



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104807987 B

(45)授权公告日 2017. 04. 19

(21)申请号 201410040579.4

(22)申请日 2014.01.27

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104807987 A

(43)申请公布日 2015.07.29

(73)专利权人 广州阳普医疗科技股份有限公司

地址 510000 广东省广州市经济技术开发区科学城开源大道102号

(72)发明人 刘志洪 何梦媛 吴正俊 杨利

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件

CN 103487418 A, 2014.01.01, 说明书[0009]–[0018]段.

US 2013/0078711 A1, 2013.03.28, 权利要求1–2、12–29, 说明书[0042]段.

Qingsong Mei 等. Photoluminescent Graphene Oxide Ink to Print Sensors onto Microporous Membranes for Versatile Visualization Bioassays.《Angew. Chem. Int. Ed.》.2012, 第51卷

审查员 苗君叶

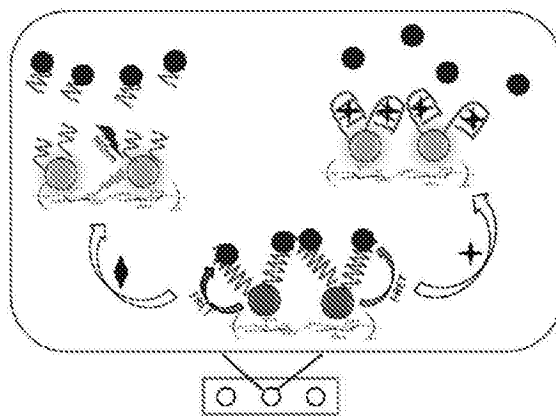
权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

纸芯片、其制备方法及生物分子的检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种纸芯片,包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体。本发明还提供了纸芯片的制备方法、生物分子的检测方法以及用于生物分子检测的检测装置。本发明将上转换荧光分析与纸芯片技术相结合,减少了反应物的用量,降低了检测成本,加快了反应物的反应速度,将传统的2h~3h的反应时间缩短到1h以内,增加了纸芯片应用于临床检测的可能。



1. 一种纸芯片,包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;

所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体;

所述纸基材料为办公室用打印纸;

所述检测区通过直接在办公室用打印纸上打印图案形成。

2. 根据权利要求1所述的纸芯片,其特征在于,所述有机染料标记在所述表面标记物上。

3. 根据权利要求1~2任意一项所述的纸芯片,其特征在于,所述荧光供体材料中,所述上转换荧光纳米材料具有式(I)所示的原子比:

$\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Ln}$ (I);

其中,Ln为Er、Tm或Ho。

4. 根据权利要求3所述的纸芯片,其特征在于,所述荧光供体材料中,所述上转换荧光纳米材料的粒径为30nm~100nm。

5. 根据权利要求1~2任意一项所述的纸芯片,其特征在于,所述表面标记物为单链核酸、蛋白质或多肽。

6. 根据权利要求1~2任意一项所述的纸芯片,其特征在于,所述有机染料为罗丹明、BHQ、Cy3、Cy5或荧光素。

7. 根据权利要求1~2任意一项所述的纸芯片,其特征在于,所述荧光受体为层状氧化石墨烯或氧化碳球。

8. 一种纸芯片的制备方法,包括:

用含疏水性物质的油墨在办公室用打印纸上打印图案,在办公室用打印纸上形成检测区;

向所述检测区内加入荧光供体材料溶液,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;

去除所述荧光供体材料溶液中的溶剂,得到固定有荧光供体材料的纸基材料;

所述固定有荧光供体材料的纸基材料与荧光猝灭剂形成纸芯片;

所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体。

9. 一种生物分子的检测方法,包括以下步骤:

提供纸芯片,所述纸芯片包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体;所述纸基材料为办公室用打印纸;所述检测区通过直接在办公室用打印纸上打印图案形成;

将荧光猝灭剂溶液加入到纸基材料的检测区内,再加入待测样品进行孵育,测定得到的产物的荧光强度,根据所述荧光强度以及浓度与荧光强度的标准曲线计算所述待测样品的浓度。

10. 根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,所述浓度与荧光强度的标准曲线按照以下方法建立:

将荧光猝灭剂溶液加入到纸基材料的检测区内,分别加入系列浓度的标准样品进行孵育,分别测定得到的产物的荧光强度,根据标准样品的系列浓度以及相对应的荧光强度建立浓度与荧光强度的标准曲线。

11.根据权利要求10所述的检测方法,其特征在于,所述待测样品为含有待测生物分子的全血或血清。

12.根据权利要求11所述的检测方法,其特征在于,所述生物分子为单链核酸、糖类、蛋白质、尿酸或乳酸。

13.一种生物分子的检测方法,包括以下步骤:

提供纸芯片,所述纸芯片包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂为有机染料;所述荧光猝灭剂标记在所述表面标记物上;所述纸基材料为办公室用打印纸;所述检测区通过直接在办公室用打印纸上打印图案形成;

将待测样品加入到纸基材料的检测区内进行孵育,测定得到的产物的荧光强度,根据所述荧光强度以及浓度与荧光强度的标准曲线计算所述待测样品的浓度。

14.一种用于生物分子检测的检测装置,包括权利要求1~7任意一项所述的纸芯片和荧光检测装置。

纸芯片、其制备方法及生物分子的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于纸芯片技术领域,尤其涉及一种纸芯片、其制备方法及生物分子的检测方法。

背景技术

[0002] 纸芯片是whitesides课题组于2007年提出的一种满足POCT诊断平台发展要求的器件,具有价格低廉、可便携式、生物相容性好、简单快速、试剂消耗量小和设计灵活的等点,极有潜力发展成为一种新型廉价的检测平台,给发展中国家以及偏远地区提供原本无法获得的医疗诊断及健康监测,对个性化医疗的普及化起到巨大的推动作用。

[0003] 纸芯片的制作方法有很多,常见的方法主要包括光刻法、石蜡打印法、平版印刷法、绘图法、喷墨打印法、等离子体蚀刻法和切割法等。到目前为止纸芯片的制作方法已经日趋成熟,研究的重点转移到利用纸芯片进行生物检测上来。目前纸芯片上的分析检测文献还大多数还停留在对小分子的检测上,例如葡萄糖、尿酸、乳酸和NADH等,关于生物大分子的检测相对较少。2012年,whiteside课题组将纸芯片做成器件用于肝类疾病指示物的检测,他们同时检测了碱性磷酸酶、天冬氨酸转氨酶和总血清蛋白。该器件将样品前处理和分析检测结合于一体,器件中的滤膜可以直接过滤掉血红细胞,实现全血的直接检测,但是该器件的检测灵敏度很低,需进一步研究才能用于实际应用。Lei Ge课题组利用三维纸芯片构建了基于电化学发光免疫检测的器件,同时实现了AFP、CA125、CA199、CEA四种肿瘤标志物的检测,但在实际应用方面还是存在一定局限性。KruII课题组将量子点应用于纸芯片中,实现了固相DNA杂交的检测,同时利用量子点多色发射的特点,建立了纸芯片上检测DNA杂交的比例型传感器,提高了检测灵敏度。Algar课题组同样利用量子点与纸芯片技术的结合在5-60min内实现水解酶活性的检测,检测限可以达到1-2nM。

