

面向核酸检测的连续流PCR微流控技术研究进展

彻乐木贡¹, 李振庆^{2*}

¹上海理工大学机械工程学院, 上海

²上海理工大学光电信息与计算机工程学院, 上海

收稿日期: 2026年7月24日; 录用日期: 2026年8月15日; 发布日期: 2026年8月25日

摘 要

聚合酶链反应作为核酸检测的核心技术, 在生命科学研究与临床诊断中发挥着不可替代的作用。传统热循环仪存在检测周期长、设备体积庞大、试剂消耗量大等局限, 难以满足现场快速检测的多元需求。连续流PCR通过固定温区、流体跨区流动的模式实现热循环, 规避了温控系统热惯性的影响, 兼具扩增速度快、试剂消耗量低、易集成小型化等优势, 是微流控核酸检测领域核心研究方向。迄今, 已发展透迤形、三维螺旋、振荡流、闭环循环流、液滴连续流等多类构型。在结构设计、性能优化与场景应用层面均取得了长足进展。本文系统梳理了连续流PCR的技术原理与结构演化脉络, 阐述了该技术在临床即时检测、食品安全检测、环境监测等领域的应用现状。

关键词

连续流PCR, 热循环, 核酸扩增, 即时检测, 液滴微流控

Advances in Continuous-Flow PCR Microfluidics for Nucleic Acid Detection

Chele Mugong¹, Zhenqing Li^{2*}

¹School of Mechanical Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai

²School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai

Received: July 24, 2026; accepted: August 15, 2026; published: August 25, 2026

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR), as a core technology for nucleic acid detection, plays an

*通讯作者。

文章引用: 彻乐木贡, 李振庆. 面向核酸检测的连续流 PCR 微流控技术研究进展[J]. 分析化学进展, 2026, 16(3): 217-227. DOI: 10.12677/aac.2026.163024

indispensable role in life science research and clinical diagnosis. However, conventional thermal cyclers suffer from limitations such as long detection cycles, bulky instrumentation, and high reagent consumption, which hinder their ability to meet the diverse demands of on-site rapid testing. Continuous-flow PCR (CF-PCR) achieves thermal cycling by employing spatially fixed temperature zones with the fluid flowing across them, thereby circumventing the thermal inertia inherent in temperature control systems. This approach offers advantages including fast amplification, low reagent consumption, and ease of integration and miniaturization, establishing it as a key research direction in the field of microfluidic nucleic acid detection. To date, various configurations have been developed, including serpentine channels, three-dimensional helical structures, oscillating-flow systems, closed-loop circulatory designs, and droplet-based continuous-flow formats. Significant progress has been made in structural design, performance optimization, and application scenarios. This review systematically summarizes the working principles and structural evolution of continuous-flow PCR, and presents the current status of its applications in clinical point-of-care testing, food safety detection, and environmental monitoring.

Keywords

Continuous-Flow PCR, Thermal Cycling, Nucleic Acid Amplification, Point-of-Care Testing, Droplet Microfluidics

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

PCR 是分子生物学、临床诊断、食品安全与法医鉴定等领域的基石技术。传统 PCR 依赖热循环仪整体升降温, 单轮检测耗时 1~2 小时, 设备庞大、操作复杂, 限于实验室应用, 难以满足即时检测需求。随着微流控技术发展, PCR 微型化与芯片化成为重要方向, 出现腔室式、振荡流、液滴式等多种形态。其中, 连续流 PCR (CF-PCR) 采用温区空间固定、反应液跨区流动的模式, 突破热惯性限制, 可在数分钟内完成扩增, 兼具速度快、样品消耗低、易集成小型化等优势, 是研究最深入、产业化潜力突出的分支。其核心是在芯片上构建分别对应变性、退火和延伸的固定温区, 流体依次穿越完成循环扩增, 通过通道设计可精准控制循环数和各阶段停留时间。迄今, 连续流 PCR 已衍生出丰富构型: 按空间布局分为透迤形与三维螺旋结构; 按流体运动模式分为单向连续流、往复振荡流和闭环循环流; 按反应单元形态分为连续相体系与液滴分散相体系, 不同路径适配差异化通量与应用场景。

现有微流控 PCR 综述多侧重技术大类划分, 而针对连续流 PCR, 仍缺乏对其构型演化脉络、核心性能优化路径及场景化应用进展的系统梳理。本文从原理出发, 沿“结构演化-性能优化-集成应用”脉络, 系统总结了其研究进展。

2. 连续流 PCR 的技术原理与结构演化

连续流 PCR 以流体跨温区流动替代模块升降温, 在芯片上形成变性、退火、延伸恒温区, 两温区合并退火与延伸更适用于快速检测。扩增效率取决于温区稳定性、停留时间及切换速率, 微通道尺寸与排布决定流动路径和停留时间分布, 是设计核心。通道结构已从平面弯折发展为多层堆叠、螺旋、阵列、液滴等形式, 适配不同通量与场景。

2.1. 透迤形通道连续流 PCR

透迤形通道是连续流 PCR 最早、应用最广的结构,通过往复弯折使流体多次穿越温区实现多轮扩增,设计与加工简单,可灵活调节弯折次数与单段长度控制循环数,适配不同靶标序列,是早期主流构型(见图 1(A))。为验证该类结构的性能潜力, Papadopoulos 等通过计算模拟对比了连续流与静态腔室微 PCR 器件的性能,分析了柔性聚合物基底的应用可行性,为透迤形通道的结构设计提供了系统的理论依据[1]。在器件功能化方面, Shu 等开发了手持式流动基因分析系统,将核酸扩增与荧光检测功能集成于一体,实现了快速、灵敏、多重分子诊断,推动了连续流 PCR 从实验室原理验证向 POCT 场景的落地应用[2]。Nagai 等研发的便携式微流控遗传检测系统,进一步压缩了设备体积,优化了操作流程,能够在现场场景下完成快速遗传检测[3]。

