

## 微流控技术在临床检测中的应用

沈韧 万谅 贾艳伟\*

**[摘要]** 微流控技术是近二三十年来飞速发展的一种对微小量级的液体进行操控的技术。通过压力装置、机械装置、电路控制系统、甚至是光波、声波等多种装置可以驱动微升到皮升量级的连续液体或者离散液滴进行移动、融合、分裂等动作。应用于生物医学领域,微流控技术可以节省样本和试剂用量,减少反应时间,缩小仪器体积,并提高实验的自动化程度,具有将一系列生化反应集成到一张微小的“芯片实验室”上的潜力。本文概述了微流控技术的基本原理以及微流控芯片在核酸检测、免疫分析、细胞分析等领域的应用,以展示该技术在临床检测领域的应用前景及挑战。

**[关键词]** 微流控; 临床检测; 芯片实验室

### Applications of microfluidic technology in clinical diagnosis

SHEN Ren, WAN Liang, JIA Yanwei\*

(State Key Laboratory of Analog and Mixed Signal VLSI, University of Macau, Macau, China, 999078)

**[ABSTRACT]** Microfluidics is a technology which has been rapidly developed in the past two or three decades to control tiny amounts of liquid. A large number of actuation forces can be used to activate the movement of fluids such as pressure pumps or valves, mechanic devices, electrical controlling system, optical forces and acoustic forces. When applied in biomedical field, microfluidics can reduce the consumption of sample and reagents and the reaction time, minimize the footprint of diagnostic devices. Also this technique is compatible with automated control system with the potential to form “lab-on-a-chip” platform by integrating a series of biological and chemical reactions for a complete analysis. In this review, the basic concepts in microfluidics, the applications of microfluidic chips in clinical diagnosis and its future prospect and challenges will be summarized.

**[KEY WORDS]** Microfluidics; Clinical diagnosis; Lab-on-a-chip

微流控技术是一种对微尺度流体(微升到皮升量级)进行精确控制和操纵的技术。近二三十年来,得益于纳米制造技术的成熟与生化技术对操纵微量液体的需求,微流控技术取得了飞速的发展。与传统的检测方法相比,基于微流控平台的检测技术具有节省样本与试剂用量,反应速度更快,高通量,易便携,自动化潜力高等优势。

1998年 Burns 等<sup>[1]</sup>提出的将多种生物、化学分析功能整合在一张微小芯片上的“芯片实验室”(lab-on-a-chip, LOC)的概念,展示了微流控技术应用于临床检测、精准医疗的美好前景。近年来,开发“芯片实验室”,又称“微型全分析系统”,已经发展为一个物理、微电子、材料、化学、生物、医学等多学科交叉的新型研究领域。本文

基金项目:澳门科学技术发展基金项目(FDCT 110/2016/A3);澳门大学校内资助项目(MYRG 2017-00022-AMSV, SRG 2016-00072-AMSV)

作者单位:澳门大学模拟与混合信号超大规模集成电路国家重点实验室,澳门 999078

\*通讯作者:贾艳伟, E-mail: yanweijia@umac.mo

主要介绍了微流控技术的分类、原理,以及其在临床核酸检测、免疫蛋白检测、药物筛查等方面的应用,以展示该技术在临床检测领域的应用前景及挑战。

## 1 微流控的分类及原理

微流控技术有很多不同的细分领域。基于被操控的液体形态,微流控技术可简单分为连续流体微流控(continuous-flow microfluidics)和液滴微流控(droplet microfluidics)。基于液体移动的路径,微流控技术可分为通道微流控(channel-based microfluidics)和基于开放平台的微流控技术(open platform microfluidics)。

通道微流控通过在玻璃、硅片、高分子聚合物如聚二甲基矽氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)等材料上构建微流通道<sup>[2-5]</sup>,利用阀门、泵等部件控制液体流速。由于PDMS价格便宜、制造方便、透明、具有较高的生物相容性,基于PDMS的微流控芯片获得了广泛的应用。