[0004] 但是,这些方法都存在一定的缺陷:

[0005] (1)纸芯片上生物大分子的检测通常是利用酶联免疫反应进行检测,需要进行洗涤分离等,操作繁琐、耗时,同时,酶联免疫过程还需要使用抗原抗体等蛋白,价格昂贵,检测成本高;

[0006] (2)纸张基底中的添加剂会产生相当高的背景信号,目前纸芯片上的荧光检测方法无法避免这一缺陷,限制其灵敏度的提高;

[0007] (3)量子点具有一定的毒性,不适宜用于临床医学分析,限制了量子点在开发纸芯片方法中的应用。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种纸芯片、纸芯片的制备方法及生物分子的检测方法,本发明提供的纸芯片用于生物分子的检测时,反应速度快、检测成本低、灵敏度较高。

[0009] 本发明提供了一种纸芯片,包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体

材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物；

[0010] 所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体。

[0011] 优选的，所述有机染料标记在所述表面标记物上。

[0012] 优选的，所述荧光供体材料中，所述上转换荧光纳米材料具有式(I)所示的原子比：

[0013] $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Ln}(\text{I})$ ；

[0014] 其中，Ln为Er、Tm或Ho。

[0015] 优选的，所述荧光供体材料中，所述上转换荧光纳米材料的粒径为30nm~100nm。

[0016] 优选的，所述表面标记物为单链核酸、蛋白质或多肽。

[0017] 优选的，所述有机染料为罗丹明、BHQ、Cy3、Cy5或荧光素。

[0018] 优选的，所述荧光受体为层状氧化石墨烯或氧化碳球。

[0019] 优选的，所述纸基材料为办公室用打印纸。

[0020] 优选的，所述检测区通过直接在办公室用打印纸上打印图案形成。

[0021] 本发明还提供了一种纸芯片的制备方法，包括：

[0022] 在纸基材料上形成检测区；

[0023] 向所述检测区内加入荧光供体材料溶液，所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物；

[0024] 去除所述荧光供体材料溶液中的溶剂，得到固定有荧光供体材料的纸基材料；

[0025] 所述固定有荧光供体材料的纸基材料与荧光猝灭剂形成纸芯片；

[0026] 所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体。

[0027] 优选的，所述纸基材料为办公室用打印纸。

[0028] 优选的，所述在纸基材料上形成检测区的具体方法包括：

[0029] 用含疏水性物质的油墨在办公室用打印纸上打印图案，在办公室用打印纸上形成检测区。

[0030] 本发明还提供了一种生物分子的检测方法，包括以下步骤：

[0031] 提供纸芯片，所述纸芯片包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂；其中，所述纸基材料上设置有检测区；所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内，所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物；所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体；

[0032] 将荧光猝灭剂溶液加入到纸基材料的检测区内，再加入待测样品进行孵育，测定得到的产物的荧光强度，根据所述荧光强度以及浓度与荧光强度的标准曲线计算所述待测样品的浓度。

[0033] 优选的，所述浓度与荧光强度的标准曲线按照以下方法建立：

[0034] 将荧光猝灭剂溶液加入到纸基材料的检测区内，分别加入系列浓度的标准样品进行孵育，分别测定得到的产物的荧光强度，根据标准样品的系列浓度以及相对应的荧光强度建立浓度与荧光强度的标准曲线。

[0035] 优选的，所述待测样品为含有待测生物分子的全血或血清。

[0036] 优选的，所述生物分子为单链核酸、糖类、蛋白质、尿酸或乳酸。

[0037] 本发明还提供了一种生物分子的检测方法，包括以下步骤：

[0038] 提供纸芯片,所述纸芯片包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂为有机染料;所述荧光猝灭剂标记在所述表面标记物上;

[0039] 将待测样品加入到纸基材料的检测区内进行孵育,测定得到的产物的荧光强度,根据所述荧光强度以及浓度与荧光强度的标准曲线计算所述待测样品的浓度。

[0040] 本发明还提供了一种用于生物分子检测的检测装置,包括上述技术方案所述的纸芯片和荧光检测装置。

[0041] 与现有技术相比,本发明提供的纸芯片包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转化荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体。本发明将上转换荧光分析与纸芯片技术相结合,减少了反应物的用量,降低了检测成本,加快了反应物的反应速度,将传统的2h~3h的反应时间缩短到1h以内,增加了纸芯片应用于临床检测的可能。同时,本发明将上转换荧光分析引入纸芯片技术中,可以克服生物样品本底荧光和散射光的影响,同时避免纸张添加剂的干扰,实现血清和全血样品的直接检测,提高分析检测的灵敏度。实验结果表明,本发明提供的检测方法的检测结果与实际浓度的吻合率在99.5%以上,准确率较高。

[0042] 进一步的,本发明可以使用办公室用打印纸作为纸基材料,直接在该打印纸上打印出图案即可得到检测区,无需对图案进行进一步处理,简化了纸芯片的制备方法,降低了原材料成本。

附图说明

[0043] 图1为本发明实施例提供的纸基材料检测区形成的方法;

[0044] 图2为本发明提供的检测方法的检测机理;

[0045] 图3为本发明实施例1提供的不同浓度的待测物质的荧光强度曲线图;

[0046] 图4为本发明实施例1提供的标准曲线;

[0047] 图5为本发明实施例2提供的不同浓度的待测物质的荧光强度曲线图;

[0048] 图6为本发明实施例2提供的标准曲线;

[0049] 图7为本发明实施例3提供的不同浓度的待测物质的荧光强度曲线图;

[0050] 图8为本发明实施例3提供的标准曲线。

具体实施方式

[0051] 本发明提供了一种纸芯片,包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体。

[0052] 本发明提供的纸芯片包括纸基材料,所述纸基材料又称为纸基载体,是纸芯片的基础结构。本发明对所述纸基材料没有特殊限制,可以为whatman1号滤纸、办公用打印纸等,优选为办公用打印纸。对于纸基材料而言,由于其中的添加剂会产生较高的背景信号,

为了获得较为准确的测定结果,纸芯片一般采用whatman1号滤纸等添加剂较少的纸张,但是,本发明采用上转换荧光分析与纸芯片技术相结合,避免了纸张中的添加剂的影响,因此,可以直接使用办公室打印纸等较为便宜、容易获得的纸张。