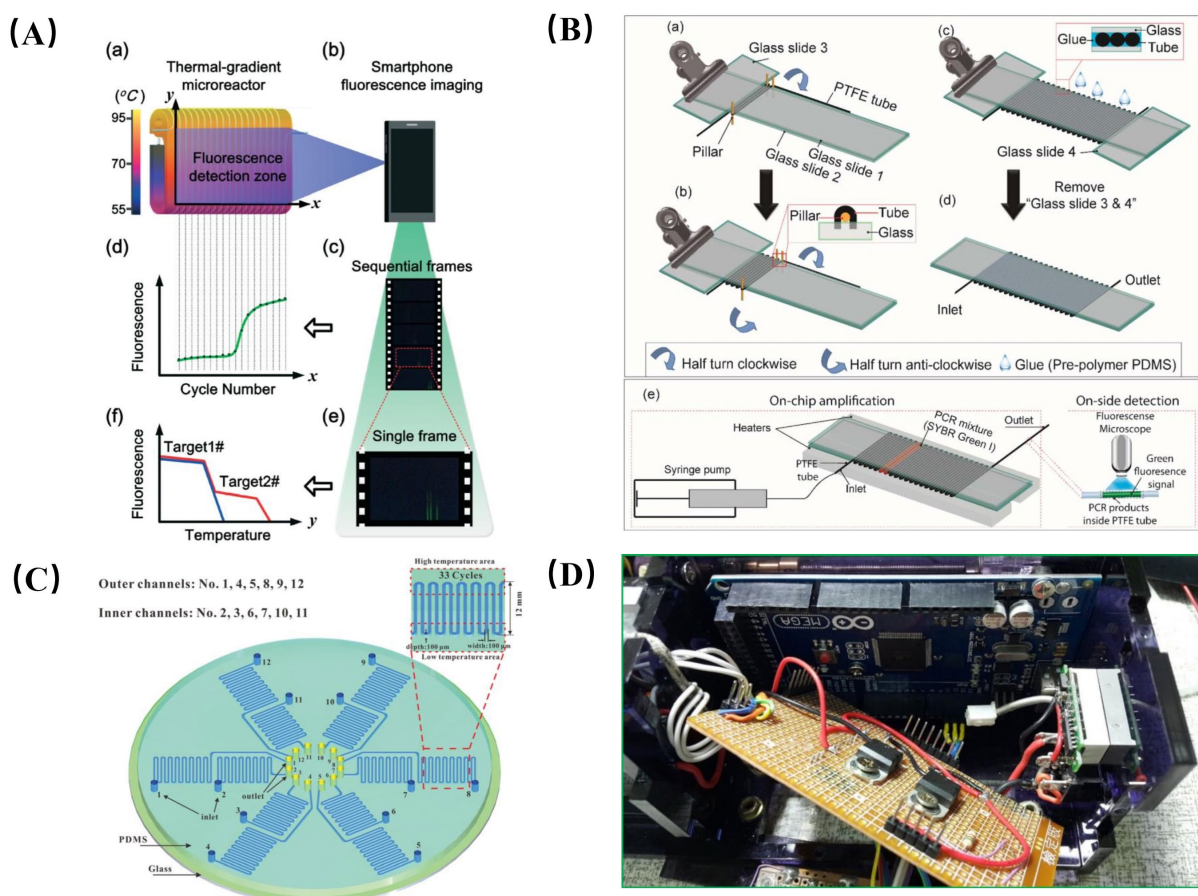


Figure 1. (A) Schematic diagram of the serpentine continuous-flow PCR [2]. (B) Top view of a disposable polycarbonate continuous-flow PCR device, with the fluid inlet/outlet and heater contact areas indicated [4]. (C) Schematic illustration of the structure of a disk-shaped array-based high-throughput continuous-flow PCR chip [5]. (D) Photograph of a portable continuous-flow PCR device with integrated Arduino control [6]

图 1. (A) 透迤形连续流 PCR 的原理图[2]。 (B) 一次性聚碳酸酯连续流 PCR 器件俯视图, 标注流体进出口及加热器接触区域[4]。 (C) 圆盘形阵列式高通量连续流 PCR 芯片结构示意图[5]。 (D) 集成 Arduino 控制的便携式连续流 PCR 器件实物图[6]

流体驱动方式的简化是透迤形通道便携化发展的重要方向。Tachibana 等提出了毛细管驱动的自推进连续流 PCR, 利用微流控器件的毛细作用实现流体自发流动, 无需外接泵体与动力设备, 大幅简化了系统结构, 该研究还系统分析了微流控行为与 DNA 扩增性能的关联, 为自驱动系统的优化提供了实验支撑

[7]。Ragsdale 等设计了一次性连续流 PCR 器件, 采用低成本材料与简易加工工艺制备, 有效降低了芯片的单次使用成本, 更适合大规模人群筛查等应用场景[8]。Ragsdale 等人设计的聚碳酸酯 CF-PCR 芯片采用对称式透迤形通道布局, 通过两侧加热块分别提供变性和退火温度, 中间梯度区自然形成延伸温度带。针对温控模块的低成本化, Fan 等评估了印刷加热元件在连续流 PCR 中的应用效果, 为温控模块的一体化、低成本制备提供了可行方案[9]; BinPerwez 等提出了基于单加热器的混合微器件热模型与设计方案, 通过结构优化利用单一热源构建多温区, 进一步简化了温控系统的结构与成本[10]。Fernández-Carballo 等开发了低成本实时连续流 PCR 系统, 集成了荧光检测功能, 实现了病原体的快速定量检测, 验证了低成本方案在实际应用中的可靠性[11]。Ajit 等开发了快速原型制备的对流微流控 DNA 扩增平台, 简化了芯片的制备流程, 缩短了研发周期, 为连续流 PCR 芯片的快速迭代开发提供了新的工艺路径[12]。

随着研究的深入, 透迤形通道的材料体系与封装工艺不断优化, 器件的稳定性与耐高温性能逐步提升。Trinh 等开发了玻璃-聚四氟乙烯-玻璃三明治结构的微器件(见图 1(B)), 利用聚四氟乙烯的低水汽渗透率与耐高温特性, 有效抑制了高温下的试剂蒸发, 该器件成功应用于食源性致病菌的快速鉴定, 检测结果准确可靠[4]。在材料体系方面, 玻璃-PTFE-玻璃(GPG)三明治结构是一种颇具特色的封装方案。PTFE 管作为流体通道被夹合于两层玻璃基板之间, 利用 PTFE 优异的化学惰性和低吸附特性, 有效减少反应试剂在管壁的非特异性吸附。Sivakumar 等提出了通过碳氮共价键实现 PDMS 与热塑性微流控器件的室温不可逆密封方法, 显著提升了芯片的耐热耐压性能, 解决了传统 PDMS 键合高温下易失效的问题, 并成功应用于连续流 PCR 体系[13]。Ghalekohneh 等提出了一种新型微流控连续流 PCR 芯片的制备方法, 进一步丰富了平面芯片的加工工艺选择[14]。Li 等设计并制备了便携式连续流 PCR 微流控芯片, 优化了通道结构与芯片封装工艺, 有效提升了便携设备的检测稳定性与性能[15]。

