



蛋白质即时检测新技术*

康秀芝¹⁾ 陈悦¹⁾ 田宇琳¹⁾ 刘梦竹¹⁾ 孙晶^{2,3)**} 郎明非^{1,3)**}¹⁾ 大连大学医学院, 大连 116622; ²⁾ 大连大学环境与化学工程学院, 大连 116622;³⁾ 大连大学, 大连市糖重组及重组蛋白修饰重点实验室, 大连 116622)

摘要 蛋白质是细胞各类代谢和调控等生命功能的执行者,也是致病因子、药物等对机体作用的重要靶分子。研究蛋白质表达是理解生命现象、疾病进程和药物作用的基础。临床上常规检测方法需要大型仪器支持,但随着医学事业的发展,即时检测(POCT,也称现场检测、床旁检测)成为重要的发展趋势。POCT可以改善患者和医生之间的互动方式,建立一种积极的医疗模式。除诊断、治疗疾病外,对从事应急工作的人员来说,POCT在现场和远程检测方面都有优势,因此研发既准确灵敏又简便快捷的蛋白质即时检测方法至关重要。

关键词 即时检测,蛋白质检测,微流控,电化学传感器,可穿戴设备,纳米材料,智能设备

中图分类号 Q81

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0209

在19及20世纪初,蛋白质检测技术大致分为氮元素法与结构比色法两类,其灵敏度不高、干扰物多,只能用于蛋白质初步分析。20世纪中后期以来,依赖于酶联免疫吸附^[1]、免疫荧光^[2-3]、质谱^[4-5]和电化学传感器^[6-7]的蛋白质检测方法得以发展。这些检测方法往往需要大型仪器和专业人员的操作,无法满足现场或床旁检测的需求。近年来各种蛋白质定性及定量检测方法不断涌现,不仅有基于传统技术改进的方法,如微流控^[8-9],也有人工智能^[10]等一些新技术的应用,极大地推进了即时检测的发展^[11-13],使蛋白质检测进入了一个新阶段。

即时检测(point-of-care testing, POCT)一般指不需要固定场所,通过便携式仪器设备,能及时获得结果的检测方式^[14-15]。POCT可以让患者进行居家检测,还适用于慢性病^[16]、传染病^[17]等筛查,可以最快速度检测疾病,合理配置医疗资源,提高工作效率^[18]。POCT快速、小型、便携、易操作等优点使其在医院急诊、重症监护、快速分诊、基层医疗、家庭医疗、突发事件应对、海关检验检疫、传染病防治等方面有广泛的应用前景^[15, 19-20]。目前临床上成熟的POCT检测主要有胶体金试纸,如HCG试纸、HIV试纸等,但只能进行定性检测

且通量不高。本文简要综述近几年出现的蛋白质POCT新方法(主要包括微流控、微型电化学生物传感器、基于智能手机和人工智能的POCT及可穿戴设备等),以及这些新方法的交叉应用(表1)。

1 微流控

微流控技术是一种能够在微米级尺寸操控液体并自动完成分析过程的新兴技术,是一门综合了分析化学、流体力学、分子生物学以及微电子等多领域多学科的交叉技术^[21-22]。其具有样品及试剂消耗量低、分析速度快、灵敏度高、高通量、自动化、集成化、小型化、便携化、操作简单等众多优点,常常被用来制备具有不同功能和形貌的模板材料,在化学、生物医学^[23-24],尤其是POCT等领域,拥有广阔的应用前景^[25-26]。

Liu等^[27]展示了一种快速检测新型冠状病毒肺炎患者及康复者血清中特异性病毒N蛋白

* 辽宁省自然科学基金(2019JH3/30100006, 2021JH6/10500143)资助项目。

** 通讯联系人。

郎明非 Tel: 0411-87402284, E-mail: langmingfei@dlu.edu.cn

孙晶 Tel: 0411-87402296, E-mail: sunjing@dlu.edu.cn

收稿日期: 2021-07-22, 接受日期: 2021-11-10

(nucleocapsid protein) 抗体的微流控芯片。作者利用独特的往复流动微流控芯片技术使样本与孔道内相应的固定化抗原充分接触,提高了传统酶联免疫吸附检测的灵敏度,有效地将检测限从 $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 降低到 4.14 ng/L ,检测时间从传统的 40 min 缩短至 5 min 以内。Hu 等^[28]设计了一种用于血清中多生物标志物现场检测的微流控系统。该微流控芯片集成了多个试剂存储池、阀、反应区、废液回收池等所有定量免疫检测所需的结构,同时研究人员创新性地芯片上整合了一种类似于“钉耙”结构的阀,在不同反应阶段,仪器会依次接通各个试剂存储池与反应区,驱动各种试剂流到反应区,从而完成孵育、清洗、发光等整个反应流程。成功地实现了血清样本中炎症因子C反应蛋白(CRP)和激素类指标睾酮的全自动化检测,能获得与现有方法相近的检测效果。Nishiyama 等^[29]开发了一款基于荧光标记的微流控禽流感病毒测试设备,荧光标记蛋白与血清样本中的H5禽流感病毒抗体结合并将其加载到微流控设备中,再将微流控装置连接到一个质量仅 5.5 kg 的便携式荧光偏振分析仪上,整个检测过程只需 20 min 。利用该设备从采样到获得测量结果的所有过程均可在现场完成,显著提高了检测效率。

