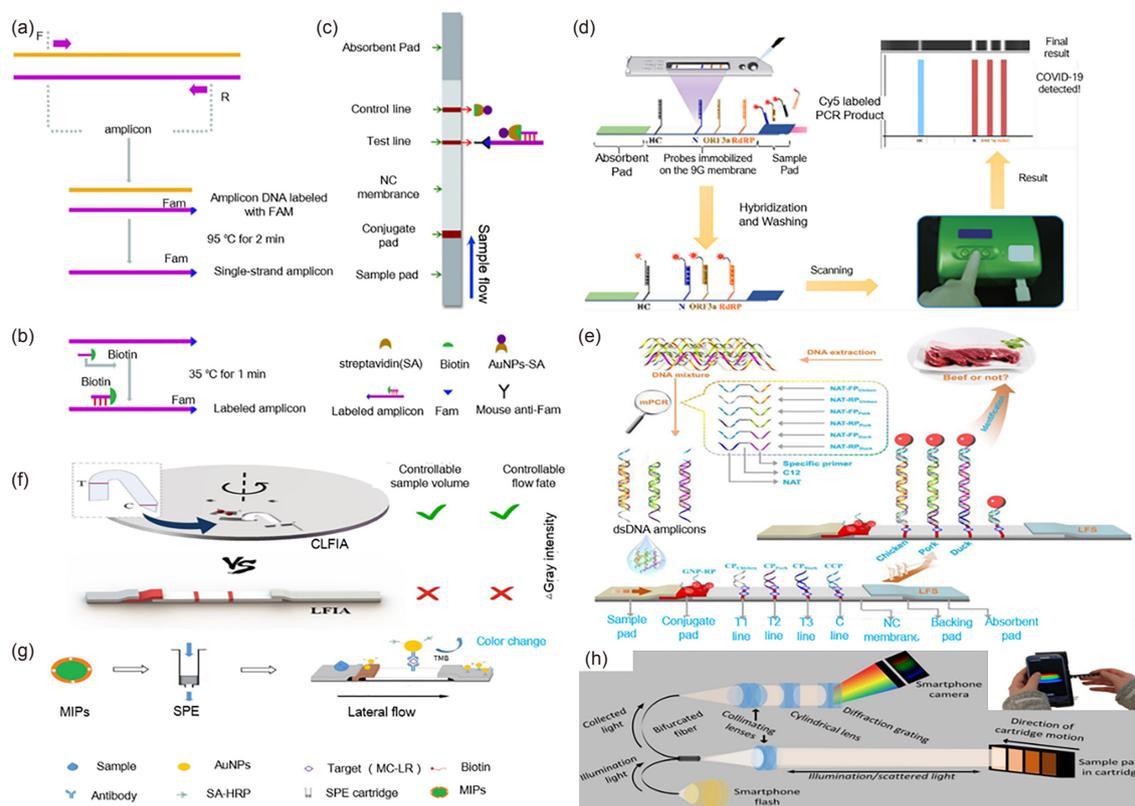


图 6 辅助方法的装置示意图。(a) PCR^[91]; (b) 单链DNA与探针之间的液相杂交^[91]; (c) 侧流试纸条检测^[87]; (d) 侧流条带膜法检测SARS-CoV-2^[92]; (e) 基于NAT-FP/NAT-RP和mPCR-LFS的肉类掺假多重检测联合检测验证平台^[93]; (f) 离心辅助侧流层析测定(CLFIA)^[95]; (g) 分子印迹技术辅助金免疫层析检测^[98]; (h) 使用智能手机光谱仪进行基于纸张的比色分析^[99] (网络版彩图)
Figure 6 Auxiliary methods of improvement for LFA. (a) PCR [91]; (b) liquid-phase hybridization between single-strand DNA and probes [91]; (c) lateral flow strip detection [87]; (d) lateral flow strip membrane assay for the detection of the SARS-CoV-2 [92]; (e) complementary NAT-FP/NAT-RP and mPCR-LFS platform for multiple testing of meats adulteration [93]; (f) centrifugation-assisted LFA [95]; (g) LFA assisted by a molecular imprinting technique [98]; (h) paper-based colorimetric assay with a smartphone spectrometer [99] (color online).