为提升检测通量, 透迤形通道逐步向阵列化、多重化方向发展。我们实验在连续流微流控芯片上实现了牙周致病菌多种靶基因的同时扩增, 验证了单芯片多重检测的可行性[16]。开发了连续流 PCR 阵列微流控芯片与环形阵列式芯片(见图 1(C)), 后者集成了 12 条独立的透迤形通道, 每条通道配备独立的进样口与检测窗口, 可在短时间内完成多个靶标基因的同时扩增, 大幅提升了单轮检测的通量, 适用于现场多病原菌并行筛查[5] [17]。针对芯片结构与温区分布的优化, 数值仿真成为重要的辅助设计手段, Zaglavara 等开展了微流控 PCR 器件的数值模拟与多目标优化研究, 通过仿真手段优化通道结构参数与温区布局, 有效提升了扩增效率与温度均匀性[18]-[20]。Zhou 等研究了高流速条件下 PCR 器件的结构优化策略, 为高速扩增场景的芯片设计提供了理论支撑[21]。Chen 等系统探究了表面钝化处理对连续流微流控芯片内 PCR 反应的影响, 明确了表面改性对扩增效率的作用规律, 为芯片的表面优化提供了实验依据[22]。Kulkarni 等开发了基于软刻蚀工艺的小型化 DNA 扩增平台, 搭配便携式温控器, 实现了现场核酸扩增, 推动了连续流 PCR 设备的小型化与实用化[23]。

在应用拓展方面, Sheu 等开发了集成 Arduino 控制板的便携式连续流 PCR 芯片器件(见图 1(D)), 成功应用于阿胶的真伪鉴别, 拓展了连续流 PCR 在中药鉴定领域的应用场景[6]。Arduino 控制 CFPCR 器件见图 1(D)所示, 采用五温区对称设计, 将温控模块、自制注射泵、电源模块全部集成于便携箱体内, 仅需一块 ArduinoMega 板即可完成全部温控与流体驱动控制。Kim 等开发了基于 PID 温度控制系统的微流控 PCR 芯片, 提升了温度控制的精度与稳定性, 为高精度遗传分析提供了可靠的技术支撑[24]。Yang 等将连续流 PCR 与毛细管电泳集成于同一块微流控芯片上, 实现了扩增产物的在线分离检测, 进一步完善了芯片的分析功能[25]。Kulkarni 等开发了集成小型热平台的微流控器件, 实现了实时 DNA 扩增的现场检测, 验证了小型化温控系统在实际应用中的可靠性[26]。Mortensen 等则从设计与制造工艺角度, 对连续流 PCR 芯片的制备技术进行了梳理, 为芯片的标准化制备提供了参考[27]。Zhou 等提出了单温度驱动器控制的空连续流 PCR 结构, 进一步简化了温控系统, 为低成本便携器件的开发提供了新的思路[28]。

2.2. 三维螺旋通道连续流 PCR

通过毛细管缠绕或三维加工形成的螺旋流道, 可在更小空间内实现更长流路, 且流体流动产生的离心效应能增强混合, 提升扩增均一性。三维螺旋通道是单热源连续流 PCR 最具代表性的立体构型, 依托螺杆模具缠绕柔性毛细管即可实现多层螺旋微通道一体化成型, 整套装置由微反应器、被动进样单元与风冷温控模块组成, 完整系统架构见图 2(A)所示。Kim 等早期开发了连续流微流控实时 PCR 器件, 验证了三维螺旋结构在实时荧光检测中的应用潜力, 随后又推出了并行处理的连续流器件, 实现了多份样品的同时扩增, 提升了检测通量[29] [30]。Trinh 等制备了三维特氟龙微器件, 实现了长微通道内的无能量均匀液体流动, 降低了流体驱动的能耗, 更适配便携化检测的需求, 该团队还开发了配套的便携微反应器, 成功应用于食源性致病菌的快速鉴定[31][32]。Thomas 等系统总结了微尺度热梯度连续流 PCR 的操作方法与注意事项, 为该类技术的标准化应用提供了详实的指南[33]。

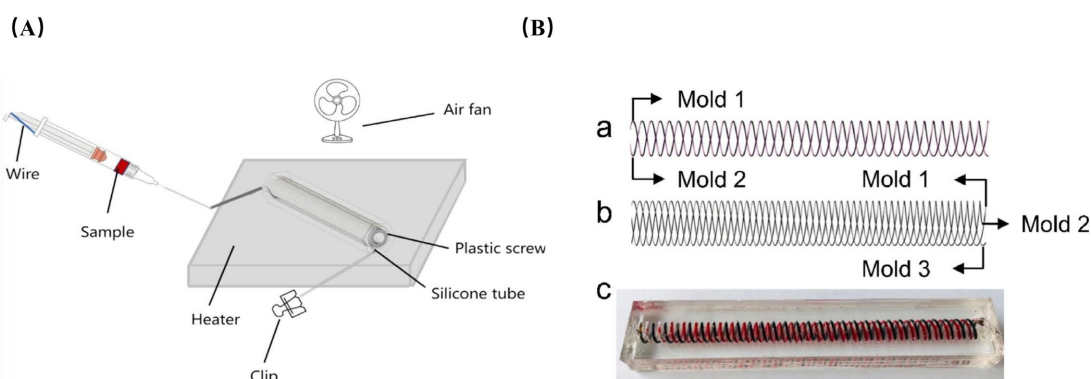


Figure 2. (A) Overall architecture of the three-dimensional helical continuous-flow PCR system fabricated using a single-screw mold [34]; (B) double-helical and triple-helical metal molds, and photograph of the resulting DNA-like three-dimensional helical microreactor [35]

图 2. (A) 单螺杆模具制备的三维螺旋连续流 PCR 系统整体架构[34]; (B) 双链、三螺旋金属模具及成型后 DNA 样三维螺旋微反应器实物[35]