利用液滴微流控技术(droplet microfluidic technology),通过结合一些基本液滴操作(例如分配、混合、分裂和合并)可以实现复杂的生物分析方法,并生产出可用于床旁检测的自动化集成设备^[30-31]。Jin^[32]等开发了名为“one-to-three”的数字微流控液滴生成新方法。该方法基于液滴对称撕裂可在几何中心位置保持表面张力平衡的原理,将1个大液滴分成3个液滴,生成的液滴大小甚至远远小于介质上电润湿(EWOD)数字微流控的几何极限。该高度集成的平台可快速完成磁珠洗涤,实现了在一个芯片上可以同时检测5个脑钠肽(BNP)样本,整个免疫测定过程仅需约 10 min ,可应用于人类血清中脑钠肽的定量快速检测,对心衰的诊断、预后评估、病情监测、指导治疗等具有一定价值。

随着近年来微流控技术向更微小、更集成的流体操纵平台发展,微流控可集多种操作元件于一体完成目标物的处理与分析,可与电化学、免疫、质谱、光学等技术手段相结合完成自动化微量样本检测^[33-34],能有效减少样本及试剂消耗、缩短检验时间、提高检验灵敏度,而且使仪器设备小型便携

化,为床旁检测、可穿戴设备的发展提供了新思路^[13, 35]。

2 微型电化学传感器

电化学传感器可在电场环境中对待测物产生的电信号进行分析,从而实现对待测物的定性或定量检测。基于微孔板、微流控、毛细管等的微型电化学生物传感器具有成本低、能耗低、响应快和易于微型化的优点,并可实现定量检测,已广泛应用于各种生物分子的分析^[36-38],也为重大疾病的即时检测提供了新契机。

Feng 等^[39]在微流控装置中使用DNA四面体结构探针(TSPs),并结合电化学传感技术实现了前列腺特异性抗原(PSA)的简单、快速、灵敏检测。该研究将DNA TSPs固定在金纳米花修饰的丝网印刷电极(Au NFs)上,再将生物素抗PSA(biotin-Ab1)和辣根过氧化物酶抗PSA(HRP-Ab2)抗体附着在DNA TSPs上,最后集成到由弯曲的微通道组成的PDMS微流控芯片中,通过微通道将试剂输送到电极,完成夹心免疫法捕获PSA,并通过循环伏安法和安培法读取电信号。与其他PSA检测方法相比,该微流控装置可以集液体输送、免疫反应和检测于一体,能够快速检测临床样品中的PSA(25 min),具有更宽的线性范围($1\sim 100\text{ }\mu\text{g/L}$)及更低的检测限($0.2\text{ }\mu\text{g/L}$),同时与金标准化学发光法有良好的相关性。Mahmoodi 等^[40]构建了一种纳米孔非法拉第阻抗生物传感器,用于检测微量($2\sim 5\text{ }\mu\text{L}$)人血清标本中的皮质醇,检测限低至 $5\text{ }\mu\text{g/L}$,可帮助患者居家实时监测皮质醇含量,以较低的成本更好地管理慢性炎症、应激等其他状况。

近年来,越来越多的纳米材料被应用于电化学传感器^[41-44]。Kadimisetty 等^[45]开发了一种基于3D打印的自动化免疫阵列芯片。3D打印可实现单个元器件的快速制作,同时避免光刻和软光刻等其他微流控器件制造方法所需的昂贵母版或掩模。该微型阵列芯片有9个腔室,分别用于容纳样品、洗涤缓冲液、检测纳米颗粒和电化学发光(ECL)反应,可将样品和试剂送至石墨微孔完成夹心免疫法分析。通过在微孔中使用单壁碳纳米管偶联抗体,并使用抗体修饰的RuBPY-二氧化硅纳米粒子产生ECL信号来实现高灵敏度检测。该芯片可在 25 min 内检测人血清样品中前列腺癌蛋白标志物组合(PSA、PSMA、VEGF-D、PF-4、CD-14、IGF-1、

GOLM-1), 检测限低至 85 ~110 pg/L。该芯片具有成本低, 灵敏度高, 可同时检测多个蛋白质的特点, 这种电化学传感器既可用于筛查大量生物标志物, 也可用于多种疾病的快速诊断, 有望成为救护车和医疗机构即时检测的重要诊断设备。Belushkin 等^[46]开发了一种用于快速检测炎症生物标志物的便携式数字纳米颗粒增强等离子体成像仪, 可直接从血清中快速、灵敏地检测与脓毒症相关的两种炎症标志物: 降钙素原 (PCT) 和 CRP。其成像机制是通过金纳米颗粒 (Au-NP) 与等离子体金纳米孔阵列 (Au-NHA) 结合, 对复杂介质中的单个分子进行量化。利用该设备检测 PCT 检测限低至 21.3 ng/L、CRP 检测限低至 36 ng/L, 检测时间不到 15 min, 是辅助现场快速准确诊断脓毒症的一种很有前途的解决方案。Torrente-Rodriguez 等^[47]开发了一款名为 SARS-CoV-2 RapidPlex 的迷你便携式电化学传感器。该传感器使用激光雕刻石墨烯电极通过夹心免疫法检测 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白 (NP)、抗 SARS-CoV-2 刺突蛋白 (S1) 的特异性免疫球蛋白 (S1-IgM、S1-IgG) 和 CRP。SARS-CoV-2 RapidPlex 由 4 个石墨烯工作电极 (WEs)、一个 Ag/AgCl 参比电极 (RE) 和一个石墨烯对电极 (CE) 组成, 再将这些组合电极传感器阵列连接到印刷电路板上, 用于信号处理和无线通信。应用该传感器只需采集少量唾液或血液, 靶标捕获时间低至 1 min, 有望成为快速新型冠状病毒肺炎诊断和监测的多路远程医疗平台。