[0053] 所述纸基材料上设置有检测区,本发明对所述检测区的设置方法没有特殊限制,可以为本领域技术人员熟知的光刻法、石蜡打印法、平板印刷法、绘图法、喷墨打印法、等离子蚀刻法和切割法等,采用上述方法在纸基材料上形成图案后,对所述图案进行疏水处理,从而在纸基材料上获得检测区。本发明优选直接在纸基材料上打印出图案,不对其进行疏水处理直接形成检测区,此时,优选使用含疏水性物质的油墨进行打印。本发明对所述检测区的个数没有特殊限制,本领域技术人员可以根据实际需要进行设定。

[0054] 所述纸芯片还包括荧光供体,所述荧光供体的作用在于提供荧光物质,并通过荧光物质的荧光猝灭现象实现对生物分子的检测。在本发明中,所述荧光供体包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物。其中,所述上转换荧光纳米材料优选为水溶性上转换荧光纳米材料,优选具有式(I)所示的原子比:

[0055] $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Ln}(\text{I})$;

[0056] 其中,Ln为Er、Tm或Ho,优选为Er。

[0057] 所述上转换荧光纳米材料的粒径优选为30nm~100nm,更优选为50nm~80nm。本发明对所述上转换荧光纳米材料的来源没有特殊限制,可以为市场上购买得到,也可以按照本领域技术人员熟知的方法制备得到。本发明优选在按照本领域技术人员熟知的方法制备上转换荧光纳米材料,同时,在其表面修饰有氨基或者羧基,例如采用聚乙烯亚胺或聚丙烯酸等对其进行修饰,以便后续标记表面标记物。

[0058] 所述表面标记物优选为单链核酸、蛋白质或多肽,如癌胚抗原适配体等,其标记在所述上转换荧光纳米材料表面。本发明对所述表面标记物标记在所述上转换荧光纳米材料表面的方式没有特殊限制,可以为通过化学反应进行连接实现标记,例如,采用聚乙烯亚胺或聚丙烯酸修饰所述上转换荧光纳米材料,然后将其与表面标记物共同孵育,得到表面标记有表面标记物的上转换荧光纳米材料。

[0059] 在本发明中,所述荧光供体固定在所述纸基材料的检测区内。本发明对所述荧光供体固定在所述纸基材料的检测区内的方式没有特殊限制,可以采用以下方法实现固定:将荧光供体溶液加入到纸基材料的检测区内,将荧光供体溶液中的溶剂去除,即可将荧光供体溶液固定于所述检测区内。

[0060] 本发明提供的纸芯片还包括荧光猝灭剂,所述荧光猝灭剂的作用是使荧光材料发生荧光猝灭,从而实现对生物分子的检测分析。在本发明中,所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体;所述有机染料包括但不限于罗丹明、BHQ、Cy3、Cy5或荧光素等;所述荧光受体优选为层状氧化石墨烯或氧化碳球等。在本发明中,所述荧光猝灭剂为有机染料时,可以单独存在,使用时再与检测区内的荧光供体混合;也可以标记在所述表面标记物上,此时,有机染料标记在表面标记物上,表面标记物标记在上转换荧光纳米材料上,上转换荧光纳米材料固定在纸基材料的检测区内。本发明对所述有机染料在表面标记物上的标记方法没有特殊限制,可以直接购买标记有有机染料的表面标记物。所述荧光猝灭剂为荧光受体时,优选单独存在,使用时再与检测区内的荧光供体混合。本发明对所述层状氧化石墨烯或氧化碳球的来源没有特殊限制,可以直接购买得到,也可以按照本领域技术人员熟知的方法制

备得到。

[0061] 具体而言,本发明提供的纸芯片可以包括两种:

[0062] 第一种纸芯片为:纸基材料、荧光供体和有机染料,纸基材料的检测区内固定有上转换荧光材料,上转换荧光材料上标记有表面标记物,表面标记物上标记有有机染料;使用时,直接将待测样品加入到纸基材料的检测区内进行孵育即可实现检测;

[0063] 第二种纸芯片为:,纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂,纸基材料的检测区内固定有上转换荧光材料,上转换荧光材料上标记有表面标记物;使用时,将荧光猝灭剂加入到纸基材料的检测区内,再加入待测样品进行孵育即可实现检测。此时,荧光猝灭剂可以为有机染料,也可以为荧光受体。

[0064] 同时,本发明提供的纸芯片需要配合使用固相荧光检测器对加入待测样品孵育后得到的产物进行检测,从而获得待测样品的浓度。即,本发明提供的纸芯片需要配合固相荧光检测器使用。本发明对所述固相荧光检测器没有特殊限制,市场上购买的检测器即可。

[0065] 本发明还提供了一种纸芯片的制备方法,包括:

[0066] 在纸基材料上形成检测区;

[0067] 向所述检测区内加入荧光供体材料溶液,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转化荧光纳米材料上的表面标记物;

[0068] 去除所述荧光供体材料溶液中的溶剂,得到固定有荧光供体材料的纸基材料;

[0069] 所述固定有荧光供体材料的纸基材料与荧光猝灭剂形成纸芯片。

[0070] 本发明以纸基材料为纸芯片的基础结构,所述纸基材料又称为纸基载体,可以为whatman1号滤纸、办公用打印纸等,优选为办公用打印纸。对于纸基材料而言,由于其中的添加剂会产生较高的背景信号,为了获得较为准确的测定结果,纸芯片一般采用whatman1号滤纸等添加剂较少的纸张,但是,本发明采用上转换荧光分析与纸芯片技术相结合,避免了纸张中的添加剂的影响,因此,可以直接使用办公室打印纸等较为便宜、容易获得的纸张。

[0071] 本发明对在纸基材料上形成检测区的方法没有特殊限制,可以为本领域技术人员熟知的光刻法、石蜡打印法、平板印刷法、绘图法、喷墨打印法、等离子蚀刻法和切割法等,采用上述方法在纸基材料上形成图案后,对所述图案进行疏水处理,即可在纸基材料上形成检测区。本发明优选直接在纸基材料上打印出图案,不对其进行疏水处理直接形成检测区,此时,优选使用含疏水性物质的油墨进行打印,即可以用含疏水性物质的油墨在办公室用打印纸上打印图案,一步法在办公室用打印纸上形成检测区。本发明对所述检测区的个数没有特殊限制,本领域技术人员可以根据实际需要进行设定。

[0072] 参见图1,图1为本发明实施例提供的纸基材料检测区形成的方法,直接在纸上打印图案,无需进行其他处理即可一步得到设置有检测区的纸基材料。

[0073] 形成检测区后,向所述检测区加入荧光供体材料溶液,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物。其中,所述上转换荧光纳米材料优选为水溶性上转换荧光纳米材料,优选具有式(I)所示的原子比:

[0074] $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Ln}(\text{I})$;

[0075] 其中,Ln为Er、Tm或Ho,优选为Er。

[0076] 所述上转换荧光纳米材料的粒径优选为30nm~100nm,更优选为50nm~80nm。本发

明对所述上转化荧光纳米材料的来源没有特殊限制,可以为市场上购买得到,也可以按照本领域技术人员熟知的方法制备得到。本发明优选在按照本领域技术人员熟知的方法制备上转化荧光纳米材料,同时,在其表面修饰有氨基或者羧基,例如采用聚乙烯亚胺或聚丙烯酸等对其进行修饰,以便后续标记表面标记物。

[0077] 所述表面标记物优选为单链核酸、蛋白质或多肽,如癌胚抗原适配体等,其标记在所述上转换荧光纳米材料表面。本发明对所述表面标记物标记在所述上转换荧光纳米材料表面的方式没有特殊限制,可以为通过化学反应进行连接实现标记,例如,采用聚乙烯亚胺或聚丙烯酸修饰所述上转换荧光纳米材料,然后将其与表面标记物共同孵育,得到表面标记有表面标记物的上转换荧光纳米材料。

[0078] 所述荧光供体溶液优选为将荧光供体分散于Tris-HCl缓冲液中形成的溶液,将其加入到纸基材料的检测区内,去除荧光供体溶液中的溶剂,即可将荧光供体固定在纸基材料的检测区内。本发明对去除溶剂的方法没有特殊限制,可以为蒸发等本领域技术人员熟知的方法。

[0079] 得到检测区固定有荧光供体材料的纸基材料后,将其与荧光猝灭剂配套组合,即可得到纸芯片。将该纸芯片与固相荧光检测器配套组合,即可实现对生物分子的检测。在本发明中,所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体;所述有机染料包括但不限于罗丹明、BHQ、Cy3、Cy5或荧光素等;所述荧光受体优选为层状氧化石墨烯或氧化碳球等。在本发明中,所述荧光猝灭剂为有机染料时,可以单独存在,使用时再与检测区内的荧光供体混合;也可以标记在所述表面标记物上,此时,有机染料标记在表面标记物上,表面标记物标记在上转换荧光纳米材料上,上转化荧光纳米材料固定在纸基材料的检测区内。本发明对所述有机染料在表面标记物上的标记方法没有特殊限制,可以直接购买标记有有机染料的表面标记物。所述荧光猝灭剂为荧光受体时,优选单独存在,使用时再与检测区内的荧光供体混合。本发明对所述层状氧化石墨烯或氧化碳球的来源没有特殊限制,可以直接购买得到,也可以按照本领域技术人员熟知的方法制备得到。

[0080] 在本发明中,当有机染料标记在表面标记物上时,纸芯片的制备方法如下:

[0081] 在纸基材料上形成检测区;

[0082] 向所述检测区内加入荧光供体材料溶液,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料、标记在所述上转化荧光纳米材料上的表面标记物和标记在所述表面标记物上的有机染料;

[0083] 去除所述荧光供体材料溶液中的溶剂,得到固定有荧光供体材料的纸基材料;

[0084] 所述固定有荧光供体材料的纸基材料即可作为纸芯片使用。

[0085] 由于荧光染料可直接标记在表面标记物上,因此,其可以与表面标记物、上转换荧光纳米材料等直接固定在纸基材料的检测区内,其他步骤与上述制备方法相同,本发明在此不再赘述。

[0086] 在本发明中,所述氨基或羧基修饰的上转化荧光纳米材料可以按照以下方法制备:

[0087] 取2mL0.25mol/L稀土硝酸盐溶液,其中,稀土离子为摩尔比为80:18:2的钪离子:镱离子:铈离子,向其中加入18mL无水乙醇,再加入含0.9000g聚丙烯酸(聚丙烯酸与稀土离子摩尔比为1:1)或0.3400g聚乙烯亚胺的水溶液8mL,搅拌10min;然后加入含0.2100g氟化

钠(F^-/Ln^{3+} 摩尔比为10:1)或0.1260g氟化钠(F^-/Ln^{3+} 摩尔比为6:1)的水溶液8mL,搅拌20min后,置于高压反应釜中,在搅拌条件下于200℃反应4h~10h;停止加热并保持搅拌冷却至室温,离心分离出固体产物,用无水乙醇和超纯水各洗3次,室温下真空干燥12h得到聚丙烯酸或聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料。

[0088] 所述水溶性上转换荧光纳米材料的表面标记可以按如下方法进行:取5mg聚丙烯酸或聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料溶于2mL~5mLMES缓冲(10mM, pH5.5)或者是HEPES缓冲(10mM, pH7.4)中,加入0.8mg~3.2mg EDC·HCl、2.2mg~6.6mg SuIf-o-NHS或者是1mg~5mg suIf-o-SMCC,在30℃、轻微振荡条件下孵育0.5h~2h以活化上转换荧光纳米材料表面的羧基或氨基。活化完成后离心分离得活化的聚丙烯酸或聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料,将其用高纯水洗三次。洗完的沉淀分散于2mL~5mL HEPES缓冲(10mM, pH7.2)中,向其中加入1.5uM~4uM的单链DNA或1mg~3mg的染料标记的多肽,在30℃、轻微振荡条件下孵育2h~24h后加入50mgTris以封闭过量的NHS。离心分离,将得到的沉淀用高纯水洗三次以除去过量的单链DNA或多肽,洗完后分散于2.5mITris-HCl(10mM, 150mM NaCl, pH7.4)中。

[0089] 在本发明中,所述层状氧化石墨烯可以按照以下方法制备:取50mL浓硫酸加热至90℃,向其中加入10g $K_2S_2O_8$ 和10g P_2O_5 ,降温至80℃,待 $K_2S_2O_8$ 和 P_2O_5 完全溶解后缓慢加入12g石墨粉,30min内加完,80℃条件下反应4h~5h,然后加入2L水,静置一夜后过滤,离心洗涤以除去酸,将得到的预氧化产物进行干燥;取460mL浓硫酸至于冰水浴中,加入所述预氧化产物并搅拌,然后保持反应液温度不超过10℃下缓慢加入60g高锰酸钾,于35℃反应2h后缓慢加入1L蒸馏水,使其温度不超过50℃,继续搅拌2h后加入3L去离子水和50mL30% H_2O_2 ,静置一天后弃去上清液,残留液先用10%HCl洗再用蒸馏水洗,将得到的氧化产物进行干燥;将干燥后产物继续超声2h,使氧化石墨烯逐渐剥落成层状氧化石墨烯。

[0090] 以上方法只是对上转换荧光纳米材料、在上转换纳米材料表面标记表面标记物、制备层状氧化石墨烯的举例说明,本领域技术人员可以用其他已知方法制备上述物质。

[0091] 本发明还提供了一种生物分子的检测方法,包括以下步骤:

[0092] 提供纸芯片,所述纸芯片包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体

[0093] 将荧光猝灭剂溶液加入到纸基材料的检测区内,再加入待测样品进行孵育,测定得到的产物的荧光强度,根据所述荧光强度以及浓度与荧光强度的标准曲线计算所述待测样品的浓度。

[0094] 当所述荧光猝灭剂标记于所述表面标记物时,所述生物分子的检测方法包括以下步骤:

[0095] 提供纸芯片,所述纸芯片包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂标记在所述表面标记物上;所述荧光猝灭剂为有机染料;

[0096] 将待测样品加入到纸基材料的检测区内进行孵育,测定得到的产物的荧光强度,

根据所述荧光强度以及浓度与荧光强度的标准曲线计算所述待测样品的浓度。

[0097] 除了荧光猝灭剂的加入方式不同,上述两种检测方法无其他区别,因此,以第一种检测方法为例进行说明。

[0098] 本发明以上述技术方案所述的纸芯片或者上述制备方法制备得到的纸芯片为检测装置对生物分子进行检测,纸芯片的具体结构及其制备工艺参见上文所述,本发明在此不再赘述。

[0099] 将荧光猝灭剂溶液加入到纸基材料的检测区内,使荧光猝灭剂与荧光供体发生反应,然后加入待测样品进行孵育,测定得到的产物的荧光强度,根据所述荧光强度以及浓度与荧光强度的标准曲线即可计算所述待测样品的浓度。

[0100] 本发明首先选择最佳荧光猝灭剂浓度,具体方法如下:

[0101] 向纸基材料的检测区内分别加入不同浓度的荧光猝灭剂溶液,反应后分别检测得到的反应产物的荧光强度,选取荧光猝灭效率最大时荧光猝灭剂溶液的浓度作为最优浓度。

[0102] 当荧光猝灭剂为有机染料且标记在表面标记物上时,可以不进行该步操作。

[0103] 本发明优选以生物分子在缓冲溶液中形成的待测样品作为检测对象进行检测浓度的确定,具体方法如下:

[0104] 向纸基材料的检测区内分别加入最优浓度的荧光猝灭剂溶液,反应后加入系列浓度的生物分子在缓冲溶液中形成的待测样品溶液,孵育后分别检测得到的反应产物的荧光强度,待测样品溶液浓度的荧光强度记为F,空白溶液的荧光强度记为F0,以 $(F-F_0)/F_0$ 为纵坐标、浓度为横坐标制作待测物质在缓冲溶液中的标准曲线,获得该检测方法的适宜检测浓度。

[0105] 获得适宜检测浓度后,可以生物分子在全血或血清中形成的待测样品作为检测对象,进行标准曲线的建立以及未知浓度待测样品的检测,标准曲线的建立方法如下:

[0106] 向纸基材料的检测区内分别加入最优浓度的荧光猝灭剂溶液,反应后加入系列浓度的生物分子在血清或全血中形成的待测样品溶液,该系列浓度在上述适宜检测浓度范围内,孵育后分别检测得到的反应产物的荧光强度,待测样品溶液浓度的荧光强度记为F,空白溶液的荧光强度记为F0,以 $(F-F_0)/F_0$ 为纵坐标、浓度为横坐标制作待测物质在全血或血清中的标准曲线。

[0107] 对于未知浓度待测样品的检测而言,具体方法如下:

[0108] 向纸基材料的检测区内加入最优浓度的荧光猝灭剂溶液,反应后加入生物分子在血清或全血中形成的待测样品溶液,孵育后检测得到的反应产物的荧光强度,根据该荧光强度以及待测物质在全血或血清中的标准曲线计算该待测样品的浓度即可;

[0109] 或者可以为:

[0110] 向纸基材料的检测区内加入最优浓度的荧光猝灭剂溶液,反应后加入生物分子在缓冲溶液中形成的待测样品溶液,孵育后检测得到的反应产物的荧光强度,根据该荧光强度以及待测物质在缓冲溶液中的标准曲线计算该待测样品的浓度即可。

[0111] 在上述最优浓度荧光猝灭剂溶液的确定、缓冲溶液中标准曲线的建立、全血或血清中标准曲线的建立以及未知浓度待测样品的检测过程中,荧光猝灭剂和荧光供体进行反应的工艺参数、孵育的工艺参数以及检测的参数等相似,具体可以为:荧光猝灭剂和荧光供

体在检测区混合后,优选在20℃~30℃下放置3min~10min,使荧光猝灭剂和荧光供体进行反应;进行孵育的温度优选为20℃~30℃,时间优选为10min~30min;优选为980nm激光器下检测孵育后得到的产物的荧光强度。

[0112] 本发明提供的检测方法可以对生物分子进行检测,所述生物分子可以为生物大分子,也可以为生物小分子,包括但不限于单链核酸、糖类、蛋白质、尿酸或乳酸等。

[0113] 当荧光猝灭剂为有机染料且标记在表面标记物表面时,得到纸芯片后即可直接进行待测样品在缓冲溶液中标准曲线的建立以及待测样品全血或血清中标准曲线的建立,然后直接进行未知浓度样品的检测即可,无需选择最适宜浓度的荧光猝灭剂浓度。除此之外,与上述方法所述的检测方法基本无差别,本领域技术人员可以参考上文所述的方法,本发明在此不再赘述。

[0114] 参见图2,图2为本发明提供的检测方法的检测机理,在加入待测物之前,荧光猝灭剂、表面标记物和上转换荧光纳米材料依次连接;加入待测物之后,待测物使荧光猝灭剂与表面标记物和/或上转换荧光纳米材料分离,使上转换荧光纳米材料发生荧光猝灭,从而建立荧光强度与待测物的浓度之间的关系,实现对待测物的检测。

[0115] 本发明提供的纸芯片包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂;其中,所述纸基材料上设置有检测区;所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内,所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物;所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体。本发明将上转换荧光分析与纸芯片技术相结合,减少了反应物的用量,降低了检测成本,加快了反应物的反应速度,将传统的2h~3h的反应时间缩短到1h以内,增加了纸芯片应用于临床检测的可能。同时,本发明将上转换荧光分析引入纸芯片技术中,可以克服生物样品本底荧光和散射光的影响,同时避免纸张添加剂的干扰,实现血清和全血样品的直接检测,提高分析检测的灵敏度。