便携化与无源驱动是三维螺旋通道的重要发展方向。Shi 等开发了带有被动微泵与电池供电加热器的 PCR 微反应器, 无需外接动力设备与市电电源, 即可实现临床级多重 DNA 靶标的热循环扩增, 极大提升了检测设备的场景适配性[36]。Pham 等制备了集成片上荧光检测的三维连续流反转录 PCR 微器件, 实现了基因表达水平的半定量评估, 拓展了三维连续流 PCR 在 RNA 检测领域的应用[37]。Wang 等提出了新型自激活微泵机制, 在三维螺旋微反应器内实现了稳定的连续流实时 PCR 扩增, 该机制无需外接动力, 依靠流体自身的物理特性实现自发流动, 进一步简化了系统结构[38]。Wu 等开发了电池供电的便携式热循环仪, 通过单个恒温热电制冷器与开环控制器实现连续流 PCR 检测, 设备体积小巧, 适合现场检测场景[39]。

在制备工艺方面, 研究者不断探索简化三维螺旋通道的加工方法, 降低制备门槛。Jiang 等开发了可定义管径的管式微芯片, 能够灵活调整通道尺寸, 同时适配连续流与温控调制的片上 qPCR 两种模式, 并对比了不同特氟龙聚合物材料的反应性能差异[40]。该团队还提出了基于螺杆加工的三维微反应器制备方法, 通过简单的机械加工即可构建螺旋微通道, 大幅降低了三维器件的制备难度与成本[34]。Chang 等实现了 PDMS 与印刷电路板的高效键合, 为温控模块与微流控芯片的一体化集成提供了可行的工艺方案[41]。Yang 等开发了可便捷按需制备的连续流 PCR 三维螺旋微反应器, 采用数控加工金属模具结合聚合物封装的工艺, 制备流程简单、重复性好, 微通道尺寸精度高, 为三维螺旋结构的批量化制备提供了成熟的技术路径[35]。基于单螺杆成型思路, 研究者开发双螺旋、三螺旋并行模具, 实现双通道同步核酸扩增(见图 2(B))。Song 等进一步提出了由单热源驱动的新型连续流 PCR 微器件, 通过结构优化实现了单

一热源下的多温区分布, 简化了温控系统, 更适合便携化检测场景[42]。

2.3. 振荡流与闭环循环流 PCR

往复振荡与闭环循环流动模式通过流体的往复或闭环运动实现热循环, 可在有限芯片面积内增加循环数, 提升空间利用率。振荡流 PCR 使反应液在包含不同温区的通道内往复流动, 每完成一次往复即完成一轮扩增, 循环数可通过往复次数灵活调节。Kopparthy 等开发了利用热梯度的多功能振荡流微流控 PCR 系统, 该系统无需复杂的多模块温控, 仅通过单一热梯度即可实现扩增所需的温区间, 能够同时获取扩增曲线与熔解曲线, 无需后续处理, 检测结果与商用实时仪器具有高度一致性[43]。Zhou 等设计了高通量振荡流 PCR 结构, 通过有限元分析优化温区间距、通道宽高比、通道长度、壁厚与流速等参数, 获得了温度均匀性良好的高温区与低温区, 实现了多通道的并行扩增, 有效提升了振荡流体系的检测通量[44]。

闭环循环流 PCR 则通过构建环形封闭通道, 驱动流体在环道内持续循环流动, 依次经过不同温区完成扩增。Haber 等开发了基于局域表面等离子体共振与压电泵的快速实时循环 PCR 系统, 通过压电泵精准驱动流体在闭环通道内循环流动, 同时利用局域表面等离子体共振的光热效应实现快速加热, 大幅提升了热循环速度, 实现了快速实时核酸检测, 该系统将光热技术与微流控循环流结合, 为超快 PCR 的发展提供了新的思路[45]。

2.4. 液滴连续流 PCR 技术

为进一步提升检测灵敏度与定量能力, 研究人员将液滴微流控技术与连续流 PCR 结合, 形成了液滴连续流 PCR 体系。该技术将反应体系分割为纳升级的独立液滴, 每个液滴作为一个微型反应单元, 油相作为连续相包裹液滴, 不仅可以实现数字 PCR 级别的绝对定量, 还能够有效避免管壁吸附与样品间交叉污染。Liu 等早期开发了基于液滴的多重连续流 PCR 基因分型平台, 成功应用于高通量农业标记辅助选择, 验证了液滴连续流在高通量检测中的应用潜力[46]。Liu 等进一步提出了表面辅助多因子流体分割方法, 实现了基于液滴的多体积数字 PCR, 通过不同体积的液滴拓宽了定量的动态范围, 提升了定量精度[47]。基于微柱阵列的表面辅助多流体分割(SAMFS)是静态二维液滴阵列的典型制备方法, 依托机械扫描毛细管在疏水芯片亲水微柱上自动生成不同体积油包水液滴, 整套芯片结构与光刻制备流程见图 3(A)所示。