流免疫测定法(CLFIA), 将NC膜设计为圆盘上的拱形桥(图6f)。在离心力和毛细力的共同驱动下, 样品溶液从NC膜的上腔室流向下腔室。反应液进入反应室并与膜接触, 当转速低于3000 r/min时, 毛细管力占主导, 液体将沿NC桥向前移动。NC桥的拱状结构可将液体引导至右侧, 液体将被不断从膜推向废液腔, NC桥左侧形成恒定的毛细管力。因此, 样品通过NC桥连续转移, 免疫分析稳步进行, 在测试线和控制线上生成颜色信号。在相对较低转速(1500 r/min)和较大样品体积(120 μL)时, CLFIA对于前列腺特异性抗原检测限达到0.067 ng/mL, 灵敏度较传统LFIA提高6.2倍。

5.3 分子印迹辅助技术

分子印迹技术(molecular imprinting technology,

MIT)是利用分子印迹聚合物(molecular imprinting polymers, MIPs)来模拟酶-底物或者抗体-抗原之间的相互作用, 对印迹分子/模板分子进行专一性识别的技术。MIT具有预定性、识别性和实用性等特点, 在色谱分离、固相萃取、仿生传感、模拟酶催化、临床药物分析等方面有广泛应用^[96,97]。将分子印迹技术与LFICA结合, 可以在试纸分析之前将分析物与杂质分离并浓缩分析物, 能够将试纸的检测限进一步降低。Wu等^[98]开发了一种新型的侧流酶免疫层析结合分子印迹技术, 用于快速检测水体中的微囊藻毒素-LR(MC-LR)(图6g)。作者通过表面分子印迹方法合成了具有特异性识别点的MIP并填充到SPE柱子中, 每次运行前, 分别用水和甲醇洗涤, 对SPE柱子进行预处理, 然后将MC-LR加载到SPE柱子上并加入一定比例的甲醇-水

混合溶液洗涤,最后,用甲醇/乙酸混合物洗脱负载的MC-LR分子,利用氮气将收集的洗脱液吹干,然后重新溶解在PBS溶液中用于侧流检测.实验证明通过MIPs辅助LFICA方法检测限可以达到0.04 ng/mL.

5.4 智能设备辅助技术

随着智能手机的普及,越来越多的检测技术使用它作为信号采集与分析装置而不再局限于实验室的大型分析仪器,在降低检测成本的同时实现了即时分析与效率提高.智能手机在LFA技术领域的应用也同样得到发展.将智能手机的后置摄像头作为光谱仪,加装分光装置,结合手机自带闪光灯或外加光纤/LED灯,智能手机就成为分光光度计,可以用来采集纸质上测试条带的光谱^[99].利用3D打印机(Formlabs)制作墨盒,装载光学组件和智能手机.实际检测时,单一条带上滑动一系列线性的测试条,以智能手机的摄像功能记录动态的试纸图像,可实现多分析条带的信号采集和图像分析(图6h).

6 总结与展望

LFA技术具有成本低、检测速度快、便于携带、无需复杂设备和专业人员操作等优点,在即时(point-of-care)检测领域有广阔的应用前景.然而,传统的LFA灵敏度较低,只能进行定性或半定量检测,阻碍了其在多领域的广泛发展.为解决这一瓶颈问题,研究人员通过对传统的LFA进行结构改进或化学改性来提升其检测性能.改造后的LFA在特定的条件下检测实际样品的确表现出较好的结果,在允许的误差范围内,检测限显著降低.