基于开放平台的微流控技术使得被操控的液滴不限于在通道中流动,比如基于电润湿现象<sup>[6]</sup>(electrowetting on dielectric, EWOD)开发的数字微流控技术(digital microfluidics, DMF)<sup>[7]</sup>。液体在介电表面的电润湿现象是指当液滴位于镀有一层疏水性介电层的平面电极阵列之上,对电极通电时,液滴与通电电极接触位置的接触角会变小,从而促使液滴移动。因此可以通过电路控制来操控微升到皮升量级的离散液滴进行移动、融合、分裂等动作。此外,除了加以电场驱动液滴<sup>[8-10]</sup>,还有利用光敏材料的光驱动型<sup>[11]</sup>、利用压电材料的力驱动型<sup>[12]</sup>和表面声波驱动型<sup>[13]</sup>等数字微流控技术。与传统的管道式微流技术相比,数字微流控技术无需泵、阀门等外接部件即可对离散液滴进行独立控制,也更容易与温控系统整合,更具有集成化、自动化的潜力。

此外,纸质微流控<sup>[14]</sup>也属于基于开放平台的微流控技术,其原理是通过在纸基质上构建亲水通道来驱动液滴被动移动。由于纸基质成本与其它基质相比大为降低,纸质微流控技术也吸引了众多研究者的目光<sup>[7, 15]</sup>。

## 2 微流控在临床检测领域的应用及进展

微流控技术的发展促进了临床检测领域“即时检验”(point-of-care testing, POCT)<sup>[16]</sup>概念的诞生与发展。“即时检验”是指在照顾病人的当下即可使用的医学检测方法,其检测设备需要具有便携性、操作简单、检测速度快、结果准确可靠,可由非专业检验人员甚至病人自己操作,可极大减轻专业医学检测人员的负担。目前微流控技术已在临床检测的多个方面如核酸检测、免疫测定、耐药性检测等获得应用。

### 2.1 在核酸检测中的应用

在对临床样本中的DNA或RNA进行分析之前,需要先将核酸分子从原始样本中提取、纯化。微流控芯片中最常用的核酸提纯方法是磁珠法<sup>[17]</sup>。Sista等人<sup>[18]</sup>在数字微流控芯片上利用磁珠法从人全血样本中成功提纯人基因组DNA,并用于后续的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)。在该系统中,血液样本在芯片上相继与裂解液、DNA捕获磁珠、清洗液、洗脱液结合。通过激活电极移动液滴,配合位于芯片底部的磁力装置,可实现不同液滴与磁珠的结合与分离,从而完成DNA提纯过程。许多微流控芯片在提取核酸时,会通过加热来加速细胞裂解<sup>[19-20]</sup>。鉴于对核酸进行后续分析通常需要控温装置,这种设计在不增加设备复杂度的同时可以提高核酸提取的效率。除了磁珠法、加热法等方法,一些微流控芯片利用介电泳效应(dielectrophoresis trapping)<sup>[21]</sup>、等速电泳分离<sup>[22]</sup>等微流控领域独有的技术来完成核酸分子的提纯。此外,为了满足第二代测序技术对于更高纯度核酸样本的需求,Choi等人<sup>[23]</sup>利用惯性聚焦技术(inertial focusing),使全血、血浆样本中的巨细胞病毒颗粒在通过螺旋形的微流通道后与血细胞分离,降低了样本中人类基因的比例,减少了后续测序的背景噪音。

作为一种高特异性、高灵敏度、反应快速的核酸扩增手段,PCR在微流控领域的应用也得以充分开发。精确的温度控制系统是完成PCR的基本条件。基于温控的实现方法,可以简单地将微流控芯片上的PCR方法分为2类:静止PCR和动态PCR。在静止PCR方法中,反应液在PCR过程中

位置不变,通过对固定反应点的升降温来实现热循环。如 Chang 等人<sup>[24]</sup>利用金属铂作为加热元件和感温元件对固定的 PCR 反应位点进行温控,成功在数字微流控芯片上扩增出二型登革病毒核酸。在动态 PCR 方法中,反应液在几个具有特定温度的恒温域之间受控地来回移动,以此实现反应液的热循环。Sista 等人<sup>[18]</sup>开发的用于 PCR 的微流控芯片具有一个 60℃ 恒温域和一个 95℃ 恒温域,反应液在 2 个恒温域之间移动,18 min 即可完成 40 个循环的 PCR 反应。PCR 与微流控技术的结合还突破了传统 PCR 方法反应速度的极限。对于液滴微流控来说,微小液滴具有的高表面积与体积比使得热量传导更快、更均一,可极大加速 PCR 反应进程。Wheeler 等人<sup>[25]</sup>从反应热力学、DNA 聚合酶等角度探索了在微流控芯片上进行超快速 PCR 的极限,利用适合于进行快速 PCR 的 SpeedSTAR™ HS DNA 聚合酶或 KAPA2G DNA 聚合酶,并减少在变性、退火、延伸各步骤的停留时间,在 3 min 以内完成了 35 个循环的 PCR 扩增反应。陈天蓝等人<sup>[26]</sup>设计的数字微流控芯片用铂电极作为温控系统,可以使液滴超快速升降温,在 7 s 之内完成对 SYBR 和特异性分子信标探针的溶解曲线分析。与传统的 PCR 设备相比,不丧失灵敏度的前提下,在大部分微流控芯片上进行 PCR 可以至少减少 50% 的反应时间和 70% 的样本消耗<sup>[7]</sup>。