在众多传感器类型中, 电化学传感器已然成为研究领域最多、应用范围最广、技术最成熟的一类传感器^[43, 48-49]。随着新型功能化纳米材料的不断涌现, 电化学传感器各项功能逐步完善^[42, 50-51]。纳米材料具有生物相容性好、比表面积大、高催化活性等优点, 进一步提高了生物传感器的灵敏度、重复性及检测限等性能。未来, 传感器的小型化、智能化技术将得到日新月异的发展并不断应用于即时检测^[52-53]。

3 基于智能手机与人工智能的POCT

智能手机具有便携性、高清图像采集装置、高速信息处理能力、优秀的人机交互界面、完善的互联网服务等特点, 基于智能手机的传感系统逐渐引起人们的关注^[54-55]。此外, 智能手机能够集成实时、准确和定量分析的功能, 也为智能手机作为生物传感系统的组成部分在即时检测中发挥作用奠定

了基础^[56]。

Chung 等^[57]展示了一种易于使用、低成本且极其灵敏的智能手机纸微流控测定方法。该方法在纸基芯片的一端添加针对重组诺如病毒 1 型衣壳 (recombinant norovirus group-1 capsid) 的抗体荧光聚苯乙烯珠, 在另一端添加样本使样本中诺如病毒颗粒与羧化的黄绿色荧光聚苯乙烯珠结合, 再将智能手机连接到一个小显微镜上识别抗体-抗原结合聚集的荧光颗粒。通过智能手机的图像采集和分析算法计算出荧光颗粒的数量, 从而对诺如病毒衣壳进行鉴定和定量。该方法在去离子水中检测限低至 1 个基因组拷贝/ μl , 在再生废水中检测限低至 10 个基因组拷贝/ μl 。Tomimuro 等^[58]开发了一种整合生物发光共振能量转移 (BRET) 开关传感器蛋白的微流控纸基分析装置。该设备由垂直组装的多层结构组成, 包括血液分离器和装载棉线的塑料膜, 其中基于 BRET 的传感器蛋白 LUMABS (LuMinescent antibody sensing proteins) 及其生物发光底物 (呋拉嗪) 以干燥形式分别预沉积在两个交织棉线上 (LUMABS 可以分布在棉线的不同部位以检测不同的蛋白质), 可进行快速生物发光检测, 配备适配器的智能手机摄像头可以捕捉到光线颜色的变化, 并将颜色数据转化为测试结果。此装置仅需极少量的全血 (5 μl), 在 5 min 内检测多种蛋白质, 如 HIV1-p17、血凝素 (HA)、I 型登革热病毒特异抗原, 可用于现场快速检测艾滋病、流感、登革热等传染病。

近年来, 人工智能 (AI) 在很多领域已经展现出优异的性能, 已经在预防、诊断和治疗等方面显示出巨大潜力^[59]。人工智能及其应用的快速进展在很大程度上归因于机器学习和深度学习^[60-61]。Yan 等^[62]设计了一种超灵敏的复合式生物传感器, 建立了夹心法检测的机器学习模型用于弱阳性和弱阴性样本的区分, 显著提高了检测的特异性和敏感性。该传感器采用一种新向量机 (SVM) 分类器的数据处理方法和弱信号的自定义波形重构方法, 使用时选择测试线的波形作为特征向量以及线性核作为核函数, 同时利用波形重建方法来恢复失真波形从而进一步检测弱信号。利用该传感器同时检测人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 和 3 个心脏标志物 (cTnI、CKMB、Myo), 理想检测极限在 0.014 IU/L, 远低于临床阈值。该方法既可以检测单个目标, 也可以检测多个目标, 可用于怀孕及心梗的快速检测。

智能检测通过强大的硬件、软件和服务组合,实现检测及治疗的高效率、低成本和优配比。尤其当前的新型冠状病毒肺炎疫情提醒我们需要即时、可适用于特殊应用场景的高效检测,疫情的到来也加速了医疗产业链各个环节的数字化、智能化转型,基于人工智能、模拟仿真、云计算的移动医疗、互联网医疗、医疗机器人等智慧医疗不断显现出巨大的市场潜力。

4 可穿戴式传感器

传统的医疗服务高度依赖医院的仪器设备,这意味着患者要到医院进行检测及治疗,十分不利于需要紧急检测及治疗的患者。近年来,可穿戴设备在人体生理信息动态、持续、实时监控等方面的优点得到即时检测行业的关注^[63-66]。

目前光学和电化学可穿戴传感器已经在汗液、泪液、唾液等体液的实时分析中显示出广阔的前景,有望为未来便携个性化检测及治疗铺平道路^[67-72]。Van Long等^[70]报道了一种可伸缩微流控免疫生物传感器(SMIB)贴片。SMIB贴片由弹性纳米复合材料(氧化石墨烯超细纤维和聚氨酯基体中rGO-Ag纳米线的导电超细纤维)构成的中空微纤维微流控处理装置和电化学阻抗免疫生物传感器组成,用于人体汗液中神经肽Y(NPY)的高灵敏体内生物传感。NPY是一种神经调节剂,反映神经系统相关状态,如抑郁症、应激反应、焦虑和癫痫等。因此,它可以作为一种潜在的应激和抑郁生物标志物。基于中空微纤维的可伸缩微流控芯片与基于多步光刻和刻蚀的微流控芯片相比,具有高延伸性、良好的稳定性和极大的液体流动便利性,并且制造工艺简单、成本低。该贴片的检测下限为50 fmol/L,动态范围大(50 fmol/L~1 nmol/L),线性好。将样本收集、孵化、检测集成于一张贴片上,只需手指简单操作即可完成检测,是一种很有前途的可穿戴式非侵入性免疫检测方法,适用于自我检测。