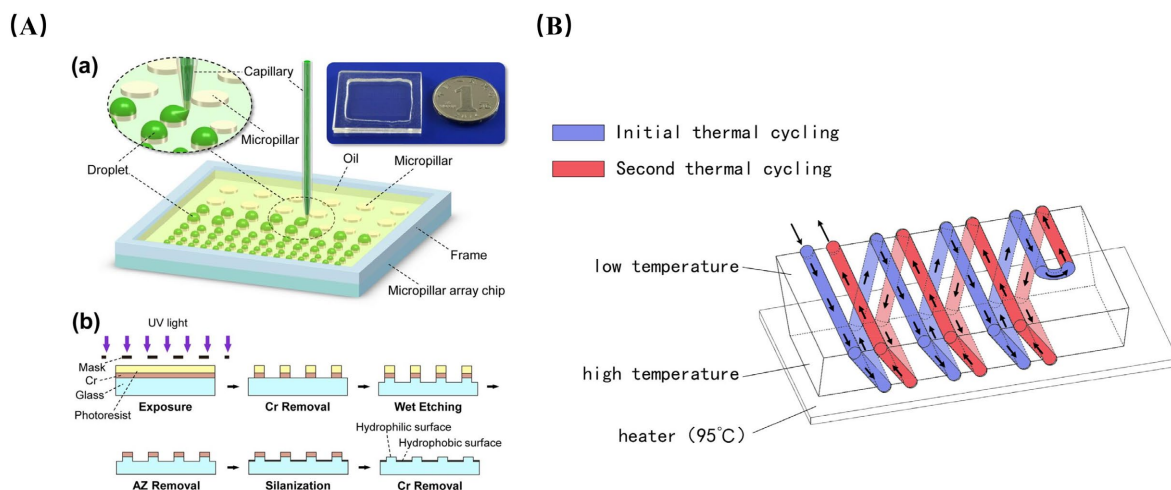


Figure 3. (A) Surface-assisted multifluid segmentation (SAMFS) multi-volume droplet array chip: (a) 3D schematic diagram of the droplet generation system; (b) fabrication process of the glass micropillar chip by photolithography and wet etching [47]; (B) three-dimensional structure of the double-helical three-dimensional capillary continuous-flow droplet PCR chip [48]

图 3. (A) 表面辅助多流体分割(SAMFS)多体积液滴阵列芯片: (a) 液滴生成系统三维示意图; (b) 玻璃微柱芯片光刻湿法蚀刻制备流程[47]; (B) 双螺旋三维毛细管连续流液滴 PCR 芯片三维结构[48]

随着数字 PCR 需求的增长, 液滴连续流与数字 PCR 的结合愈发紧密。Li 等开发了基于多螺旋缠绕毛细管热循环芯片的数字 PCR 系统, 将三维螺旋通道与液滴数字 PCR 技术结合, 实现了高精度的核酸绝对定量[48]。区别于透迤形通道, 多螺旋三维毛细管依靠单一加热基板形成纵向自然温度梯度, 油包水液滴在管路内连续完成变性、退火循环, 双螺旋经典构型见图 3(B)所示。Wang 等开发了压缩空气驱动连续流热循环数字 PCR 系统, 基于单加热板构建温区, 成功实现了临床血清样本中的乙肝病毒诊断, 验证了该技术在临床检测中的实用性[49]。该体系摒弃精密注射泵, 依靠注射器内压缩空气提供稳定推力, 双针头 T 型管路生成均匀 8.83nL 微液滴。Hajji 等开发了用于癌症诊断的液滴微流控快速连续流 RT-qPCR 分析平台, 能够快速检测肿瘤相关的核酸标志物, 为癌症的快速诊断提供了新的技术手段[50]。

在系统集成化方面, Jiang 等开发了全自动集成式连续流数字 PCR 设备, 实现了从样品处理到结果输出的全流程自动化, 能够完成 DNA 的绝对定量, 大幅降低了操作门槛[51]。Li 等开发了基于三维微流控与 CMOS 成像器件的小型化连续流数字 PCR, 适配临床血清样本检测, 推动了数字 PCR 设备的便携化发展[52]。Li 等还开发了低流阻的双层液滴连续流 PCR 微流控芯片, 通过双层结构优化流路设计, 有效降低了流体阻力, 实现了细菌的快速检测, 同时降低了对流体驱动压力的要求[53]。

Table 1. Comparative of key performance metrics for continuous-flow PCR
表 1. 不同构型连续流 PCR 的关键性能指标横向对比

对比维度	透迤形通道	三维螺旋通道	振荡流	闭环循	液滴连续流
典型扩增时间	5~30 min	15~30 min	12~20 min	<15 min (光热效应辅助下极快)	15~20 min (34 cycles)
温区数量	2~3 个独立温区	单热源(空间温度梯度)	2~3 个独立温区	2~3 个独立温区(或结合 LSPR 光热效应)	2~3 个独立温区
样品通道	单通道/阵列式(可达 12 通道)	单/双通道并行	多通道并行(可达 8 通道)	通常为单通道循环	高通量(数万液滴并行)
芯片/器件尺寸	平面芯片, 数十 mm 量级	三维立体, 结构紧凑	平面芯片, 结构简洁	芯片级, 结构紧凑	芯片 + 管路, 中等尺寸
制造成本	较低(成熟光刻/注塑工艺)	低(毛细管缠绕, 无需光刻)	低(快速原型法, 成本低)	中等偏高(需集成压电泵或 LSPR 模块)	中等(需液滴生成模块)
流体驱动方式	外接泵/毛细力/压缩空气	外接泵/被动微泵	往复振荡泵	压电泵/闭环循环泵	外接泵/压缩空气
定量能力	半定量(终点检测为主)	半定量(实时荧光可选)	半定量(可同时获取扩增曲线与熔解曲线)	半定量(实时 LSPR 检测)	绝对定量(数字 PCR)
防交叉污染能力	一般	一般	一般	较好(封闭环道, 无进出料干扰)	优异(油相隔离)
系统集成能力	高(已有手持式集成案例)	高(便携式、电池供电)	较高(温控简单, 易微型化)	较高(检测模块与循环一体)	较高(全自动集成设备已报道)
代表性技术特点	结构简单, 循环数灵活可调	立体堆叠, 空间利用率高	往复次数决定循环数, 温区精简	闭环单向循环, 可结合 LSPR 实现超快光热加热[47]	绝对定量, 避免管壁吸附与交叉污染
典型应用场景	现场快速筛查、多重病原检测	资源有限场景、野外现场检测	病原体快速检测、熔解曲线分析	超快实时核酸检测、POCT 快速诊断	低丰度核酸绝对定量、肿瘤标志物检测、数字 PCR

为进一步优化液滴连续流的性能, 研究者从液滴生成、传热特性等方面开展了深入研究。Meng 等系统研究了连续流 PCR 的液滴传热特性, 揭示了液滴在不同温区流动过程中的温度变化规律, 为液滴连续流体系的温控优化与结构设计提供了坚实的理论依据[54]。Lu 等提出了基于水相自推进的新型液滴生成方法, 无需外接动力即可实现稳定的液滴生成, 在多重连续流 PCR 中展现出良好的应用潜力, 为无源液滴连续流系统的开发提供了新的思路[55]。

综上所述, 连续流 PCR 经过近二十年的发展, 已形成透迤形通道、三维螺旋通道、振荡流、闭环循环流及液滴连续流等多元技术路线。不同构型在扩增速度、检测通量、芯片尺寸、制造成本、定量能力与系统集成潜力等方面各具优劣, 适配差异化的应用场景。为超越单一构型的个案描述, 建立跨构型的比较基准, 本文从上述关键性能指标出发, 对五类构型进行了平行比较与综合评估(见表 1), 以期为研究者在构型选择与性能优化方面提供参考依据。