[0116] 为了进一步说明本发明,以下结合实施例对本发明提供的纸芯片、其制备方法及生物分子的检测方法进行详细说明。

[0117] 实施例1

[0118] 取2mL0.25mol/L稀土硝酸盐溶液,其中,稀土离子为摩尔比为80:18:2的钇离子、镱离子和铒离子,向其中加入18mL无水乙醇,再加入含0.9000g聚丙烯酸(聚丙烯酸与稀土离子摩尔比为1:1)的水溶液8mL,搅拌10min;然后加入含0.2100g氟化钠(F^- /稀土离子摩尔比为10:1)的水溶液8mL,搅拌20min后,置于高压反应釜中,在搅拌条件下于200℃反应10h;停止加热并保持搅拌冷却至室温,离心分离出固体产物,用无水乙醇和超纯水各洗3次,室温下真空干燥12h得到聚丙烯酸修饰的上转换荧光纳米材料;

[0119] 取5mg聚丙烯酸修饰的上转换荧光纳米材料溶于5mL10mM,pH值为5.5的MES缓冲液中,加入3.2mg EDC·HCl和6.6mgSuIf-o-NHS,在30℃、轻微振荡条件下孵育1.5h,离心分离得活化的聚丙烯酸修饰的上转换荧光纳米材料,将其用高纯水洗三次。洗完的沉淀分散于3mL10mM、pH值为7.2的HEPES缓冲液中,向其中加入2mgTAMRA标记的多肽,所述TAMRA标记的多肽购买自上海俊怡生物科技有限公司,序列为TAMRA-GPLGVRC,在30℃、轻微振荡条件下孵育20h后加入50mgTris,离心分离,将得到的沉淀用高纯水洗三次,洗完后分散于2.5mL10mM、150mM NaCl、pH值为7.4的Tris-HCl中,得到UCP-peptide-TAMRA溶液;

[0120] 以油性笔油墨作为打印油墨,在A4打印纸上打印图案,形成检测区;取4μL0.05mg/

mL的UCP-peptide-TAMRA溶液加入到上述检测区中,室温放置10min,干燥后分别加入4 μ L含1000倍稀释的血清的不同浓度的MMP-2溶液,浓度分别为0pg/mL、50pg/mL、500pg/mL、800pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL和5000pg/mL,室温孵育30min,在980nm激光器下测其上转换荧光强度,参见图3,图3为本发明实施例1提供的不同浓度的待测物质的荧光强度曲线图;计算加入了目标物的样品荧光强度F与不含目标物的样品荧光强度F₀的恢复程度,以目标物浓度为横坐标,以(F-F₀)/F₀为纵坐标作图得到标准曲线,参见图4,图4为本发明实施例1提供的标准曲线。

[0121] 配制2500pg/mL的MMP-2血清样品,按照上述步骤检测其荧光强度,并根据上述标准曲线计算其浓度,结果表明,计算得到的浓度为2470pg/mL,与已知浓度的吻合率为99.8%。

[0122] 实施例2

[0123] 取2mL0.25mol/L稀土硝酸盐溶液,其中,稀土离子为摩尔比为80:18:2的钇离子、铽离子和镱离子,向其中加入18mL无水乙醇,再加入含0.3400g聚乙烯亚胺的水溶液8mL,搅拌10min;然后加入含0.1260g氟化钠(F⁻/稀土离子摩尔比为6:1)的水溶液8mL,搅拌20min后,置于高压反应釜中,在搅拌条件下于200℃反应4h;停止加热并保持搅拌冷却至室温,离心分离出固体产物,用无水乙醇和超纯水各洗3次,室温下真空干燥12h得到聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料;

[0124] 取5mg聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料溶于5mL10mM,pH值为5.5的MES缓冲液中,加入3.2mg EDC·HCl和6.6mgSuIf-o-NHS,在30℃、轻微振荡条件下孵育1.5h,离心分离得活化的聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料,将其用高纯水洗三次。洗完的沉淀分散于3mL10mM、pH值为7.2的HEPES缓冲液中,向其中加入3 μ M的癌胚抗原适配体,在30℃、轻微振荡条件下孵育2h后加入50mgTris,离心分离,将得到的沉淀用高纯水洗三次,洗完分散于2.5mL10mM、150mM NaCl、pH值为7.4的Tris-HCl中,得到UCP-CEA aptamer溶液;

[0125] 取50mL浓硫酸加热至90℃,向其中加入10g K₂S₂O₈和10g P₂O₅,降温至80℃,待K₂S₂O₈和P₂O₅完全溶解后缓慢加入12g石墨粉,30min内加完,80℃条件下反应5h,然后加入2L水,静置一夜后过滤,离心洗涤以除去酸,将得到的预氧化产物进行干燥;取460mL浓硫酸至于冰水浴中,加入所述预氧化产物并搅拌,然后保持反应液温度不超过10℃下缓慢加入60g高锰酸钾,于35℃反应2h后缓慢加入1L蒸馏水,使其温度不超过50℃,继续搅拌2h后加入3L去离子水和50mL30%H₂O₂,静置一天后弃去上清液,残留液先用10%HCl洗再用蒸馏水洗,将得到的氧化产物进行干燥;将干燥后产物继续超声2h,使氧化石墨烯逐渐剥落成层状氧化石墨烯;

[0126] 以油性笔油墨作为打印油墨,在A4打印纸上打印图案,形成检测区;取4 μ L0.05mg/mL的UCP-CEA aptamer溶液加入到上述检测区中,室温放置10min,干燥后加入4 μ L不同浓度的层状氧化石墨烯溶液,浓度分别为0mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL和0.5mg/mL,室温放置10min,在980nm激光器下测其上转换荧光强度,得到荧光猝灭曲线,其荧光猝灭效率达到最大时层状氧化石墨烯的浓度为0.1mg/mL;

[0127] 取4 μ L0.05mg/mL的UCP-CEA aptamer溶液加入到上述检测区,室温放置10min,干燥后加入4 μ L0.1mg/mL的层状氧化石墨烯溶液,干燥后加入4 μ L不同浓度的CEA溶液,CEA的浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、100ng/mL和500ng/mL,室温孵育30min,在

980nm激光器下测其上转换荧光强度,参见图5,图5为本发明实施例2提供的不同浓度的待测物质的荧光强度曲线图;计算加入了目标物的样品荧光强度F与不含目标物的样品荧光强度 F_0 的恢复程度,以目标物浓度为横坐标,以 $(F-F_0)/F_0$ 为纵坐标作图得到标准曲线,参见图6,图6为本发明实施例2提供的标准曲线。

[0128] 配制80ng/mL的CEA样品,按照上述步骤检测其荧光强度,并根据上述标准曲线计算其浓度,结果表明,计算得到的浓度为79.6ng/mL,与已知浓度的吻合率为99.5%。