除了二氧化碳、氧气外,人体呼出的气体中还包含多种可以反映机体健康情况的挥发性有机物(VOC),已经有大量临床研究表明,通过呼气VOC分析仪器对呼气中的挥发性代谢物进行分析,可对感染性疾病、慢性疾病、癌症等多种疾病实现精准诊断、早期预警和病情进展追踪^[73-74]。Xue等^[75]开发出一款可以筛选人体呼出气体中是否含有冠状病毒气溶胶的可穿戴口罩传感器。该传

感器由精密排列的纳米线阵列构成,纳米线的线宽和间距与病毒气溶胶的尺寸相匹配,可以精准捕获呼出气中的病毒气溶胶。同时纳米线阵列上含有可以与病毒发生免疫反应的抗体,通过监测传感器阻抗值的变化初步检测呼出气体中是否含有冠状病毒。该智能口罩可广泛用于机场、海关、医院等人流密集场所的快速筛查。

可穿戴设备不仅可以提供短时生理数据,还可以实现持续的长期人体监测,为临床决策提供更准确的依据^[76-77]。Wang等^[69]通过开发一种由石墨烯-Nafion复合膜组成的适配子场效应管生物传感器,用于检测未稀释体液中的细胞因子。该生物传感器由覆盖有化学惰性Nafion膜的单层石墨烯薄片作为传导通道。石墨烯-Nafion膜用细胞因子IFN- γ 特异性适配子修饰,通过测量适配子-生物标志物相互作用引起的电流变化来确定IFN- γ 的浓度。该生物传感器对未稀释的人体汗液中的生物标志物检测具有很高的的一致性和灵敏度,同时通过再生循环测试(高达80个循环)和循环皱缩测试(高达100个循环)也未出现机械故障。该设备能够持续和灵敏地监测未稀释人体汗液中的IFN- γ ,检测范围为0.015~250 nmol/L,检测下限低至740 fmol/L,该生物传感器有望为开发可穿戴式生物传感系统提供机会,用于区分急性传染病患者和监测患者日常生活中的健康状况。

尽管目前可穿戴医疗设备的开发和采用仍面临挑战^[67],但是这项技术拥有极大的发展潜力,可以改变医疗行业现状,改善患者和医生之间的互动方式,从而开创一种积极的医疗方式,让患者在家中就能更好地掌握自身健康状况。

5 总结与展望

高效、快节奏的POCT理念很好地切合了体外诊断的发展方向,随着人们对生活要求的不断提高,需要多学科多方法交叉应用,不断促进蛋白质检测装备智能化、远程化、小型化、快速化、精准化、多模态融合化、诊疗一体化的发展,使之应用于临床并适用于床旁及家庭检测。目前微流控技术的发展使这一目标有了新的突破口,为精确分析超微量样品提供了先决条件。可穿戴健康监测智能系统被认为是下一代远程医学的个人便携设备,是具有实时跟踪生理信号能力的健康监测系统,为疾病诊断和健康评估提供一种方便和无创的方法。同时随着计算机科学的发展,越来越多的算法被应用于

蛋白质分析,大大提高了分析的效率及准确性,并且随着5G和人工智能的技术进步,未来智慧医疗及移动医疗将是即时检测发展的新风向标和里程碑。开发可穿戴、智能便携式医疗检测系统将推动临床常规诊断方法从集中医疗服务走向居家医疗服

务。即时检测设备的种类和方式不尽相同,除诊断、治疗疾病外,对从事国防、社会安全、消防和其他紧急工作的人员来说,即时检测尤为重要。即时检测有望引领多个领域的变革。

Table 1 Summary of POCT detection technology application

表1 POCT检测技术应用总结

检测产品	检测技术及原理	检测的蛋白质	检测限	检测时间	适用样本/应用范围	优点	文献
微流控							
Reciprocating-flowing ELISA chip (RF-ELISA chip)	往复流动微流控+酶联免疫吸附	SARS-CoV-2病毒核衣壳蛋白	4.14 ng/L	5 min	血清/新型冠状病毒肺炎诊断	制作便捷,价格低廉,准确性高(真阳性率和阴性率均为100%),检测时间短(独特的往复流动微流控芯片技术使充分免疫结合所需的时间减少约90%),检出限低	[27]
Microfluidic chemiluminescent immune sensor	微流控+化学发光免疫	C反应蛋白(CRP) 睾酮	CRP: 4.27 µg/L 睾酮: 0.45 µg/L	70 min	血清/炎症诊断及激素水平检测	操作简单,具有良好的重复性和较高的灵敏度,反应进程可控	[28]
Portable FP analyzer	微流控+荧光偏振免疫分析	H5禽流感病毒抗体		20 min	血清/H5禽流感诊断	价格低廉,所需样本量少(2 µl),一次可测量9个样本,便携	[29]
微型电化学传感器							
Microfluidic-electrochemical (µFEC) detection system	微流控+循环伏安法和安培法	前列腺特异性抗原(PSA)	0.2 µg/L	25 min	血清/癌症诊断	液体自动输送,操作步骤、成本、检测时间、灵敏度等方面均优于现有的PSA检测方法	[39]
Miniature 3D printed immunoarray	微孔电化学发光	前列腺癌标志物(PSA、PSMA、VEGF-D、PF-4、CD-14、IGF-1、GOLM-1)	78~110 pg/L	25 min	血清/癌症诊断	操作简单,价格低廉,所需样本量少(1 µl),可检测8种蛋白质,检测范围宽	[45]
Portable digital nanoparticle-enhanced plasmonic imager	电化学表面等离子成像技术	降钙素(PCT) C反应蛋白(CRP)	PCT: 21.3 ng/L CRP: 36 ng/L	15 min	血清/炎症诊断	价格低廉,检测范围宽,可辅助现场快速准确诊断脓毒症	[46]
SARS-CoV-2 RapidPlex	激光雕刻石墨烯电极+夹心免疫法	SARS-CoV-2核衣壳蛋白 抗SARS-CoV-2 刺突蛋白特异性 免疫球蛋白(S1-IgM、S1-IgG) C反应蛋白		1 min	唾液或血液/新型冠状病毒肺炎诊断	操作简单,检测时间短,通过不同免疫球蛋白诊断疾病的阶段来跟踪感染进展,区分具有传染性的、易受攻击的和/或免疫的人群	[47]