3. 结论

连续流 PCR 作为微流控核酸扩增的重要技术路线, 通过温区固定、流体跨区循环的创新模式, 从原理上突破了传统 PCR 技术的速度瓶颈, 在快速检测与即时检测领域展现出巨大的发展潜力。近年来, 研究人员围绕通道结构设计、温控系统优化、流体驱动方式革新、系统功能集成等方向持续突破, 形成了透迤形、三维螺旋、振荡流、闭环循环、液滴连续流等多元技术体系, 发展出一系列性能优化技术, 推动连续流 PCR 从实验室的原理验证逐步走向多场景的实际应用。尽管进展显著, 连续流 PCR 的规模化推广仍受制于若干核心瓶颈: 高性能器件多依赖精密加工或手工组装, 成本居高不下; 实际样品中的杂质易引发通道堵塞或扩增抑制, 前端处理与芯片的深度集成尚不成熟; 便携化要求下热均匀性、气密性与长期稳定性难以同步保障, 距“样本进-结果出”的全集成目标仍有差距。展望未来, 跨学科技术融合将提供突破契机。人工智能可辅助流道拓扑优化与温区布局设计, 加速芯片研发; 纳米材料可实现高效光热转换与低功耗瞬时升温; 声流控技术可简化液滴生成与操控流程。同时, 柔性电子与纸基器件正推动一次性低成本芯片走向实用。可以预见, 连续流 PCR 将沿着微型化、智能化和全集成的路径加速演进, 在精准医疗、食品安全、公共卫生、环境监测等场景中, 从实验室补充工具成长为现场检测方案。

参考文献

- [1] Papadopoulos, V.E., Kokkoris, G., Kefala, I.N. and Tserepi, A. (2015) Comparison of Continuous-Flow and Static-Chamber μ PCR Devices through a Computational Study: The Potential of Flexible Polymeric Substrates. *Microfluidics and Nanofluidics*, **19**, 867-882. <https://doi.org/10.1007/s10404-015-1613-1>
- [2] Shu, B., Zhang, C. and Xing, D. (2015) A Handheld Flow Genetic Analysis System (FGAS): Towards Rapid, Sensitive, Quantitative and Multiplex Molecular Diagnosis at the Point-of-Care Level. *Lab on a Chip*, **15**, 2597-2605. <https://doi.org/10.1039/c5lc00139k>
- [3] Nagai, H. and Fuchiwaki, Y. (2015) Portable Microfluidic System for Rapid Genetic Testing. *Electronics and Communications in Japan*, **98**, 1-6. <https://doi.org/10.1002/ecj.11753>
- [4] Trinh, K.T.L. and Lee, N.Y. (2018) Glass-Polytetrafluoroethylene-Glass Based Sandwich Microdevice for Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction and Its Application for Fast Identification of Foodborne Pathogens. *Talanta*, **176**, 544-550. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.085>
- [5] Yang, B., Wang, P., Li, Z., You, Q., Sekine, S., Ma, J., et al. (2023) Simultaneous Amplification of DNA in a Multiplex Circular Array Shaped Continuous Flow PCR Microfluidic Chip for On-Site Detection of Bacterial. *Lab on a Chip*, **23**, 2633-2639. <https://doi.org/10.1039/d3lc00274h>
- [6] Sheu, S., Song, Y. and Chen, J. (2022) A Portable Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction Chip Device Integrated with Arduino Boards for Detecting Colla Corii Asini. *Micromachines*, **13**, Article 1289. <https://doi.org/10.3390/mi13081289>
- [7] Tachibana, H., Saito, M., Tsuji, K., Yamanaka, K., Hoa, L.Q. and Tamiya, E. (2015) Self-Propelled Continuous-Flow PCR in Capillary-Driven Microfluidic Device: Microfluidic Behavior and DNA Amplification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **206**, 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.004>