除了与 PCR 技术结合,各种基于微流控芯片的等温核酸扩增技术也得以开发。虽然在灵敏度和特异性方面与 PCR 有差别,但由于等温扩增技术对温度的精准控制要求较低,开发者更容易将相应设备小型化、便携化。万谅等人<sup>[27]</sup>开发的便携式微流控设备,可在不到一个鞋盒大小的数字微流控平台上实现对布鲁氏菌基因的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)及检测。在 67℃ 40 min 的扩增反应之后,通过对分子信标探针的溶解曲线分析,不到 5 min 即可完成对目的基因的检测。Laili 等人<sup>[28]</sup>开发的微流控核酸检测芯片则结合了滚环扩增技术(rolling circle replication, RCA)和微流电泳技术,在 37℃ 60 min 的 RCA 扩增反应后,可通过在微流通道中进行电泳分离来检测样本中是否含有霍乱弧

菌的目的基因。

鉴于微流控领域反应液的微小体积,更需要高灵敏度的检测方法检测样本中的核酸分子。目前微流控芯片上开发的实时 PCR 方法最常用的是荧光检测法<sup>[29]</sup>,通过 SYBR 等非特异性嵌入染料或者 Taqman 探针、分子信标探针等特异性荧光探针检测目的基因。小型发光二极管可被整合到微流控系统中,代替较大的汞灯、水银灯等作为激发光源。除了实时 PCR,研究者们在各种微流控平台上整合了核酸杂交技术<sup>[13]</sup>、毛细管电泳技术<sup>[30]</sup>、焦磷酸测序技术<sup>[31]</sup>、DNA 光学图谱技术<sup>[32]</sup>等核酸分析方法,作为核酸扩增产物的后续检测分析方法。

## 2.2 在免疫分析中的应用

基于抗原抗体之间特异性结合的免疫分析法是临床诊断领域最常用的检测方法之一。传统的免疫分析方法,如酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),具有成本低,易操作的优点,但耗时长、费人力、需要额外设备如酶标仪等特性也阻碍了其应用于即时检测。基于微流控平台的免疫分析方法<sup>[33-34]</sup>,可以促进抗原抗体之间的吸附,减少反应时间,实现自动控制,整合小型光学探头使设备小型化,实现即时检测的目标。

诱饵抗原(或抗体)的包被、液相的转移和反应信号的捕捉是酶免分析试验最基本的 3 个方面。

诱饵抗原(或抗体)的包被对酶免试验的灵敏度和特异性有着极大影响。平面介质(如 PDMS、玻璃等)、磁珠和非磁性微球是微流控领域 3 类最常用的包被介质。Kevin 等人<sup>[35]</sup>将蛋白质的包被整合到 PDMS 聚合过程中,由于该方法简单易行并具有较高包被效率,在 PDMS 微流芯片的应用具有很大潜力。

在通道型微流控芯片中,液相转移常通过操纵泵和阀门来完成,也可以利用离心力等方法完成。Wang 等人<sup>[36]</sup>通过微型气动泵和微型气动阀,完成了在 PDMS 芯片上对丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)抗体的酶免检测。Lai 等人<sup>[37]</sup>基于微离心力开发的酶免分析芯片,可将酶免试验整合到一张普通光碟大小的微流设备中。在数字微

流控芯片中,液相的更换通常由电极驱动液体移动配合着磁力装置完成。Wheeler 等人<sup>[38]</sup>设计的数字微流控芯片中,位于芯片底部的磁力装置用于固定或移动包被了风疹病毒表面抗原的磁珠,驱动电极来控制样本、酶标记物、显色液等不同液滴与磁珠融合、分离,可同时完成风疹病毒 IgM 和 IgG 的自动化检测。