[0129] 实施例3

[0130] 取2mL0.25mol/L稀土硝酸盐溶液,其中,稀土离子为摩尔比为80:18:2的钆离子、镱离子和铒离子,向其中加入18mL无水乙醇,再加入含0.3400g聚乙烯亚胺的水溶液8mL,搅拌10min;然后加入含0.1260g氟化钠(F^- /稀土离子摩尔比为6:1)的水溶液8mL,搅拌20min后,置于高压反应釜中,在搅拌条件下于200℃反应4h;停止加热并保持搅拌冷却至室温,离心分离出固体产物,用无水乙醇和超纯水各洗3次,室温下真空干燥12h得到聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料;

[0131] 取5mg聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料溶于5mL10mM,pH值为5.5的MES缓冲液中,加入3.2mg EDC·HCl和6.6mgSuIf-o-NHS,在30℃、轻微振荡条件下孵育1.5h,离心分离得活化的聚乙烯亚胺修饰的上转换荧光纳米材料,将其用高纯水洗三次。洗完的沉淀分散于3mL10mM、pH值为7.2的HEPES缓冲液中,向其中加入3μM的癌胚抗原适配体,在30℃、轻微振荡条件下孵育2h后加入50mgTris,离心分离,将得到的沉淀用高纯水洗三次,洗完后分散于2.5mL10mM、150mM NaCl、pH值为7.4的Tris-HCl中,得到UCP-CEA aptamer溶液;

[0132] 取一支新买蜡烛点燃后用洗净玻璃片收集蜡烛灰,将其刮下后冷却称取8mg溶于15mL6mol/L的硝酸溶液中,架上球形冷凝管,于115℃下加热10h。加热结束后,待溶液冷至室温,用新制碳酸钠溶液调pH至中性,再在12000rpm/min下离心20min,得到黑色沉淀。将黑色沉淀用高纯水洗3次,最后用高纯水将氧化好的碳球定溶至4mL的PE管里,超声1h待用,所得氧化碳球浓度为2mg/mL。

[0133] 以油性笔油墨作为打印油墨,在A4打印纸上打印图案,形成检测区;取4μL0.05mg/mL的UCP-CEA aptamer溶液加入到上述检测区中,室温放置10min,干燥后加入4μL不同浓度的氧化碳球溶液,浓度分别为0mg/mL、0.001mg/mL、0.002mg/mL、0.005mg/mL、0.01mg/mL、0.02mg/mL、0.05mg/mL、0.08mg/mL和0.10mg/mL,室温放置10min,在980nm激光器下测其上转换荧光强度,得到荧光猝灭曲线,其荧光猝灭效率达到最大时氧化碳球的浓度为0.15mg/mL;

[0134] 取4μL0.05mg/mL的UCP-CEA aptamer溶液加入到上述检测区,室温放置10min,干燥后加入4μL0.15mg/mL的氧化碳球溶液,干燥后加入4μL不同浓度的CEA溶液,CEA的浓度分别为0ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、80ng/mL和100ng/mL,室温孵育30min,在980nm激光器下测其上转换荧光强度,参见图7,图7为本发明实施例3提供的不同浓度的待测物质的荧光强度曲线图;计算加入了目标物的样品荧光强度F与不含目标物的样品荧光强度 F_0 的恢复程度,以目标物浓度为横坐标,以 $(F-F_0)/F_0$ 为纵坐标作图得到标准曲线,参见图8,图8为本发明实施例3提供的标准曲线。

[0135] 配制60ng/mL的CEA样品,按照上述步骤检测其荧光强度,并根据上述标准曲线计算其浓度,结果表明,计算得到的浓度为59.9ng/mL,与已知浓度的吻合率为99.9%。

