

# 纸芯片流速控制方法及在多步骤实验中的应用

李昕 夏舒 张海燕 陈钰 刘仲明 王捷

广州军区广州总医院医学实验科, 广州 510010

**[摘要]** 纸质微流控芯片是可用于复杂液体样品高效快速处理并进行检测分析的新型平台, 可以广泛应用于食品检验、环境监测等多个领域, 尤其在疾病诊断中具有良好的应用前景。纸质微流控芯片因其具有制造成本低廉、使用简单方便、无须外部驱动力、方便携带、适用于小量生物化学样品检测等众多优势而受到了广泛关注。纸质微流控芯片液体流速控制是完成复杂实验的基础, 通过设计阀门、3D 纸通道等技术可实现多步骤实验的自动有序完成。本文就纸质微流控芯片液体流速控制方法及其在连续多步骤检测中的应用及成果进展进行综述。

**[关键词]** 纸质微流控芯片; 液体流速控制; 多步骤实验

中图分类号: TN405 文献标识码: A 文章编号: 2095-5200(2018)03-014-04

DOI: 10.11876/mimt201803007

微流控系统可用于量小、复杂液体样品的高效、快速检测, 同时具有体积小质轻、操作简便、携带方便等优良特性。传统的以硅、玻璃、石英、高聚物等材料作为基底的微流控芯片耗时长, 并且对研制设备和研制环境的要求较为苛刻, 不利于微流控芯片技术的发展和广泛应用。纸张作为一种日常生活中常见的材料, 它的渗透性、疏水性和反应性均能够通过简单的化学修饰进行调节, 是一种极具潜力的微流控芯片基底材料。

纸质微流控芯片是一种新兴的微流控分析技术平台, 它以纸张作为基底材料, 通过各种加工修饰, 在纸上形成具有一定构造的亲/疏水微细通道网络, 并与相关的分析仪器共同组成“纸上微型实验室”<sup>[1-3]</sup>。

纸质微流控芯片制作技术多样, 包括: 1) 紫外光刻法<sup>[4]</sup>; 2) 折纸法<sup>[5]</sup>; 3) 蜡印法<sup>[6]</sup>; 4) 喷墨打印法; 5) 等离子体处理法; 6) 柔印法; 7) PDMS; 8) AKD 打印法; 9) 丝网印刷法; 10) 硅烷 UV/O<sub>3</sub> 成型法; 11) 电路印制技术等<sup>[7]</sup>。当前应用最广的是紫外光刻法、蜡印法和折纸法。近年来, 将纸质微流控芯片与各种分析检测技术相结合的检测平台层出不穷, 已经通过比色法/电化学法/化学发光法/荧光/电化学发光法实现了多种生物化学物质的快速检测<sup>[8-12]</sup>。Zhang 课题组<sup>[13]</sup>将 CCD 图像传感器应用于纸质微流控芯片化学发光/电化学发光检测平台, CCD 图像传感器具有廉价、可与智能手机报告系统相兼容的特点, 该检测平台具有便携、传播便利的优势。

纸质微流控芯片流体控制是其设计和应用的瓶颈之一。经过近十年探索, 逐步发展为流体渗流时间、方向可控, 可自动完成样品加工处理、样品孵育、实时试剂混合等多步骤实验的复合装置, 在复杂多步骤检测实验中具有良好的应用前景。本文对纸质微流控芯片液体流速控制方法及

其在连续多步骤检测中的应用及成果进展进行综述。

## 1 纸质微流控芯片液体流速控制方法

操纵液体在纸质微流控芯片上的流动是设计、制作纸质微流控芯片的中心环节。液体流动控制使在同一个纸质微流控装置中完成多步骤反应、多重时间分析检测成为可能。纸质微流控芯片液体流动是一个以毛细管渗透作用为基础的自发、被动的过程, 主要受到纸张的材质和均一性、纸通道空间维度、液体黏度和环境因素的影响<sup>[14]</sup>。液体在有孔介质中的毛细流动过程可用 Lucas-Washburn's 方程描述:

$$l(t) = \sqrt{\gamma r \cos\theta t / 2\mu} \quad (1)$$

式中,  $l(t)$ : 渗透距离,  $t$ : 时间,  $r$ : 孔隙半径,  $\mu$ : 液体黏度,  $\gamma$ : 表面张力,  $\theta$ : 接触角。