续表1

检测产品	检测技术及原理	检测的蛋白质	检测限	检测时间	适用样本/应用范围	优点	文献
基于智能手机与人工智能的POCT							
Microfluidic paper analytic devices (μ PADs)	智能手机+免疫荧光	诺如病毒1型衣壳	1~10个基因组拷贝/ μ l		食物, 水和污染物/诺如病毒检测	操作简单, 灵敏度高 (从100 ag/L到10 pg/L的所有浓度均与阴性对照有显著差异)	[57]
Microfluidic thread-based analytical devices (μ TADs)	智能手机+微流控+发光共振能量转移	HIV1-p17 血凝素 (HA) I型登革热病毒 特异抗原	HIV: 4.0 nmol/L HA: 2.1 nmol/L DEN: 14.9 nmol/L	5 min	全血/获得性免疫缺陷综合征、流感和革登热诊断	所需样本量少 (5 μ l), 可检测多种蛋白质	[58]
Magnetic nanoparticle (MNP) -labeled immunochromatography test strips (ICTSs)	机器学习+免疫层析试纸	人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 肌钙蛋白 (cTnI) 肌酸激酶 (CKMB) 肌红蛋白 (Myo)	HCG: 0.014 IU/L	20 min	血清/心梗及怀孕	机器学习实现对弱阳性和阴性样品进行分类, 特异性、灵敏度、准确度高 (100%), 检测时间短, 检出限低, 线性范围宽, 回收率在92.8%~115.63%, 重复性好	[62]
可穿戴式传感器							
Graphene-Nafion field-effect transistor (GNFET) biosensor	Nafion膜+场效应管生物传感器	γ 干扰素 (IFN- γ)	740 fmol/L		汗液/炎症、传染病、免疫疾病诊断	灵敏度、重复性高, 高强度重复测试及皱缩测试后仍保持与首次测试高度一致的结果, 皮肤贴合性好, 无创	[69]
Stretchable microfluidic immunobiosensor (SMIB) patch	贴片+电阻抗免疫传感器	神经肽Y (NPY)	50 fmol/L		汗液/应激反应、抑郁、癫痫诊断	操作简单, 检测范围宽, 皮肤贴合性好, 无创	[70]
Intelligent face mask	口罩+电阻抗免疫传感器	SARS-CoV-2刺突蛋白气溶胶	7 pfu/ml	5 min	气体/新型冠状病毒肺炎诊断	价格低廉, 操作便捷, 检测时间短, 检出限低, 储存方便, 无创	[75]

参 考 文 献

- [1] Lin H, Zhou H, Gao L, *et al.* Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant spike protein. *BMC Vet Res*, 2018, **14**(1): 243
- [2] Fang H, Zhang H, Li L, *et al.* Rational design of a two-photon fluorogenic probe for visualizing monoamine oxidase a activity in human glioma tissues. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, **59**(19): 7536-7541
- [3] Needham L M, Weber J, Varela J A, *et al.* ThX - a next-generation probe for the early detection of amyloid aggregates. *Chemical Science*, 2020, **11**(18):4578-4583
- [4] Smits A H, Vermeulen M. Characterizing protein-protein interactions using mass spectrometry: challenges and opportunities. *Trends Biotechnol*, 2016, **34**(10): 825-834
- [5] Ma Y, Chen C, Yang M, *et al.* Serum peptide profiling for potential biomarkers in early diagnosis of *Escherichia coli* bloodstream infection. *Cytokine*, 2019, **120**: 71-77
- [6] Islam F, Haque M H, Yadav S, *et al.* An electrochemical method for sensitive and rapid detection of FAM134B protein in colon cancer samples. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 133
- [7] Guo W, Ding H, Gu C, *et al.* Potential-resolved multicolor electrochemiluminescence for multiplex immunoassay in a single sample. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(46): 15904-15915
- [8] Challa P K, Peter Q, Wright M A, *et al.* Real-time intrinsic fluorescence visualization and sizing of proteins and protein complexes in microfluidic devices. *Anal Chem*, 2018, **90**(6): 3849-3855
- [9] Feng S, Mao S, Dou J, *et al.* An open-space microfluidic chip with fluid walls for online detection of VEGF via rolling circle amplification. *Chem Sci*, 2019, **10**(37): 8571-8576