然而,上述LFA改进技术仍然存在着不完善之处,如在结构改造方面,微流控是主要的改造方式之一,通过在膜上添加疏水性的聚合物或者设置分流装置控制流体的流动时间和方向,在此过程中样品经过微流通道存在一定的挥发^[100],在这方面,结合3D打印技术设计合适的配件保障样品高效传输具有极大潜能.再者,对于分析物在纸基上流动的毛细管作用力和表面张力的变化需要进一步细化的研究才能更好地掌控内在机理,研究者需要将流体动力学知识与侧流分析相结合,用数学方程来定量描述实验过程.在化学改性方面,对NC膜材料主体或其表面进行化学修饰所选择的材料和化学试剂需要慎重,材料的孔径大小、亲疏水性和化学试剂的稳定性等都会影响流体流动性、路径以及分析物的浓度和抗原抗体特异性结合的程度等.通过对膜的修饰,如利用静电纺丝技术、化学试剂对膜改性都可能对上述问题的解决起到积极作用.目前,多学科、多技术的交叉应用能够在一定程度上弥补传统侧流检测技术在灵敏度和重现性等方面的不足.基于核酸扩增的分子生物学技术能够克服原始样品中核酸拷贝数低、难以检出的问题,辅助设备的引用能够大大提高LFA方法的普适性和操作性.进一步将智能设备与LFA试纸有机结合从而精简装置并改善性能,还有待各领域技术人员的共同搭建新型平台.此外,改良的LFA在批量生产和实践中仍然存在着一些实际问题,例如,改良LFA试纸其制造过程将更加复杂,可能导致生产标准不易规范统一,后序使用上也更需要更精细化的使用指导等.因此,LFA技术的发展必须通盘考虑以上几个多方面因素,才有望在医疗保健、环境分析以及食品和农业等领域中提供更精准、便捷、广泛的分析服务.

参考文献

- 1 Choi JR, Yong KW, Tang R, Gong Y, Wen T, Li F, Pingguan-Murphy B, Bai D, Xu F. *TrAC Trends Anal Chem*, 2017, 93: 37–50
- 2 Wu M, Zhang X, Wu R, Wang G, Li J, Chai Y, Shen H, Li LS. *Anal Lett*, 2020, 53: 1757–1773
- 3 Bayoumy S, Hyytia H, Leivo J, Talha SM, Huhtinen K, Poutanen M, Hynninen J, Perheentupa A, Lamminmaki U, Gidwani K, Pettersson K. *Comms Bio*, 2020, 3: 577–601
- 4 Si J, Li J, Zhang L, Zhang W, Yao J, Li T, Wang W, Zhu W, Allain JP, Fu Y, Li C. *J Med Virol*, 2019, 91: 1301–1306
- 5 Wang C, Qu G, Chen Y. *Chin Sci Bull*, 2020, 65: 2321–2325 [王春霞, 曲广波, 陈拥军. *科学通报*, 2020, 65: 2321–2325]
- 6 Zhu X, Wang X, Han L, Chen T, Wang L, Li H, Li S, He L, Fu X, Chen S, Xing M, Chen H, Wang Y. *Biosens Bioelectron*, 2020, 166: 112437
- 7 Peng T, Liu X, Adams LG, Agarwal G, Akey B, Cirillo J, Deckert V, Delfan S, Fry E, Han Z, Hemmer P, Kattawar G, Kim M, Lee MC, Lu C, Mogford J, Nessler R, Neuman B, Nie X, Pan J, Pryor J, Rajil N, Shih Y, Sokolov A, Svidzinsky A, Wang D, Yi Z, Zheltikov A, Scully M. *Appl*