- [8] Ragsdale, V., Li, H., Sant, H., Ameel, T. and Gale, B.K. (2016) A Disposable, Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction Device: Design, Fabrication and Evaluation. *Biomedical Microdevices*, **18**, Article No. 62. <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0091-x>
- [9] Fan, W., Lok, B.K. and Lai, F.K. (2016) Evaluation of Printed Heating Elements for Continuous Flow PCR Application. 2016 *IEEE 18th Electronics Packaging Technology Conference (EPTC)*, Singapore, 30 November 2016-3 December 2016, 360-364. <https://doi.org/10.1109/eptc.2016.7861505>
- [10] Bin Perwez, U., Aziz, I., Akhtar, I. and Zaidi, T. (2016) Thermal Modeling and Design Analysis of a Hybrid Microdevice for Continuous-Flow PCR Using One Heater. *ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition*, Phoenix, 11-17 November 2016, V010T13A038.
- [11] Fernández-Carballo, B.L., McGuinness, I., McBeth, C., Kalashnikov, M., Borrós, S., Sharon, A., *et al.* (2016) Low-Cost, Real-Time, Continuous Flow PCR System for Pathogen Detection. *Biomedical Microdevices*, **18**, Article No. 34. <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0060-4>
- [12] Ajit, S., Praveen, H.M., Puneeth, S.B., Dave, A., Sesham, B., Mohan, K.N., *et al.* (2017) Towards Rapid Prototyped Convective Microfluidic DNA Amplification Platform. *SPIE Proceedings*, **10061**, 100610H. <https://doi.org/10.1117/12.2257843>
- [13] Sivakumar, R., Trinh, K.T.L. and Lee, N.Y. (2020) Heat and Pressure-Resistant Room Temperature Irreversible Sealing of Hybrid PDMS-Thermoplastic Microfluidic Devices via Carbon-Nitrogen Covalent Bonding and Its Application in a Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction. *RSC Advances*, **10**, 16502-16509. <https://doi.org/10.1039/d0ra02332a>
- [14] Ghalekohneh, S.J., Zand, M.M., Banadaki, M.D., *et al.* (2020) Novel Fabrication Method of a Microfluidic Continuous Flow PCR. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-28384/v1>
- [15] Li, Z., Li, Y., Sekine, S., Xi, H., Amano, A., Zhang, D., *et al.* (2020) Design and Fabrication of Portable Continuous Flow PCR Microfluidic Chip for DNA Replication. *Biomedical Microdevices*, **22**, Article No. 5. <https://doi.org/10.1007/s10544-019-0457-y>
- [16] Li, Z., Liu, J., Wang, P., Tao, C., Zheng, L., Sekine, S., *et al.* (2021) Multiplex Amplification of Target Genes of Periodontal Pathogens in Continuous Flow PCR Microfluidic Chip. *Lab on a Chip*, **21**, 3159-3164. <https://doi.org/10.1039/d1lc00457c>
- [17] Yang, B., Wang, P., Li, Z., Tao, C., You, Q., Sekine, S., *et al.* (2022) A Continuous Flow PCR Array Microfluidic Chip Applied for Simultaneous Amplification of Target Genes of Periodontal Pathogens. *Lab on a Chip*, **22**, 733-737. <https://doi.org/10.1039/d1lc00814e>
- [18] Zagklavara, F., Jimack, P.K., Kapur, N., Querin, O.M. and Thompson, H.M. (2021) Numerical Modelling and Analysis of a Microfluidic PCR Device. *World Congress on Momentum, Heat and Mass Transfer*, Lisbon, 17-19 June 2021, 1-6. <https://doi.org/10.11159/enfht21.ix.201>
- [19] Zagklavara, F., Jimack, P.K., Kapur, N., Querin, O.M. and Thompson, H.M. (2021) Optimisation of Microfluidic Polymerase Chain Reaction Devices. *E3S Web of Conferences*, **321**, Article 01007. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202132101007>
- [20] Zagklavara, F., Jimack, P.K., Kapur, N., Querin, O.M. and Thompson, H.M. (2022) Multi-Objective Optimisation of Polymerase Chain Reaction Continuous Flow Systems. *Biomedical Microdevices*, **24**, Article No. 16. <https://doi.org/10.1007/s10544-022-00610-6>
- [21] Zhou, N., Han, H., Fang, L., Li, S. and Lei, L. (2025) Structure Optimization of Polymerase Chain Reaction Devices under High Flow Rate: A Numerical Study. *Micromachines*, **17**, Article 21. <https://doi.org/10.3390/mi17010021>
- [22] Chen, J.J. and Qiu, X.C. (2024) The Effect of the Surface Passivation on Polymerase Chain Reaction inside a Continuous Flow Microfluidic Chip. *Microsystem Technologies*, **31**, 25-43. <https://doi.org/10.1007/s00542-024-05675-2>
- [23] Kulkarni, M.B. and Goel, S. (2021) Miniaturized DNA Amplification Platform with Soft-Lithographically Fabricated Continuous-Flow PCR Microfluidic Device on a Portable Temperature Controller. *Microfluidics and Nanofluidics*, **25**, Article No. 69. <https://doi.org/10.1007/s10404-021-02473-4>
- [24] Kim, H.E., Schuck, A., Kim, W., Jung, E.K., Hong, Y. and Kim, Y. (2022) PID Temperature Control System-Based Microfluidic PCR Chip for Genetic Analysis. *Journal of Electrical Engineering & Technology*, **17**, 495-501. <https://doi.org/10.1007/s42835-021-00969-1>
- [25] Yang, B., Huang, J., Tao, C., Li, Z., Zhang, D. and Yamaguchi, Y. (2023) Detection of Periodontal Pathogens Based on an Integrated Continuous Flow PCR and Capillary Electrophoresis Microfluidic Chip. *Separations*, **10**, Article 271. <https://doi.org/10.3390/separations10040271>
- [26] Kulkarni, M.B. and Goel, S. (2023) Mini-Thermal Platform Integrated with Microfluidic Device with On-Site Detection for Real-Time DNA Amplification. *BioTechniques*, **74**, 158-171. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0091>
- [27] Mortensen, J.S. and Pedersen, L.S. (2025) Design and Fabrication of a Continuous-Flow PCR Chip. Master's Thesis, Aalborg University, Aalborg.