液体流动速度控制分为加快液体在纸质微流控芯片的流动速度和减缓流动速度两个方面。

### 1.1 减缓液体流动速度

减缓液体流动速度, 有利于反应充分完成, 同时可以通过控制各反应试剂的流动速度实现多步骤实验的自动完成。减缓液体在纸质微流控芯片流动速度的方法主要可以分为两类: 1) 通过改变纸通道的几何结构以减缓流速; 2) 通过化学物质在纸通道沉积改变亲水通道中多孔介质空隙半径而减缓流速。

#### 1.1.1 通过改变纸通道的几何结构减缓流速 Apilux 等<sup>[15]</sup>

通过在亲水通道中设计纵向挡板间接增加了纸通道的长度, 从而改变各种试剂流动到反应区和检测区的时间。他们使用硝酸纤维素膜制作已设计好通道结构的纸质微流控

基金项目: 国家自然科学基金项目, 编号: 81401752; 军队后勤科研计划项目, 编号: CGZ16J002; 广州市科学(技术)研究专项, 编号: 201607010121。

第一作者: 李昕, 硕士, 研究方向: 纸质微流控芯片, Email: baibai66xin@163.com。

通讯作者: 王捷, 博士, 主任医师, 研究方向: 纸质微流控芯片, Email: jiy@tom.com。

芯片,并将各种试剂储存于通道的特定位置以控制其到达检测区的时间,通过简单的样品滴加步骤启动芯片上的多步骤反应,自动完成了用于人体绒毛膜促性腺激素水平检测的酶联免疫吸附试验(ELISA)。Bhushan等<sup>[16]</sup>报道了一种通过在纸通道的特定位置安装吸收垫以减缓流速的方法。在到达吸收垫前及通过吸收垫后,液体的流动遵循Lucas-Washburn's方程。吸收垫的设计可以有效减缓液体的流动速度,改变各种试剂到达检测区的时间。受吸收垫厚度的影响,延迟时间可达3~20min。他们利用该方法制作POCT装置,实现了疟疾蛋白Pf HRP2的放大检测。Shin等<sup>[17]</sup>报道了一种通过增加纸通道特定区域表面压力从而控制液体在多孔通道中流速的方法。当向纸通道特定区域表面施加压力时,通道的空隙变小、渗透性变小、液体阻力变大,从而在该区域实现液体流动延时。液体流动速度随着施加压力的增大而减小,流速最大可减小740%。他们通过该方法在聚丙烯纸上制作了一种可用于多种液体连续递送的装置,并完成了通过比色法进行结果判读的免疫检测。

**1.1.2 通过化学物质在纸通道沉积减缓流速** 糖类、蜡等化学物质在纸通道的沉积可以延迟液体流动,液体流动速率可由化学物质的量、浓度控制。Lutz等<sup>[18]</sup>通过将可溶解的糖类沉积于纸通道的方法,在纸质微流控芯片上建立了可控的液体流动延迟系统。他们将不同浓度的糖类(10-70%)滴加到纸通道中并晾干,延迟时间随糖类浓度增高而增长,可达数分钟到一小时。利用此技术制作的纸质微流控系统只需要简单的一步人工操作激活便可以自动完成四步液体流动反应,已用于疟疾检测的信号放大“三明治”免疫分析。具有操作简便、反应快速、成本低廉等特点。Jang等<sup>[19]</sup>报道通过调整亲水通道中蜡点的疏密程度控制流速。通过调整亲水通道的亮度来控制蜡点的疏密,亮度越低,蜡点越密集,通道的渗透性越低。此方法可以在蜡打印疏水隔离带时同时完成亲水通道中蜡点的打印,实现液体流动的精确控制。