- Phys Lett*, 2020, 117: 120601
- 8 Whitman JD, Hiatt J, Mowery CT, Shy BR, Yu R, Yamamoto TN, Rathore U, Goldgof GM, Whitty C, Woo JM, Gallman AE, Miller TE, Levine AG, Nguyen DN, Bapat SP, Balcerek J, Bylsma SA, Lyons AM, Li S, Wong AW, Gillis-Buck EM, Steinhart ZB, Lee Y, Apathy R, Lipke MJ, Smith JA, Zheng T, Boothby IC, Isaza E, Chan J, Acenas Ii DD, Lee J, Macrae TA, Kyaw TS, Wu D, Ng DL, Gu W, York VA, Eskandarian HA, Callaway PC, Warriar L, Moreno ME, Levan J, Torres L, Farrington LA, Loudermilk RP, Koshal K, Zorn KC, Garcia-Beltran WF, Yang D, Astudillo MG, Bernstein BE, Gelfand JA, Ryan ET, Charles RC, Iafate AJ, Lennerz JK, Miller S, Chiu CY, Stramer SL, Wilson MR, Manglik A, Ye CJ, Krogan NJ, Anderson MS, Cyster JG, Ernst JD, Wu AHB, Lynch KL, Bern C, Hsu PD, Marson A. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1174–1183
 - 9 Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, Whitesides GM. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 1318–1320
 - 10 Shang YC. *Br J Anaesth*, 2016, 117: 14017
 - 11 Kariman N, Hedayat M, Taheri Z, Fallahian M, Salehpour S, Majd SHA. *Iran Red Crescent Med J*, 2011, 13: 415–419
 - 12 Nguyen VT, Song S, Park S, Joo C. *Biosens Bioelectron*, 2020, 152: 112015
 - 13 Liu L, Yang D, Liu G. *Biosens Bioelectron*, 2019, 136: 60–75
 - 14 Zhong Y, Chen Y, Yao L, Zhao D, Zheng L, Liu G, Ye Y, Chen W. *Microchim Acta*, 2016, 183: 1989–1994
 - 15 Serebrennikova K, Samsonova J, Osipov A. *Nano-Micro Lett*, 2018, 10: 24
 - 16 Jin JY, OuYang XY, Li JS, Jiang JH, Wang H, Wang YX, Yang RH. *Sci Sin Chim*, 2011, 54: 1266–1272 [金建余, 欧阳湘元, 李继山, 蒋健晖, 王昊, 王永祥, 杨荣华. 中国科学: 化学, 2011, 54: 1266–1272]
 - 17 You ML, Lin M, Gong Y, Wang S, Li A, Ji L, Zhao H, Ling K, Wen T, Huang Y, Gao D, Ma Q, Wang T, Ma A, Li X, Xu F. *ACS Nano*, 2017, 11: 6261–6270
 - 18 Deng X, Wang C, Gao Y, Li J, Wen W, Zhang X, Wang S. *Biosens Bioelectron*, 2018, 105: 211–217
 - 19 Jin B, Yang Y, Lu T, Xu F, Lin M. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 353–359 [金碧瑞, 杨叶欣, 卢天健, 徐峰, 林敏. 中国科学: 化学, 2019, 49: 353–359]
 - 20 Liu JB, Yang XM, He XX, Wang KM, Wang Q, Guo QP, Shi H, Huang J, Huo XQ. *Sci Sin Chim*, 2011, 54: 1157–1176 [刘剑波, 羊小海, 何晓晓, 王柯敏, 王青, 郭秋平, 石慧, 黄晋, 霍希琴. 中国科学: 化学, 2011, 54: 1157–1176]
 - 21 Liu Q, Cheng S, Chen R, Ke J, Liu Y, Li Y, Feng W, Li F. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 4358–4365
 - 22 Park JM, Jung HW, Chang YW, Kim HS, Kang MJ, Pyun JC. *Anal Chim Acta*, 2015, 853: 360–367
 - 23 Zangheri M, Cevenini L, Anfossi L, Baggiani C, Simoni P, Di Nardo F, Roda A. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 63–68
 - 24 Fang LQ, Qi YY, Li ZJ, Tang BJ, Hu GM, Lin JM. *Sci Sin Chim*, 2010, 40: 694–703 [方卢秋, 祁媛媛, 李振甲, 唐宝军, 胡国茂, 林金明. 中国科学: 化学, 2010, 40: 694–703]
 - 25 Lin JH, Zhang H, Zhang SS. *Sci China B Ser: Chem*, 2008: 1011–1017 [林洁华, 张慧, 张书圣. 中国科学(B辑: 化学), 2008: 1011–1017]
 - 26 Li F, Wang X, Liu J, Hu Y, He J. *Sens Actuat B-Chem*, 2019, 288: 266–273
 - 27 Ding Y, Hua X, Chen H, Liu F, González-Sapien G, Wang M. *Anal Chem*, 2018, 90: 2230–2237
 - 28 Zhai HQ, Jin XL, Yue JJ, Zhao JY. *Hubei Agricultural Sci*, 2010, 49: 1995–1998 [翟慧泉, 金星龙, 岳俊杰, 赵俊英. 湖北农业科学, 2010, 49: 1995–1998]
 - 29 Mulvaney SP, Kidwell DA, Lanese JN, Lopez RP, Sumera ME, Wei E. *Sens Bio-Sens Res*, 2020, 30: 100390
 - 30 Hwang J, Lee S, Choo J. *Nanoscale*, 2016, 8: 11418–11425
 - 31 Lin LK, Stanciu LA. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 276: 222–229
 - 32 Zhang D, Huang L, Liu B, Su E, Chen HY, Gu Z, Zhao X. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 277: 502–509
 - 33 Fu ZF, Wei W, Li CF, Wang ZX. *Sci Sin Chim*, 2011, 41: 773–784 [付志锋, 魏伟, 李翠芳, 王振兴. 中国科学: 化学, 2011, 41: 773–784]
 - 34 Hong D, Jo EJ, Kim K, Song MB, Kim MG. *Small*, 2020, 16: 2004535
 - 35 Ma Y, Liu M, Guo R, Li BX. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 41–54 [马玥, 刘梅, 郭荣, 李保新. 中国科学: 化学, 2021, 51: 41–54]
 - 36 Zhang L, Li L, Ma C, Ge S, Yan M, Bian C. *Sens Actuat B-Chem*, 2015, 221: 799–806
 - 37 Hong L, Wang K, Yan W, Xu H, Chen Q, Zhang Y, Cui D, Jin Q, He J. *Theranostics*, 2018, 8: 6121–6131
 - 38 Ren S, Li Q, Wang J, Fan B, Bai J, Peng Y, Li S, Han D, Wu J, Wang J, Qin K, Zhao Z, Ning B, Han T, Zhou H, Gao Z. *J Hazard Mater*, 2021, 402: 123781
 - 39 Zhang T, Lei L, Tian M, Ren J, Lu Z, Liu Y, Liu Y. *Talanta*, 2021, 222: 121478