- <https://projekter.aau.dk/design-and-fabrication-of-a-continuous-flow-pcr-chip-83c470c7.html>
- [28] Zhou, R., Ding, Y., Sun, Y., Yang, J., Yu, Y., Pang, J., *et al.* (2023) Spatial Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction Structure Controlled by Single-Temperature Driver. *AIP Advances*, **13**, Article 075117.
 - [29] Fernández-Carballo, B.L., McBeth, C., McGuinness, I., Kalashnikov, M., Baum, C., Borrós, S., *et al.* (2018) Continuous-Flow, Microfluidic, QRT-PCR System for RNA Virus Detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **410**, 33-43. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0689-8>
 - [30] Kim, H., Park, N. and Hahn, J.H. (2016) Parallel-Processing Continuous-Flow Device for Optimization-Free Polymerase Chain Reaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **408**, 6751-6758. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9798-z>
 - [31] Trinh, K.T.L., Wu, W. and Lee, N.Y. (2017) Fabrication of a 3D Teflon Microdevice for Energy Free Homogeneous Liquid Flow inside a Long Microchannel and Its Application to Continuous-Flow PCR. *RSC Advances*, **7**, 10624-10630. <https://doi.org/10.1039/c6ra28765d>
 - [32] Trinh, K.T.L. and Lee, N.Y. (2017) A Portable Microreactor with Minimal Accessories for Polymerase Chain Reaction: Application to the Determination of Foodborne Pathogens. *Microchimica Acta*, **184**, 4225-4233. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2451-5>
 - [33] Thomas, S., Orozco, R.L. and Ameel, T. (2017) Microscale Thermal Gradient Continuous-Flow PCR: A Guide to Operation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **247**, 889-895. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.03.005>
 - [34] Jiang, Y., Wu, G. and Wu, W. (2019) Fabrication of a 3D Microreactor Utilizing a Screw and Its Application in a Continuous Polymerase Chain Reaction. *ACS Omega*, **4**, 1534-1540. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02873>
 - [35] Yang, Q., Zhou, W., Li, H., Huang, J., Song, Z., Cheng, L., *et al.* (2024) A Continuous Polymerase Chain Reaction 3D Spiral Microreactor Capable of Facile and On-Demand Fabrication. *Analytica Chimica Acta*, **1310**, Article 342692. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342692>
 - [36] Shi, B., He, G. and Wu, W. (2018) A PCR Microreactor Machinery with Passive Micropump and Battery-Powered Heater for Thermo-Cycled Amplifications of Clinical-Level and Multiplexed DNA Targets. *Microchimica Acta*, **185**, Article No. 467. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3007-z>
 - [37] Pham, Q.N., Trinh, K.T.L., Tran, N.K.S., Park, T. and Lee, N.Y. (2018) Fabrication of 3D Continuous-Flow Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Microdevice Integrated with On-Chip Fluorescence Detection for Semi-Quantitative Assessment of Gene Expression. *The Analyst*, **143**, 5692-5701. <https://doi.org/10.1039/c8an01739e>
 - [38] Wang, K., Wu, D. and Wu, W. (2019) A New Self-Activated Micropumping Mechanism Capable of Continuous-Flow and Real-Time PCR Amplification inside 3D Spiral Microreactor. *Micromachines*, **10**, Article 685. <https://doi.org/10.3390/mi10100685>
 - [39] Wu, D. and Wu, W. (2019) Battery Powered Portable Thermal Cycler for Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction Diagnosis by Single Thermostatic Thermoelectric Cooler and Open-Loop Controller. *Sensors*, **19**, Article 1609. <https://doi.org/10.3390/s19071609>
 - [40] Jiang, Y., Wu, G., Li, Y. and Wu, W. (2019) Diameter-Definable Tubing-Microchips for Applications in Both Continuous-Flow and Tec-Modulated On-Chip qPCRS with Reaction Signal Analyzed between Different Types of Teflon-Polymers: PTFE and FEP. *RSC Advances*, **9**, 2650-2656. <https://doi.org/10.1039/c8ra09773a>
 - [41] Chang, Y. and You, H. (2020) Efficient Bond of PDMS and Printed Circuit Board with an Application on Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction. *BioChip Journal*, **14**, 349-357. <https://doi.org/10.1007/s13206-020-4403-0>
 - [42] Song, W., Wu, D., Xing, Y. and Wu, W. (2026) A Novel Continuous-Flow PCR Microdevice Operated by a Single Heat Source. *Micromachines*, **17**, Article 805. <https://doi.org/10.3390/mi17070805>
 - [43] Koppaarthi, V.L. and Crews, N.D. (2020) A Versatile Oscillating-Flow Microfluidic PCR System Utilizing a Thermal Gradient for Nucleic Acid Analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **117**, 1525-1532. <https://doi.org/10.1002/bit.27278>
 - [44] Zhou, R., Sun, Y., Luan, Y., Jia, W., Yu, Y., Yang, J., *et al.* (2024) High Throughput Oscillating-Flow Structure for Polymerase Chain Reaction. *AIP Advances*, **14**, Article 065211. <https://doi.org/10.1063/5.0209492>
 - [45] Haber, J.M., Gascoyne, P.R.C. and Sokolov, K. (2017) Rapid Real-Time Recirculating PCR Using Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) and Piezo-Electric Pumping. *Lab on a Chip*, **17**, 2821-2830. <https://doi.org/10.1039/c7lc00211d>
 - [46] Liu, L., *et al.* (2015) Multiplexed, Continuous-Flow, Droplet-Based PCR Genotyping Platform for High-Throughput Agricultural Marker Assisted Selection. *19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2015*, Gyeongju, 25-29 October 2015, 1368-1370. <https://pure.johnshopkins.edu/en/publications/multiplexed-continuous-flow-droplet-based-pcr-genotyping-platform/>
 - [47] Liu, W., Zhu, Y., Feng, Y., Fang, J. and Fang, Q. (2017) Droplet-Based Multivolume Digital Polymerase Chain Reaction by a Surface-Assisted Multifactor Fluid Segmentation Approach. *Analytical Chemistry*, **89**, 822-829.

- <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03687>
- [48] Li, B., Li, Y., Jiang, Y., Manz, A. and Wu, W. (2020) A Digital PCR System Based on the Thermal Cycled Chip with Multi Helix Winding Capillary. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 17824. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74711-8>
 - [49] Wang, K., Li, B. and Wu, W. (2020) Compressed Air-Driven Continuous-Flow Thermocycled Digital PCR for HBV Diagnosis in Clinical-Level Serum Sample Based on Single Hot Plate. *Molecules*, **25**, Article 5646. <https://doi.org/10.3390/molecules25235646>
 - [50] Hajji, I., Serra, M., Geremie, L., Ferrante, I., Renault, R., Viovy, J., *et al.* (2020) Droplet Microfluidic Platform for Fast and Continuous-Flow RT-qPCR Analysis Devoted to Cancer Diagnosis Application. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **303**, Article 127171. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127171>
 - [51] Jiang, Y., Manz, A. and Wu, W. (2020) Fully Automatic Integrated Continuous-Flow Digital PCR Device for Absolute DNA Quantification. *Analytica Chimica Acta*, **1125**, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.044>
 - [52] Li, B., Li, Y., Manz, A. and Wu, W. (2020) Miniaturized Continuous-Flow Digital PCR for Clinical-Level Serum Sample Based on the 3D Microfluidics and CMOS Imaging Device. *Sensors*, **20**, Article 2492. <https://doi.org/10.3390/s20092492>
 - [53] Li, Z., Wang, Y., Gao, Z., Sekine, S., You, Q., Zhuang, S., *et al.* (2023) Lower Fluidic Resistance of Double-Layer Droplet Continuous Flow PCR Microfluidic Chip for Rapid Detection of Bacteria. *Analytica Chimica Acta*, **1251**, Article 340995. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340995>
 - [54] Meng, J., Zhang, H., Sun, X., Yu, C., Feng, X., Wei, C., *et al.* (2025) Investigation on Droplet Heat Transfer Characteristics of Continuous-Flow PCR. *Analytical Chemistry*, **97**, 24486-24494. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c04157>
 - [55] Lu, X., Jia, Q., Zheng, Y., Qin, Z., Li, Y., Shi, C., *et al.* (2025) A Novel Method of Droplet Generation Based on the Self-Propelling of Water Phase and Its Potential Application in Multiplexing Continuous Flow PCR. *Biosensors and Bioelectronics*, **279**, Article 117400. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2025.117400>