## 1.2 加快液体流动速度

加快液体流动速度有利于节省实验时间,提高非特异结合物的洗涤效率,可以应用于快速、即时检测POCT系统构建。

Giokas等<sup>[20]</sup>报道的方法既可实现液体的加速流动,也可减缓液体流速,而无须提供外在的驱动力。使用Xerox Phaser 8560N蜡打印机制备纸质微流控芯片,然后将其放置在加热器上 $138 \pm 3^\circ\text{C}$ 加热2min,使蜡融化并渗透入Whatman 1号层析纸形成疏水隔离带。使用线性1200单通道记录仪在纸质微流控芯片亲水通道表面雕刻与液体流动方向平行或垂直的开放通道,与液体流动方向平行的开放通道可加快液体流动速度,与液体流动方向垂直的开放通道可减缓液体流动速度。实验结果表明当水平方向开放通道的长度达10mm时,液体在亲水通道中的流动速度显著增快;当开放通道的长度进一步增长时,液体流速趋于稳定,流动速度与未经处理的亲水通道相比提高60%。与液体流动方向垂直的开放通道可以减缓液体流动速度,主要与垂直通道数目相关,随着垂直通道数目的增加,液体流速逐渐减慢。

Conor K等<sup>[21]</sup>报道了双层纸通道堆叠的芯片,根据Lucas-Washburn方程,多孔介质半径的增大可以加快液体渗流。纸张的空隙半径是恒定的,两层纸通道堆叠在一起时,两层纸张之间形成一个空隙,可以间接增大多孔介质半径,从而加快流速。实现该思路方法为:1)使用Xerox Phaser 8560蜡打印机在两张Whatman 1号层析纸上打印出疏水隔离带,在对流恒温烤箱中 $195^\circ\text{C}$ 加热5min,使表面的蜡融化渗透入层析纸。2)冷却5min后,使用CLP-680ND打印机在层析纸表面打印四层调色剂。3)使用Purple Cows 3015c层压机将两张层析纸覆盖有调色剂的表面层压结合(调色剂作为粘合剂)。实验结果表明液体在双层纸质微流控芯片中的渗流速度与传统的单层纸质微流控芯片相比显著加快。流经长度为4.5cm的纸通道,在双层纸质微流控芯片中只需3.1min即可完成,而在单层纸质微流控芯片中需要20min。该制作方法比单层复杂,制作时间较长,适用于长距离液体流动控制及具有复杂通道网络的纸质微流控芯片设计。

## 2 纸质微流控芯片在多步骤实验中的应用

生物分子检测,尤其是基于免疫反应和核酸分子杂交的检测通常包含有序的多重步骤。与传统的基于侧向层析原理的检测方法相比,纸质微流控芯片在有序多步骤检测中具有较好的应用前景,而且无须增加手工操作步骤。可以通过阀门控制技术、容积限制控制技术及3D纸质微流控芯片制作技术,实现液体渗流方向和时间的控制,完成复杂多步骤实验。

### 2.1 阀门控制技术

当液体流动到自动阀门处时,阀门垫吸收液体膨胀,实现阀门的开启、关闭或方向改变,阀门触发时间可以通过调整阀门垫的厚度控制,最终实现液体渗流时间、方向和体积的控制。Bhushana等<sup>[22]</sup>报道的微流控装置有一个检测通道、三个试剂通道、一个液体供给通道和一个时间控制通道组成。在各个通道的连接处设计了四个阀门装置,包括三个可开启阀门和一个可关闭阀门。关闭阀门被触发后可以阻断液体供给通道对三个试剂通道的液体供给,三个开启阀门分别控制三种试剂有序向检测区流动,该装置实现了疟疾病原体多步骤检测实验。

### 2.2 容积限制控制技术

容积限制控制技术通过对各种试剂容积及试剂入口与反应、检测区的距离进行控制实现。不同尺寸的试剂垫会释放出不同体积的液体,以此改变各种试剂到达反应区和检测区的时间,实现各试剂有序地流经反应区和检测区,完成有序多步骤实验。基于这一思路,Fu等<sup>[23]</sup>设计了一种集信号放大过程于一体的自动免疫检测微流控芯片,实现了疟疾蛋白Pf HRP2的快速、自动检测。该纸质微流控芯片有一个检测区,三个试剂区,不同试剂区试剂垫的尺寸及试剂入口到检测区的距离不同,从而控制三种试剂有序流经检测区,完成复杂多步骤实验。设计者将三种试剂以冻干粉的形式贮存于试剂垫中,使用时只需加入水和样品即可,操作简单,易于贮存。