- 40 Du D, Wang J, Wang L, Lu D, Lin Y. *Anal Chem*, 2012, 84: 1380–1385
- 41 Shi ZZ, Tian YL, Wu XS, Li CM, Yu L. *Anal Methods*, 2015, 7: 4957–4964
- 42 Kasetsirikul S, Shiddiky MJA, Nguyen NT. *Microfluid Nanofluid*, 2020, 24: 17
- 43 He Y, Zhang S, Zhang X, Baloda M, Gurung AS, Xu H, Zhang X, Liu G. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 2018–2024
- 44 Baeumner AJ, Cohen RN, Miksic V, Min J. *Biosens Bioelectron*, 2003, 18: 405–413
- 45 Moghadam BY, Connelly KT, Posner JD. *Anal Chem*, 2015, 87: 1009–1017
- 46 Huang X, Aguilar ZP, Xu H, Lai W, Xiong Y. *Biosens Bioelectron*, 2016, 75: 166–180
- 47 Ye H, Xia X. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 7102–7111
- 48 Ma L, Wang SJ, Zeng HJ, Xie MM, Ding CC, Zhai XZ, Guo L, Sun JJ, Li J, Hu Q, Liu J. *Food Sci*, 2018, 39: 333–342 [马兰, 王淑娟, 曾海娟, 谢曼曼, 丁承超, 翟绪昭, 郭亮, 孙静娟, 李杰, 胡谦, 刘箐. 食品科学, 2018, 39: 333–342]
- 49 Zhang GP. *Immunochromatographic Lateral Flow Strip Test* (in Chinese). Henan: Science and Technology Press, 2015 [张改平. 免疫层析试纸快速检测技术. 河南: 科学技术出版社, 2015]
- 50 Sajid M, Kawde AN, Daud M. *J Saudi Chem Soc*, 2015, 19: 689–705
- 51 Liang SJ, Mao JK, Gong C, Yu DD, Zhou JG. *Chin J Anal Chem*, 2019, 47: 1878–1886
- 52 Kim TH, Hahn YK, Kim MS. *Micromachines-Basel*, 2020, 11: 1–30
- 53 Mahmoudi T, de la Guardia M, Shirdel B, Mokhtarzadeh A, Baradaran B. *TrAC Trends Anal Chem*, 2019, 116: 13–30
- 54 Ma X, Hao G, Zhang Z, Li J, Yang X, Chen L. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 393–405 [马昕, 郝帼英, 张忠, 李金花, 杨兴斌, 陈令新. 中国科学: 化学, 2020, 50: 393–405]
- 55 Trofimchuk E, Hu Y, Nilghaz A, Hua MZ, Sun S, Lu X. *Food Chem*, 2020, 316: 126396
- 56 Choi JR, Liu Z, Hu J, Tang R, Gong Y, Feng S, Ren H, Wen T, Yang H, Qu Z, Pingguan-Murphy B, Xu F. *Anal Chem*, 2016, 88: 6254–6264
- 57 Raj M K, Chakraborty S. *J Appl Polym Sci*, 2020, 137: 48958
- 58 Zhang SF, Liu LN, Tang RH, Liu Z, He XC, Qu ZG, Li F. *Cellulose*, 2019, 26: 8087–8099
- 59 Wu Y, Zhou Y, Leng Y, Lai W, Huang X, Xiong Y. *Biosens Bioelectron*, 2020, 157: 112168
- 60 Lutz BR, Trinh P, Ball C, Fu E, Yager P. *Lab Chip*, 2011, 11: 4274–4278
- 61 Jeong SG, Kim J, Jin SH, Park KS, Lee CS. *Korean J Chem Eng*, 2016, 33: 2761–2770
- 62 Han KN, Choi JS, Kwon J. *Sci Rep*, 2016, 6: 25710
- 63 Chen Y, Chen Q, Han M, Zhou J, Gong L, Niu Y, Zhang Y, He L, Zhang L. *Food Chem*, 2016, 213: 478–484
- 64 Han GR, Koo HJ, Ki H, Kim MG. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 34564–34575
- 65 Chaikhan P, Udnan Y, Sananmuang R, Ampiah-Bonney RJ, Chuachud Chaiyasith W. *MicroChem J*, 2020, 159: 105355
- 66 Mashayekhi F, Le AM, Nafisi PM, Wu BM, Kamei DT. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404: 2057–2066
- 67 Pereira DY, Chiu RYT, Zhang SCL, Wu BM, Kamei DT. *Anal Chim Acta*, 2015, 882: 83–89
- 68 Tang R, Yang H, Choi JR, Gong Y, Hu J, Feng S, Pingguan-Murphy B, Mei Q, Xu F. *Talanta*, 2016, 152: 269–276
- 69 Jia M, Kim T. *Anal Chem*, 2014, 86: 10365–10372
- 70 Han SI, Hwang KS, Kwak R, Lee JH. *Lab Chip*, 2016, 16: 2219–2227
- 71 Tsai TT, Huang TH, Chen CA, Ho NYJ, Chou YJ, Chen CF. *Sci Rep*, 2018, 8: 17319
- 72 Mei Z, Qu W, Deng Y, Chu H, Cao J, Xue F, Zheng L, El-Nezamic HS, Wu Y, Chen W. *Biosens Bioelectron*, 2013, 49: 457–461
- 73 Wu T, Yang Y, Cao Y, Huang Y, Xu LP, Zhang X, Wang S. *Sci China Chem*, 2018, 61: 1423–1429
- 74 Tang R, Yang H, Gong Y, Liu Z, Li XJ, Wen T, Qu ZG, Zhang S, Mei Q, Xu F. *Sci Rep*, 2017, 7: 1360
- 75 Songok J, Toivakka M. *Microfluid Nanofluid*, 2016, 20: 1–9
- 76 Katis IN, He PJW, Eason RW, Sones CL. *Biosens Bioelectron*, 2018, 113: 95–100
- 77 Zadehkafi A, Siavashi M, Asiaei S, Bidgoli MR. *J Chromatography B*, 2019, 1110–1111: 1–8
- 78 Aliheidari N, Aliahmad N, Agarwal M, Dalir H. *Sensors*, 2019, 19: 3587
- 79 Reinholt SJ, Sonnenfeldt A, Naik A, Frey MW, Baeumner AJ. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406: 3297–3304
- 80 Yew CHT, Azari P, Choi JR, Li F, Pingguan-Murphy B. *Anal Chim Acta*, 2018, 1009: 81–88
- 81 Kim W, Lee S, Jeon S. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 273: 1323–1327
- 82 Soh JH, Chan HM, Ying JY. *Nano Today*, 2020, 30: 100831