- [10] Rehman Z U, Idris A, Khan A. Multi-dimensional scaling based grouping of known complexes and intelligent protein complex detection. *Comput Biol Chem*, 2018, **74**: 149-156
- [11] Stromer A, Rose R, Schafer M, *et al.* Performance of a point-of-care test for the rapid detection of SARS-CoV-2 antigen. *Microorganisms*, 2020, **9**(1): 58
- [12] Nelson P P, Rath B A, Fragkou P C, *et al.* Current and future point-of-care tests for emerging and new respiratory viruses and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, **10**: 181
- [13] Vasala A, Hytonen V P, Laitinen O H. Modern tools for rapid diagnostics of antimicrobial resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, **10**: 308
- [14] Westgard S A, Goldschmidt H M J, Ehrmeyer S S. POCT analysts' perspective: practices and Wants for improvement. *J Appl Lab Med*, 2020, **5**(3): 480-493
- [15] Yu J N, Brock T K, Mecozzi D M, *et al.* Future connectivity for disaster and emergency point of care. *Point Care*, 2010, **9**(4): 185-192
- [16] Lenters-Westra E, English E. Analysis: investigating the quality of POCT devices for HbA1c, what are our next steps?. *J Diabetes Sci Technol*, 2019, **13**(6): 1154-1157
- [17] Song Q, Sun X, Dai Z, *et al.* Point-of-care testing detection methods for COVID-19. *Lab Chip*, 2021, **21**(9): 1634-1660
- [18] Ferreira C E S, Guerra J C C, Shessarenko N, *et al.* Point-of-care testing: general aspects. *Clin Lab*, 2018, **64**(1): 1-9
- [19] Egilmezer E, Walker G J, Bakthavathsalam P, *et al.* Systematic review of the impact of point-of-care testing for influenza on the outcomes of patients with acute respiratory tract infection. *Rev Med Virol*, 2018, **28**(5): e1995
- [20] Dalton J. Communications with lab and POCT users. *Pract Lab Med*, 2021, **25**: e00223
- [21] Lim H, Jafry A T, Lee J. Fabrication, flow control, and applications of microfluidic paper-based analytical devices. *Molecules*, 2019, **24**(16): 2869
- [22] Boyd-Moss M, Baratchi S, Di Venere M, *et al.* Self-contained microfluidic systems: a review. *Lab Chip*, 2016, **16**(17): 3177-3192
- [23] Zhao Q, Cui H, Wang Y, *et al.* Microfluidic platforms toward rational material fabrication for biomedical applications. *Small*, 2020, **16**(9): e1903798
- [24] Lin Z, Luo G, Du W, *et al.* Recent advances in microfluidic platforms applied in cancer metastasis: circulating tumor cells' (CTCs) isolation and tumor-on-a-chip. *Small*, 2020, **16**(9): e1903899
- [25] Annabestani M, Esmaili-Dokht P, Fardmanesh M. A novel, low cost, and accessible method for rapid fabrication of the modifiable microfluidic devices. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 16513
- [26] Soum V, Park S, Brilian A I, *et al.* Programmable paper-based microfluidic devices for biomarker detections. *Micromachines (Basel)*, 2019, **10**(8): 516
- [27] Liu Y, Tan Y, Fu Q, *et al.* Reciprocating-flowing on-a-chip enables ultra-fast immunobinding for multiplexed rapid ELISA detection of SARS-CoV-2 antibody. *Biosens Bioelectron*, 2021, **176**: 112920
- [28] Hu B, Li J, Mou L, *et al.* An automated and portable microfluidic chemiluminescence immunoassay for quantitative detection of biomarkers. *Lab Chip*, 2017, **17**(13): 2225-2234
- [29] Nishiyama K, Takeda Y, Maeki M, *et al.* Rapid detection of anti-H5 avian influenza virus antibody by fluorescence polarization immunoassay using a portable fluorescence polarization analyzer. *Sens Actuators B Chem*, 2020, **316**: 128160
- [30] Zilionis R, Nainys J, Veres A, *et al.* Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics. *Nat Protoc*, 2017, **12**(1): 44-73
- [31] Pellegrino M, Sciambi A, Treusch S, *et al.* High-throughput single-cell DNA sequencing of acute myeloid leukemia tumors with droplet microfluidics. *Genome Res*, 2018, **28**(9): 1345-1352
- [32] Jin K, Hu C, Hu S, *et al.* "One-to-three" droplet generation in digital microfluidics for parallel chemiluminescence immunoassays. *Lab Chip*, 2021, **21**(15): 2892-2900
- [33] Hiramoto K, Ino K, Nashimoto Y, *et al.* Electric and electrochemical microfluidic devices for cell analysis. *Front Chem*, 2019, **7**: 396
- [34] Sun M, Li Z, Yang Q. μ droPi: a hand-held microfluidic droplet imager and analyzer built on Raspberry Pi. *J Chem Educ*, 2019, **96**(6): 1152-1156
- [35] Chen P, Chen C, Su H, *et al.* Integrated and finger-actuated microfluidic chip for point-of-care testing of multiple pathogens. *Talanta*, 2021, **224**: 121844
- [36] Chen K, Chou W, Liu L, *et al.* Electrochemical sensors fabricated by electrospinning technology: an overview. *Sensors (Basel)*, 2019, **19**(17): 3676
- [37] Lima H R S, Da Silva J S, De Oliveira Farias E A, *et al.* Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of antineoplastic drugs. *Biosens Bioelectron*, 2018, **108**: 27-37
- [38] Zuidema C, Afshar-Mohajer N, Tatum M, *et al.* Efficacy of paired electrochemical sensors for measuring ozone concentrations. *J Occup Environ Hyg*, 2019, **16**(2): 179-190
- [39] Feng D, Su J, Xu Y, *et al.* DNA tetrahedron-mediated immune-sandwich assay for rapid and sensitive detection of PSA through a microfluidic electrochemical detection system. *Microsystems & Nanoengineering*, 2021, **7**(1): 33
- [40] Mahmoodi S R, Xie P, Zachs D P, *et al.* Single-step label-free nanowell immunoassay accurately quantifies serum stress hormones within minutes. *Sci Adv*, 2021, **7**(27): eabf4401
- [41] Kudr J, Adam V, Zitka O. Fabrication of graphene/molybdenum disulfide composites and their usage as actuators forelectrochemical sensors and biosensors. *Molecules*, 2019, **24**(18): 3374
- [42] Wu S, Wang X, Li Z, *et al.* Recent advances in the fabrication and application of graphene microfluidic sensors. *Micromachines (Basel)*, 2020, **11**(12): 1059
- [43] Zhang C, Du X. Electrochemical sensors based on carbon nanomaterial used in diagnosing metabolic disease. *Front Chem*, 2020, **8**: 651
- [44] Qian L, Durairaj S, Prins S, *et al.* Nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors for the detection of pharmaceutical compounds. *Biosens Bioelectron*, 2021, **175**: 112836
- [45] Kadimisetty K, Malla S, Bhalerao K S, *et al.* Automated 3D-