### 2.3 3D 纸质微流控芯片

3D 纸质微流控芯片可以控制复杂液体在水平和垂直方向的流动 ( $x$ - $y$ - $z$  方向)<sup>[24-26]</sup>。Jeong 等<sup>[27]</sup>报道了一种通过双面打印和层压技术制作 3D 纸质微流控芯片的简单方法, 并使用该方法实现了样品中白蛋白和葡萄糖的同时检测。先以蜡打印机在纸的两面打印蜡图案, 再使用层压机使蜡融化并渗透入纸张, 形成 3D 纸质微流控通道。当纸双面打印的垂直对称蜡图案融化渗透并在纸中相遇时, 形成 3D 垂直通道。当纸双面打印的垂直非对称蜡图案融化渗透入纸张时, 形成通道高度比纸张厚度薄的侧向或垂直通道。这两种类型的 3D 通道可以同时控制液体在水平和垂直方向的流动。

### 3 结论与展望

纸质微流控芯片在有序多步骤检测实验中具有良好的应用前景。流体控制和在有序多步骤实验中的应用一直是纸质微流控芯片设计和应用的瓶颈。本文综述了近年来报道的纸质微流控芯片液体渗流控制策略及其在多步骤实验中的应用技术, 同时介绍了三种纸质微流控芯片在有序多步骤实验中的应用技术。

液体渗流控制方法 (几何结构控制法 / 化学物质沉积法) 及纸质微流控芯片在多步骤实验中的应用技术 (阀门控制技术 / 容积限制控制技术 / 3D 纸质微流控技术) 虽然可以有效控制液体在纸质微流控芯片表面的渗流时间和方向, 有利于有序多步骤实验的自动完成, 但是制作方法复杂、制作时间较长, 不利于大规模生产。为满足商业生产需要, 应综合分析整合各种制作方法的优点, 探索更加简单快捷的方法。

目前纸质微流控芯片的应用还面临很多挑战, 其机械韧性较差, 需与其他材料相结合提高机械强度。为避免外界环境对反应的干扰, 需要保证一个相对封闭的空间, 避免试剂、样品的渗漏、蒸发。样品的残留问题及如何将纸质微流控芯片与检测仪器集成、整合, 进一步拓展其功能, 提高检测的准确性和检测限, 这些问题都值得研究者进行更深入的探索。