- 83 Ye H, Liu Y, Zhan L, Liu Y, Qin Z. *Theranostics*, 2020, 10: 4359–4373
- 84 Hao LW, Chen J, Chen XR, Ma TT, Cai XX, Duan H, Leng YK, Huang XL, Xiong YH. *Food Chem*, 2020, 336: 127710
- 85 Liu J, Yu Q, Zhao G, Dou W. *Anal Methods*, 2019, 11: 6103–6110
- 86 Takalkar S, Xu H, Chen J, Baryeh K, Qiu W, Zhao JX, Liu AG. *Anal Sci*, 2016, 32: 617–622
- 87 Harpaz D, Eltzov E, Axelrod T, Marks RS, Tok AIY. *Biochem Eng J*, 2020, 155: 107483
- 88 Yang CH, Chen CA, Chen CF. *Sens Actuat B-Chem*, 2018, 265: 506–513
- 89 Wang S, Ge L, Song X, Yu J, Ge S, Huang J, Zeng F. *Biosens Bioelectron*, 2012, 31: 212–218
- 90 Fu H, Liu XY. *J Micromech Microeng*, 2019, 29: 1–25
- 91 Yin R, Sun Y, Wang K, Feng N, Zhang H, Xiao M. *Food Chem*, 2020, 318: 126541
- 92 Yu S, Nimse SB, Kim J, Song KS, Kim T. *Anal Chem*, 2020, 92: 14139–14144
- 93 Qin P, Xu J, Yao L, Wu Q, Yan C, Lu J, Yao B, Liu G, Chen W. *Food Chem*, 2020, 339: 127891
- 94 Azinheiro S, Carvalho J, Prado M, Garrido-Maestu A. *Foods*, 2020, 9: 1249
- 95 Shen M, Chen Y, Zhu Y, Zhao M, Xu Y. *Anal Chem*, 2019, 91: 4814–4820
- 96 Jia M, Zhang Z, Yang X, Li J, Chen L. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 300–314 [贾梦凡, 张忠, 杨兴斌, 李金花, 陈令新. 中国科学: 化学, 2017, 47: 300–314]
- 97 Li XM, Zhu J, Pan Y, Meng R, Zhang B, Chen HQ. *Food Hydrocolloid*, 2019, 90: 19–27
- 98 Wu Z, He D, Cui B, Jin Z. *Food Chem*, 2019, 283: 517–521
- 99 Woodburn EV, Long KD, Cunningham BT. *IEEE Sens J*, 2019, 19: 508–514
- 100 Wu J, Xu JF, Shi CC, He MH, Chen GX, Tian JF. *Trans China Pulp and Paper*, 2018, 33: 57–64 [吴静, 徐军飞, 石聪灿, 何明辉, 陈广学, 田君飞. 中国造纸学报, 2018, 33: 57–64]