传统实验室进行的酶免分析方法中,通常使用酶标仪测吸光度来确认反应结果。而微流控设备多数选择用荧光信号来检测芯片上酶免反应的结果。相比于吸光度,荧光信号灵敏度和特异性都更高,且将现有的荧光标记系统用于微流控芯片上可实现多重检测。Tohid 等人<sup>[39]</sup>设计的 PDMS 微流芯片可以在单一通道完成对五种抗体的多重检测。除了光学信号,电化学信号也常应用于微流控芯片上去检测酶免反应结果<sup>[40-42]</sup>,通过检测被免疫反应改变的电势、电流、电压、电容、电阻等因素,可以获得定量结果。与光学信号相比,电化学信号不需要额外的激发光源,更容易被整合到小型化的微流控系统中,而且电化学信号的检测灵敏度不受光程、液体浊度等因素的影响,用于微流控系统有着天然的优势。

### 2.3 在细胞分析中的应用

开发能够进行细胞培养、分选、分析的微流控芯片也是微流控领域的一大研究热点。微流控技术小型化、高通量的特点使得其具有利用珍贵稀少的组织细胞样本进行高通量分析的潜力,为精准医疗、个性化医疗提供支持<sup>[43]</sup>。Irena 等人<sup>[44]</sup>验证了在数字微流控芯片上进行细胞培养、药物细胞毒性分析实验的可行性。该实验中,普朗尼克 F68 作为添加剂被加入液滴中,以减少芯片表面对细胞及蛋白质的吸附,从而降低驱动液滴所需的电压,以免对细胞造成伤害。Ada 等人<sup>[45]</sup>研发的 PDMS 微流控芯片利用特殊设计的微流通道生成含单细胞的液滴,可以在 2.4 cm×2.4 cm 大小的芯片上实现对肿瘤细胞系以及原生肿瘤组织细胞的药物筛查。

基于微流控芯片的 3D 细胞培养技术也是近年来微流控技术应用于生物医学领域的一类发展方向。与传统的 2D 细胞培养方法相比,3D 环境下进行细胞培养能更好地模拟体内真实的细胞生

长环境、反应细胞与胞外基质的相互作用。Yu 等人<sup>[46]</sup>设计的 PDMS 芯片中,多个平行的细胞培养腔与微小通道交联,模拟了体内组织与毛细血管网之间的相互作用。Raty 等人<sup>[47]</sup>的实验结果证明小鼠胚胎细胞在微流通道中的生长速度比传统平板培养更接近体内真实生长速率。而 Yeong 等人<sup>[48]</sup>将 PDMS 形成的特殊结构与多孔细胞培养板结合,灌注水凝胶形成多个平行的 3D 细胞培养腔体,构建了一个与传统细胞分析、药物筛选等实验方法完全兼容的、高通量的 3D 细胞培养微流控平台。

除了基于细胞培养的微流控芯片,能代替大型流式细胞设备的微型细胞分选芯片也是一个研究焦点。除了通过荧光标记、大小等因素进行分选,微流控芯片还可以通过介电泳效应对细胞进行分选。在非均匀电场中,不同极性的细胞会朝着不同电场强度的地方迁移,利用介电泳效应和经特殊设计的微流通道,Takahashi 等人<sup>[49]</sup>完成了高通量细胞分选。此外,惯性微流体技术也常被应用于细胞分选。Kwon 等人<sup>[50]</sup>利用螺旋形的微流通道,使得死细胞、细胞碎片等在通过微流控芯片后从细胞培养液中析出,可进一步应用于灌注式细胞培养。Abdulla 等人<sup>[51]</sup>设计的多个微流通道级联的微流控芯片无需对细胞进行任何标记就可以将循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)从稀释的全血样本中分离,且分离出的 CTC 保持高存活率,便于进行后续药物筛查等试验。

## 3 展望

近年来,微流控技术在临床诊断领域的应用研究极大促进了现场、即时检测和精准、个性化医疗的发展。尽管现时微流控技术的全面推广还受限于制备过程中的复杂操作、芯片对生化成分的吸附等一系列问题,但随着新材料、新技术、新发现的不断涌出,有着来自各个学科的研究人员对微流控技术持续的研究与改善,微流控技术在临床诊断领域乃至基础医学研究领域的巨大潜能毋庸置疑。微流控技术的产业化也将推动临床检测方法朝着小型化、快速化、高通量、便携性、自动化的方向发展,“芯片实验室”的广泛应用指日可待。