[0136] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

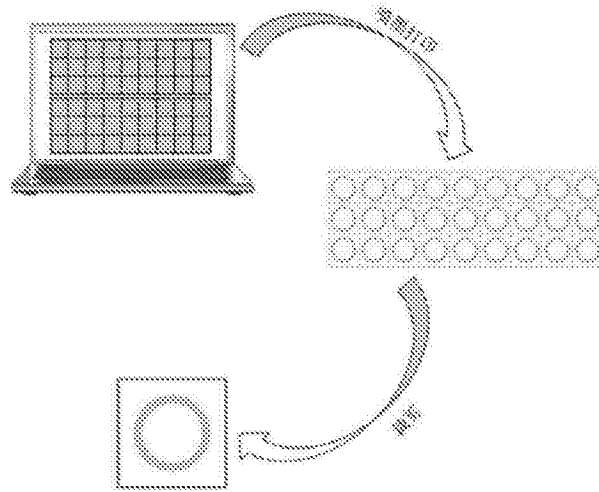


图1

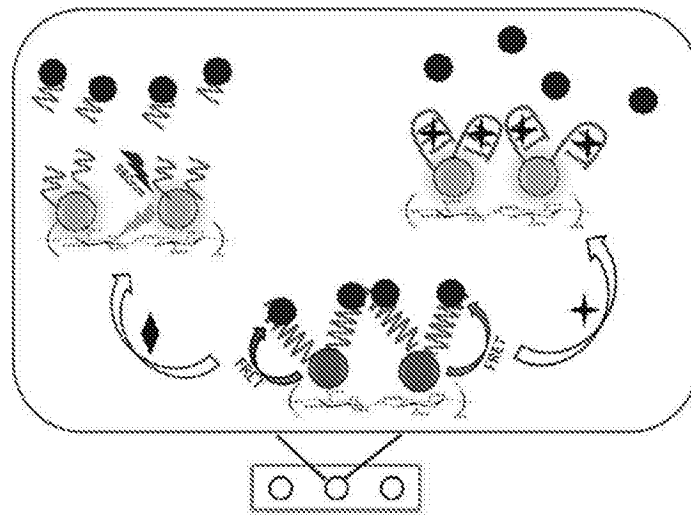


图2

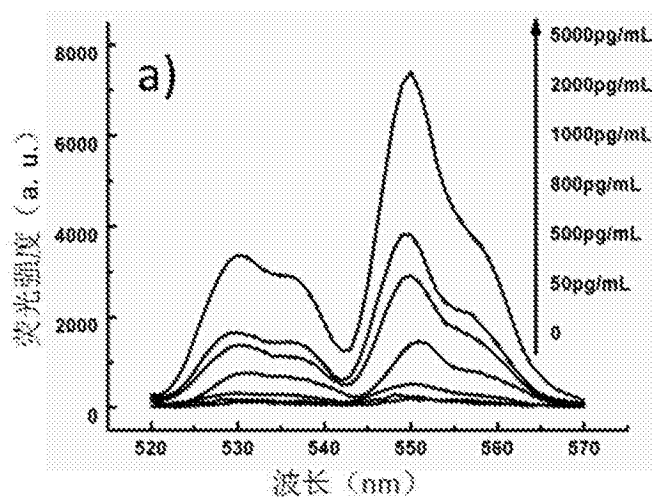


图3

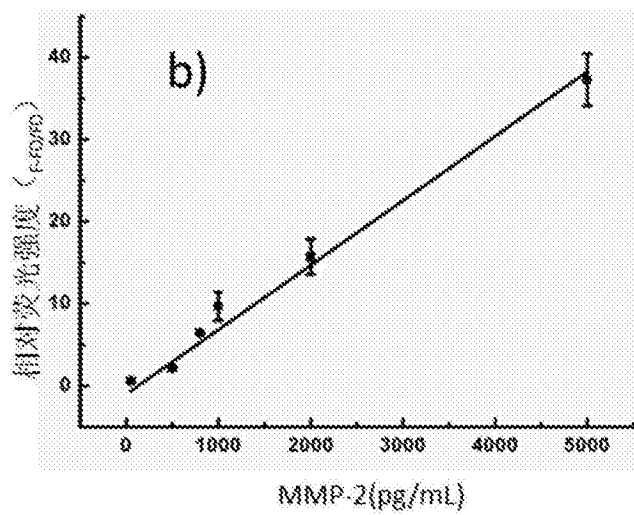


图4

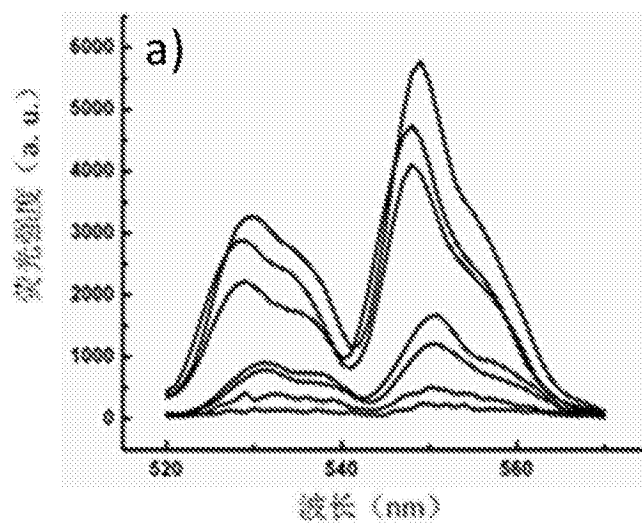


图5

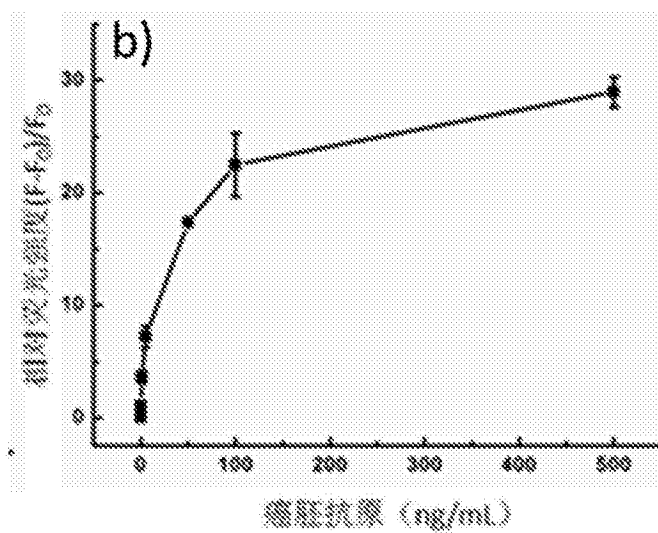


图6

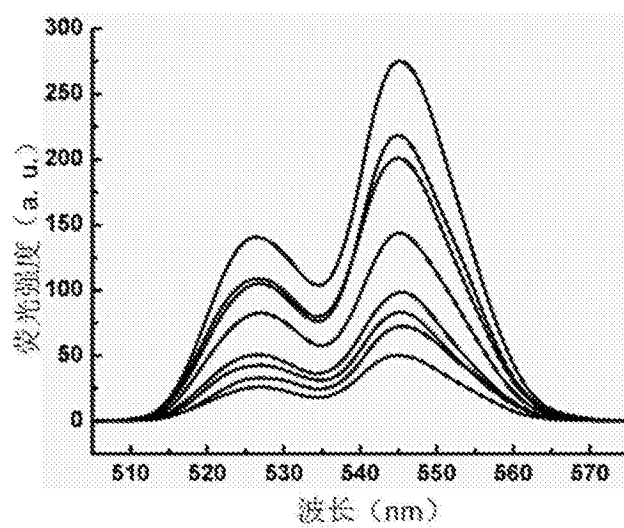


图7

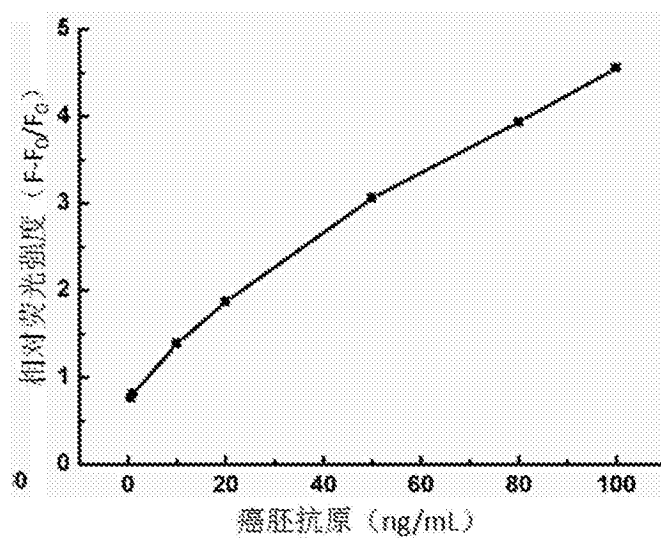


图8

专利名称(译)	纸芯片、其制备方法及生物分子的检测方法		
公开(公告)号	CN104807987B	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201410040579.4	申请日	2014-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	广州阳普医疗科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州阳普医疗科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州阳普医疗科技股份有限公司		
[标]发明人	刘志洪 何梦媛 吴正俊 杨利		
发明人	刘志洪 何梦媛 吴正俊 杨利		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N2021/6432 G01N33/521 G01N33/542		
其他公开文献	CN104807987A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种纸芯片，包括纸基材料、荧光供体和荧光猝灭剂；其中，所述纸基材料上设置有检测区；所述荧光供体材料固定在所述纸基材料检测区内，所述荧光供体材料包括上转换荧光纳米材料和标记在所述上转换荧光纳米材料上的表面标记物；所述荧光猝灭剂包括有机染料或荧光受体。本发明还提供了纸芯片的制备方法、生物分子的检测方法以及用于生物分子检测的检测装置。本发明将上转换荧光分析与纸芯片技术相结合，减少了反应物的用量，降低了检测成本，加快了反应物的反应速度，将传统的2h~3h的反应时间缩短到1h以内，增加了纸芯片应用于临床检测的可能。