- printed microfluidic array for rapid nanomaterial-enhanced detection of multiple proteins. *Anal Chem*, 2018, **90**(12): 7569-7577
- [46] Belushkin A, Yesilkoy F, Gonzalez-Lopez J J, *et al.* Rapid and digital detection of inflammatory biomarkers enabled by a novel portable nanoplasmonic imager. *Small*, 2020, **16**(3): e1906108
- [47] Torrente-Rodriguez R M, Lukas H, Tu J, *et al.* SARS-CoV-2 RapidPlex: a graphene-based multiplexed telemedicine platform for rapid and low-cost COVID-19 diagnosis and monitoring. *Matter*, 2020, **3**(6): 1981-1998
- [48] Huang L, Tian S, Zhao W, *et al.* Electrochemical vitamin sensors: a critical review. *Talanta*, 2021, **222**: 121645
- [49] Hoekstra R, Blondeau P, Andrade F J. Distributed electrochemical sensors: recent advances and barriers to market adoption. *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**(17): 4077-4089
- [50] Hammond J L, Formisano N, Estrela P, *et al.* Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays Biochem*, 2016, **60**(1): 69-80
- [51] Thatikayala D, Ponnammam D, Sadasivuni K K, *et al.* Progress of advanced nanomaterials in the non-enzymatic electrochemical sensing of glucose and H_2O_2 . *Biosensors (Basel)*, 2020, **10**(11): 151
- [52] Xue T, Liu P, Zhang J, *et al.* Multiwalled carbon nanotube-N-doped graphene/poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): poly (styrenesulfonate) nanohybrid for electrochemical application in intelligent sensors and supercapacitors. *ACS Omega*, 2020, **5**(44): 28452-28462
- [53] Liu Y, Li X, Chen J, *et al.* Micro/nano electrode array sensors: advances in fabrication and emerging applications in bioanalysis. *Front Chem*, 2020, **8**: 573865
- [54] Sun F, Ganguli A, Nguyen J, *et al.* Smartphone-based multiplex 30-minute nucleic acid test of live virus from nasal swab extract. *Lab Chip*, 2020, **20**(9): 1621-1627
- [55] Iellamo F, Sposato B, Volterrani M. Telemonitoring for the management of patients with heart failure. *Card Fail Rev*, 2020, **6**: e07
- [56] Kim H, Park S, Jeong I G, *et al.* Noninvasive precision screening of prostate cancer by urinary multimarker sensor and artificial intelligence analysis. *ACS Nano*, 2021, **15**(3): 4054-4065
- [57] Chung S, Breshears L E, Perea S, *et al.* Smartphone-based paper microfluidic particulometry of norovirus from environmental water samples at the single copy level. *ACS Omega*, 2019, **4**(6): 11180-11188
- [58] Tomimuro K, Tenda K, Ni Y, *et al.* Thread-based bioluminescent sensor for detecting multiple antibodies in a single drop of whole blood. *ACS Sens*, 2020, **5**(6): 1786-1794
- [59] Zhang Q, Chen Z, Liu G, *et al.* Artificial intelligence clinicians can use chest computed tomography technology to automatically diagnose coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia and enhance low-quality images. *Infect Drug Resist*, 2021, **14**: 671-687
- [60] Feeny A K, Chung M K, Madabhushi A, *et al.* Artificial intelligence and machine learning in arrhythmias and cardiac electrophysiology. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2020, **13**(8): e007952
- [61] Ting D S W, Pasquale L R, Peng L, *et al.* Artificial intelligence and deep learning in ophthalmology. *Br J Ophthalmol*, 2019, **103**(2): 167-175
- [62] Yan W, Wang K, Xu H, *et al.* Machine learning approach to enhance the performance of MNP-labeled lateral flow immunoassay. *Nanomicro Lett*, 2019, **11**(1): 7
- [63] Wang X, Liu Z, Zhang T. Flexible sensing electronics for wearable/attachable health monitoring. *Small*, 2017, **13**(25): 1602790
- [64] Lee X K, Chee N, Ong J L, *et al.* Validation of a consumer sleep wearable device with actigraphy and polysomnography in adolescents across sleep opportunity manipulations. *J Clin Sleep Med*, 2019, **15**(9): 1337-1346
- [65] Read M L, Morgan P B, Maldonado-Codina C. A wearable device to monitor ocular comfort. *Cont Lens Anterior Eye*, 2019, **42**(5): 569-574
- [66] Li P, Lee G-H, Kim S Y, *et al.* From diagnosis to treatment: recent advances in patient-friendly biosensors and implantable devices. *Acs Nano*, 2021, **15**(2): 1960-2004
- [67] Kim J, Campbell A S, De Avila B E, *et al.* Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(4): 389-406
- [68] Gao W, Brooks G A, Klonoff D C. Wearable physiological systems and technologies for metabolic monitoring. *J Appl Physiol* (1985), 2018, **124**(3): 548-556
- [69] Wang Z, Hao Z, Wang X, *et al.* A flexible and regenerative aptameric graphene-nafion biosensor for cytokine storm biomarker monitoring in undiluted biofluids toward wearable applications. *Advanced Functional Materials*, 2021, **31**(4): 2005958
- [70] Van Long H, Tran Quang T, Meesepong M, *et al.* Hollow microfibers of elastomeric nanocomposites for fully stretchable and highly sensitive microfluidic immunobiosensor patch. *Advanced Functional Materials*, 2020, **30**(46): 2004684
- [71] Munje R D, Muthukumar S, Jagannath B, *et al.* A new paradigm in sweat based wearable diagnostics biosensors using room temperature ionic liquids (RTILs). *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 1950
- [72] Jiang X, Lillehoj P B. Microneedle-based skin patch for blood-free rapid diagnostic testing. *Microsyst Nanoeng*, 2020, **6**: 96
- [73] Broza Y Y, Vishinkin R, Barash O, *et al.* Synergy between nanomaterials and volatile organic compounds for non-invasive medical evaluation. *Chem Soc Rev*, 2018, **47**(13): 4781-4859
- [74] Nurmatov U B, Tagiyeva N, Semple S, *et al.* Volatile organic compounds and risk of asthma and allergy: a systematic review. *Eur Respir Rev*, 2015, **24**(135): 92-101
- [75] Xue Q, Kan X, Pan Z, *et al.* An intelligent face mask integrated with high density conductive nanowire array for directly exhaled coronavirus aerosols screening. *Biosens Bioelectron*, 2021, **186**: 113286
- [76] Kim J, Campbell A S, de Ávila B E, *et al.* Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(4): 389-406
- [77] Sana F, Isselbacher E M, Singh J P, *et al.* Wearable devices for ambulatory cardiac monitoring: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol*, 2020, **75**(13): 1582-1592