#### 参 考 文 献

- [1] CATE D M, ADKINS J A, METTAKOONPITAK J, et al. Recent developments in paper-based microfluidic devices[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(1): 19-41.
- [2] 齐云龙, 丁永胜. 图解纸芯片制作及应用进展 [J]. *现代仪器与医疗*, 2013, 19(3):7-14.
- [3] ZHANG Y, ZUO P, YE B C. A low-cost and simple paper-based microfluidic device for simultaneous multiplex determination of different types of chemical contaminants in food[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68:14-19.
- [4] CAO L, FANG C, ZENG R, et al. Paper-based microfluidic devices for electrochemical immunofiltration analysis of human chorionic gonadotropin[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 92: 87-94.
- [5] MAHMUD M A, BLONDEEL E J, KADDOURA M, et al. Creating compact and microscale features in paper-based devices by laser cutting[J]. *Analyst*, 2016, 141(23): 6449-6454.
- [6] HONG S, KIM W. Dynamics of water imbibition through paper channels with wax boundaries[J]. *Microfluid Nanofluid*, 2015, 19(4): 845-853.
- [7] XIA Y, SI J, LI Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 774-789.
- [8] SRIRAM G, BHAT M P, PATIL P, et al. Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: a review[J]. *Trac-trend Anal Chem*, 2017, 93: 212-227.
- [9] LIU F, ZHANG C. A novel paper-based microfluidic enhanced chemiluminescence biosensor for facile, reliable and highly-sensitive gene detection of *Listeria monocytogenes*[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2015, 209: 399-406.
- [10] LIU R, ZHANG C, LIU M. Open bipolar electrode-electrochemiluminescence imaging sensing using paper-based microfluidics[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2015, 216: 255-262.
- [11] YAMADA K, TAKAKI S, KOMURO N, et al. An antibody-free microfluidic paper-based analytical device for the determination of tear fluid lactoferrin by fluorescence sensitization of  $Tb^{3+}$ [J]. *Analyst*, 2014, 139(7): 1637-1643.
- [12] HE M, LIU Z. Paper-based microfluidic device with upconversion fluorescence assay[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(24):11691-11694.
- [13] LIU R, ZHANG C, LIU M. Open bipolar electrode-electrochemiluminescence imaging sensing using paper-based microfluidics[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2015, 216: 255-262.
- [14] SONGOK J, TOIVAKKA M. Controlling capillary-driven surface flow on a paper-based microfluidic channel[J]. *Microfluid Nanofluid*, 2016, 20(4): 1-9.
- [15] WHITESIDES G M. Cool, or simple and cheap? Why not both? [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(1): 11-13.
- [16] TOLEY B J, MCKENZIE B, LIANG T, et al. Tunable-Delay Shunts for Paper Microfluidic Devices[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(23): 11545-11552.
- [17] SHIN J H, PARK J, KIM S H, et al. Programmed sample delivery on a pressurized paper[J]. *Biomicrofluidics*, 2014, 8(5): 0541211-8.
- [18] LUTZ B, LIANG T, FU E, et al. Dissolvable fluidic time delays for programming multi-step assays in instrument-free paper diagnostics[J]. *Lab Chip*, 2013, 13(14): 2840-2847.
- [19] JANG I, SONG S. Facile and precise flow control for a paper-based microfluidic device through varying paper permeability[J]. *Lab Chip*, 2015, 15(16): 3405-3412.
- [20] GIOKAS D L, TSOGAS G Z, VLESSIDIS A G. Programming fluid transport in paper-based microfluidic devices using razor-crafted open channels[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(13): 6202-6207.
- [21] CAMPLISSON C K, SCHILLING K M, PEDROTTI W L, et al. Two-ply channels for faster wicking in paper-based microfluidic devices[J]. *Lab Chip*, 2015, 15(23): 4461-4466.
- [22] TOLEY B J, WANG J A, GUPTA M, et al. A versatile valving toolkit for automating fluidic operations in paper microfluidic devices[J]. *Lab Chip*, 2015, 15(6): 1432-1444.



组术后1个月黏膜恢复情况评分高于射频组。同时,激光组术后1个月更高的基频微扰、振幅微扰与更低的谐噪比,也说明CO<sub>2</sub>激光对喉腔黏膜的损伤更为明显<sup>[16]</sup>,是影响患者恢复速度的主要原因。

低温等离子射频消融术主要利用双极射频产生的能量解离靶组织中构成细胞成分的分子键,从而促使靶组织中细胞分解为碳水化合物、氧化物,实现组织凝固性坏死、脱落及瘢痕收缩,达到组织体积减容或切除的目的<sup>[17]</sup>。在早期喉癌及癌前病变的治疗中,低温等离子射频消融术具有如下优势:1)治疗温度低、消融深度浅,对周围正常组织损伤小;2)借助鼻窦内窥镜的手术视野放大作用,变性组织可以得到精准切割,亦能够完全避免碳化效应<sup>[18]</sup>;3)术中无需行气管切开,术区黏膜水肿较轻,有利于术后早期恢复。得益于上述优势,本研究射频组不仅手术时间更短,其恢复情况较激光组也更为理想。需要注意的是,由于等离子刀头较大,可能在一定程度上影响术野,且对声韧带、甲状软骨内层等含水量较少组织的消融作用有限,因此,需根据患者实际情况选择合理的微创治疗术式。