## 参考文献

- [1] Burns MA, Johnson BN, Brahmamandra SN, et al. An integrated nanoliter DNA analysis device [J]. *Science*, 1998, 282(5388):484-487.
- [2] Lin CH, Lee GB, Lin YH, et al. A fast prototyping process for fabrication of microfluidic systems on soda-lime glass [J]. *J Micromechanics Microengineering*, 2001, 11(6):726-732.
- [3] McDonald JC, Whitesides GM. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices [J]. *Acc Chem Res*, 2002, 35(7):491-499.
- [4] Sollier E, Murray C, Maoddi P, et al. Rapid prototyping polymers for microfluidic devices and high pressure injections [J]. *Lab Chip*, 2011, 11(22):3752-3765.
- [5] Ren K, Zhou J, Wu H. Materials for microfluidic chip fabrication [J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46(11):2396-2306.
- [6] Gabriel L. Relation entre les phénomènes électriques et capillaires[D]. Paris: Gauthier-Villars, 1875.
- [7] Choi K, Ng AHC, Fobel R, et al. Digital Microfluidics[J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2012, 5(1):413-440.
- [8] Abdelgawad M, Wheeler AR. The digital revolution: A new paradigm for microfluidics [J]. *Adv Mater*, 2009, 21(8):920-925.
- [9] Cho SK, Moon H. Electrowetting on dielectric (EWOD): new tool for bio/micro fluids handling [J]. *BioChip J*, 2008, 2(2):79-96.
- [10] Malic L, Brassard D, Veres T, et al. Integration and detection of biochemical assays in digital microfluidic LOC devices[J]. *Lab Chip*, 2010, 10(4):418-431.
- [11] Chiou PY, Moon H, Toshiyoshi H, et al. Light actuation of liquid by optoelectrowetting sensors actuators [J]. *A Phys*, 2003, 104(3):222-228.
- [12] Peng C, Zhang Z, Kim CJ, et al. EWOD (electrowetting on dielectric) digital microfluidics powered by finger actuation[J]. *Lab Chip*, 2014, 14(6):1117-1122.
- [13] Guttenberg Z, Müller H, Habermüller H, et al. Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump[J]. *Lab Chip*, 2005, 5(3):308-317.
- [14] Martinez AW, Phillips ST, Butte MJ, et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays[J]. *Angew Chemie Int Ed*, 2007, 46(8):1318-1320.
- [15] Magro L, Escadafal C, Garneret P, et al. Paper microfluidics for nucleic acid amplification testing (NAAT) of infectious diseases[J]. *Lab Chip*, 2017, 17(14):2347-2371.
- [16] Dincer C, Bruch R, Kling A, et al. Multiplexed point-of-care testing - xPOCT[J]. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(8):728-742.
- [17] Wu J, Kodzius R, Cao W, et al. Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays[J]. *Microchim Acta*, 2014, 181(13-14):1611-1631.
- [18] Sista R, Hua Z, Thwar P, et al. Development of a digital microfluidic platform for point of care testing [J]. *Lab Chip*, 2008, 8(12):2091-2104.
- [19] Zhu K, Jin H, Ma Y, et al. A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA[J]. *J Biotechnol*, 2005, 118(3):257-264.
- [20] Lee CY, Lee GB, Lin JL, et al. Integrated microfluidic systems for cell lysis, mixing/pumping and DNA amplification [J]. *J Micromech Microeng*, 2005, 15(6):1215-1223.
- [21] Prinz C, Tegenfeldt JO, Austin RH, et al. Bacterial chromosome extraction and isolation [J]. *Lab Chip*, 2002, 2(4):207-212.
- [22] Wainright A, Nguyen UT, Bjornson TL, et al. Pre-concentration and separation of double-stranded DNA fragments by electrophoresis in plastic microfluidic devices [J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(21):3784-3792.
- [23] Choi K, Ryu H, Siddle KJ, et al. Negative selection by spiral inertial microfluidics improves viral recovery and sequencing from blood[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(7):4657-4662.
- [24] Chang YH, Lee GB, Huang FC, et al. Integrated polymerase chain reaction chips utilizing digital microfluidics[J]. *Biomed Microdevices*, 2006, 8(3):215-225.
- [25] Wheeler EK, Hara CA, Frank J, et al. Under-three minute PCR: probing the limits of fast amplification [J]. *Analyst*, 2011, 136(18):3707-3712.
- [26] Chen T, Jia Y, Dong C, et al. Sub-7-second genotyping of single-nucleotide polymorphism by high-resolution melting curve analysis on a thermal digital microfluidic device [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(4):743-752.
- [27] Wan L, Chen T, Gao J, et al. A digital microfluidic system for loop-mediated isothermal amplification and sequence specific pathogen detection [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:14586.