New Technologies for Protein Point-of-care Testing*

KANG Xiu-Zhi¹⁾, CHEN Yue¹⁾, TIAN Yu-Lin¹⁾, LIU Meng-Zhu¹⁾, SUN Jing^{2,3)**}, LANG Ming-Fei^{1,3)**}

¹⁾Medical College, Dalian University, Dalian 116622, China;

²⁾College of Environmental and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China;

³⁾Dalian Key Laboratory of Oligosaccharide Recombination and Recombinant Protein Modification, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract Proteins are the executors of various kinds of metabolism and regulation in cells and they are also the most important target molecules of pathogenic factors and drugs. The study of protein expression is necessary to understand life, disease processes and drug effects. At present, routine protein detection methods in clinical practice require the support of large equipment. However, with the development of medical technologies and especially under the special background of the coronavirus (COVID-19) pandemic, point-of-care testing (POCT, also known as on-site testing and bedside testing) has become the current development trend. POCT can improve the ways of interaction between patients and doctors and create a positive approach to medical treatment. In addition to diagnosing and treating diseases, POCT has advantages in both on-site and remote detection for personnel engaged in emergency work. Therefore, it is very important to develop accurate, sensitive, simple and fast protein POCT. To develop miniature devices for POCT, many new approaches have been attempted in recent years, including microfluidics, electrochemical biosensors, smart phones, artificial intelligence, and wearable devices. Microfluidics deals with small quantities of samples and is a universal platform for integrating a variety of technologies, such as immunochemistry, electrochemistry, and mass spectrometry. With microfluidic technology, the sample size, reaction time, and detection limit could be easily improved to satisfactory levels. The use of electrochemistry in detecting proteins has opened a new field in POCT. Since the core of electrochemistry lies in the nanocatalyst development, the rapidly growing research on nanomaterials also has facilitated and expanded the areas of POCT applications. Furthermore, the current frontier technologies employing 5G, artificial intelligence, and wearable devices have not only generated new possibilities but also greatly inspired scientists to create novel POCT devices. In conclusion, with the increasing demand of people and the continuous progress of science and technology, the development direction of future protein detection methods will be focused on portability, intellectualization, rapidity, integration of diagnosis and treatment by multidisciplinary approaches for better application in clinical practice and applicability for bedside and home testing.

Key words POCT, protein detection, microfluidics, electrochemical sensor, wearable device, nanomaterial, smart device

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0209

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Liaoning Province (2019JH3/30100006, 2021JH6/10500143).

** Corresponding author.

LANG Ming-Fei. Tel: 86-411-87402284; E-mail: langmingfei@dlu.edu.cn

SUN Jing. Tel: 86-411-87402296; E-mail: sunjing@dlu.edu.cn

Received: July 22, 2021 Accepted: November 10, 2021