Recent advances in structural improvements and chemical modifications of lateral flow assay devices

Xufang Qu¹, Xinyu Deng¹, Yuehong Pang¹, Wenlong Wang¹, Yongwei Feng², Zhenghua Xu³, Yi Zhang^{1*}, X. Chris Le⁴

¹ Jiangnan University, school of food science and technology, Institute of Analytical Food Safety, Wuxi 214122, China

² Food Safety Inspection and Testing Center, Wuxi 214122, China

³ Huangpu Customs, Guangzhou 510770, China

⁴ Department of Laboratory Medicine and Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Alberta T6G 2G3, Canada

*Corresponding author (e-mail: zhangyijnu@jiangnan.edu.cn)

Abstract: Lateral flow assay (LFA) is an important paper-based technique amenable for rapid and point-of-care testing. It features as low cost and simple operations. However, a main challenge often comes from weak detection signals and low sensitivity. Here we summarize the advances in new research aiming at improving the sensitivity of LFA through structural improvements, chemical modifications, and other auxiliary methods. We discuss the principle and operation, performance, unique features, advantages and remaining issues of each improvement strategy. We highlight current challenges and provide perspectives on future research directions with respect to developing new strategies for improving LFA.

Keywords: lateral flow assay, structural improvement, chemical modification, sensitivity, point-of-care tests, bioanalytical techniques

doi: 10.1360/SSC-2021-0025