- [28] Mahmoudian L, Kaji N, Tokeshi M, et al. Rolling circle amplification and circle-to-circle amplification of a specific gene integrated with electrophoretic analysis on a single chip[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(7):2483-2490.
- [29] Hua Z, Rouse JL, Eckhardt AE, et al. Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(6):2310-2316.
- [30] Easley CJ, Karlinsey JM, Landers JP. On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation[J]. *Lab Chip*, 2006, 6(5):601-610.
- [31] Boles DJ, Benton JL, Siew GJ, et al. Droplet-based pyrosequencing using digital microfluidics[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(22):8439-8447.
- [32] Müller V, Westerlund F. Optical DNA mapping in nanofluidic devices: principles and applications[J]. *Lab Chip*, 2017, 17(4):579-590.
- [33] Lin CC, Wang JH, Wu HW, et al. Microfluidic immunoassays[J]. *J Assoc Lab Autom*, 2010, 15(3):253-274.
- [34] Han KN, Li CA, Seong GH. Microfluidic chips for immunoassays[J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2013, 6(1):119-141.
- [35] Heyries KA, Mandon CA, Ceriotti L, et al. "Macromolecules to PDMS transfer" as a general route for PDMS biochips[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(5):1146-1152.
- [36] Wang CH, Lee GB. Automatic bio-sampling chips integrated with micro-pumps and micro-valves for disease detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, 21(3):419-425.
- [37] Lai S, Wang S, Luo J, et al. Design of a compact disk-like microfluidic platform for enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(7):1832-1837.
- [38] Ng AHC, Lee M, Choi K, et al. Digital microfluidic platform for the detection of rubella infection and immunity: A proof of concept[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(2):420-429.
- [39] Didar TF, Foudeh AM, Tabrizian M. Patterning multiplex protein microarrays in a single microfluidic channel[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(2):1012-1018.
- [40] Hervás M, López MA, Escarpa A. Electrochemical immunosensing on board microfluidic chip platforms[J]. *Trends Anal Chem*, 2012, 31:109-128.
- [41] Rossier JS, Girault HH. Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection[J]. *Lab Chip*, 2001, 1(2):153-157.
- [42] Ouyang W, Han J, Wang W. Enabling electrical biomolecular detection in high ionic concentrations and enhancement of the detection limit thereof by coupling a nanofluidic crystal with reconfigurable ion concentration polarization[J]. *Lab Chip*, 2017, 17(22):3772-3784.
- [43] Gary DJ, Paul R. *Emerging Tools for Single - Cell Analysis*[M]. Wiley-Liss, 2000, 95-113.
- [44] Barbulovic-Nad I, Yang H, Park PS, et al. Digital microfluidics for cell-based assays[J]. *Lab Chip*, 2008, 8(4):519-526.
- [45] Wong AHH, Li H, Jia Y, et al. Drug screening of cancer cell lines and human primary tumors using droplet microfluidics[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:9109.
- [46] Hsu YH, Moya ML, Abiri P, et al. Full range physiological mass transport control in 3D tissue cultures[J]. *Lab Chip*, 2013, 13(1):81-89.
- [47] Raty S, Walters EM, Davis J, et al. Embryonic development in the mouse is enhanced via microchannel culture[J]. *Lab Chip*, 2004, 4(3):186-190.
- [48] Yu YJ, Kim YH, Na K, et al. Hydrogel-incorporating unit in a well: 3D cell culture for high-throughput analysis[J]. *Lab Chip*, 2018, Epub ahead of print.
- [49] Takahashi Y, Takeuchi S, Miyata S. High throughput cell sorting device using dielectrophoresis and fluid-induced shear force[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2013:4466-4469.
- [50] Kwon T, Yao R, Hamel JFP, et al. Continuous removal of small nonviable suspended mammalian cells and debris from bioreactors using inertial microfluidics[J]. *Lab Chip*, 2018, Epub ahead of print.
- [51] Abdulla A, Liu W, Gholamipour-Shirazi A, et al. High-Throughput Isolation of Circulating Tumor Cells Using Cascaded Inertial Focusing Microfluidic Channel[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(7):4397-4405.