#### 参 考 文 献

- [1] HOFFMANN C, CORNU N, HANS S, et al. Early glottic cancer involving the anterior commissure treated by transoral laser cordectomy[J]. *Laryngoscope*, 2016, 126(8): 1817-1822.
- [2] WANG H B, GUO Q, LI Y H, et al. Effects of minimally invasive esophagectomy and open esophagectomy on circulating tumor cell level in elderly patients with esophageal cancer[J]. *World J Surg*, 2016, 40(7): 1655-1662.
- [3] MORIMOTO H, YANO T, YODA Y, et al. Clinical impact of surveillance for head and neck cancer in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(6): 1051.
- [4] 双羽, 李超, 黄永望, 等. 低温等离子射频消融术与CO<sub>2</sub>激光治疗早期声门型喉癌疗效比较[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2015, 23(4): 372-376.
- [5] NOORDMAN B J, WIJNHOFEN B P L, VAN LANSCHOT J J B. Optimal surgical approach for esophageal cancer in the era of minimally invasive esophagectomy and neoadjuvant therapy[J]. *Dis Esophagus*, 2016, 29(7): 773-779.
- [6] ZHOU C, MA G, LI X, et al. Is minimally invasive esophagectomy effective for preventing anastomotic leakages after esophagectomy for cancer? A systematic review and meta-analysis[J]. *World J Surg Oncol*, 2015, 13(1): 269.
- [7] SUDA K, NAKAUCHI M, INABA K, et al. Minimally invasive surgery for upper gastrointestinal cancer: Our experience and review of the literature[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(19): 4626.
- [8] VALLS - MATEUS M, ORTEGA A, BLANCH J L, et al. Long - term quality of life after transoral laser microsurgery for laryngeal carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2016, 114(7): 789-795.
- [9] 刘敏, 牛广宪. 低温等离子射频消融术治疗早期声门型喉癌疗效分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2015, 23(4): 422-423.
- [10] VARGHESE L, MATHEW J, JOHN S, et al. Treatment of Advanced Carcinoma of the Larynx and Hypopharynx with Laser Followed by External Radiotherapy[J]. *Iran J Otorhinolaryngol*, 2017, 29(94): 247.
- [11] 汪晓锋, 高兴强. 低温等离子射频消融术治疗早期声门型喉癌的疗效观察[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2016, 23(9): 495-497.
- [12] TAPIAS L F, MATHISEN D J, WRIGHT C D, et al. Outcomes with open and minimally invasive Ivor Lewis esophagectomy after neoadjuvant therapy[J]. *Ann Thorac Surg*, 2016, 101(3): 1097-1103.
- [13] VARGHESE L, MATHEW J, JOHN S, et al. Treatment of Advanced Carcinoma of the Larynx and Hypopharynx with Laser Followed by External Radiotherapy[J]. *Iran J Otorhinolaryngol*, 2017, 29(94): 247.
- [14] HELMINEN O, MRENA J, SIHVO E. Near-infrared image-guided lymphatic mapping in minimally invasive oesophagectomy of distal oesophageal cancer[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2017, 52(5): 952-957.
- [15] 折素珍, 王斌全. CO<sub>2</sub>激光在喉癌治疗中的应用[J]. *国际耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 40(1):44-47.
- [16] GUO W, MA X, YANG S, et al. Combined thoracoscopic-laparoscopic esophagectomy versus open esophagectomy: a meta-analysis of outcomes[J]. *Surg Endosc*, 2016, 30(9): 3873-3881.
- [17] CANIS M, IHLER F, MARTIN A, et al. Transoral laser microsurgery for T1a glottic cancer: review of 404 cases[J]. *Head Neck*, 2015, 37(6): 889-895.
- [18] RAYMOND D P, SEDER C W, WRIGHT C D, et al. Predictors of major morbidity or mortality after resection for esophageal cancer: a Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery Database risk adjustment model[J]. *Ann Thorac Surg*, 2016, 102(1): 207-214.
- [23] FU E, LIANG T, SPICARMIHALIC P, et al. Two-Dimensional Paper Network Format That Enables Simple Multistep Assays for Use in Low-Resource Settings in the Context of Malaria Antigen Detection[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(10): 4574-4579.
- [24] CHOI S, KIM S K, LEE G J, et al. Paper-based 3D microfluidic device for multiple bioassays[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2015, 219:245-250.
- [25] SECHI D, GREER B, JOHNSON J, et al. Three-dimensional paper-based microfluidic device for assays of protein and glucose in urine[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(22):10733-10737.
- [26] PARK J, PARK J K. Pressed region integrated 3D paper-based microfluidic device that enables vertical flow multistep assays for the detection of C-reactive protein based on programmed reagent loading[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2017, 1049-1055.
- [27] JEONG S G, LEE S H, CHOI C H, et al. Toward instrument-free digital measurements: a three-dimensional microfluidic device fabricated in a single sheet of paper by double-sided printing and lamination[J]. *Lab Chip*, 2015, 15(4): 1188-1194.

(上接第16页)