

纸基检测方法研究进展

林虹君¹,张爱红²,李高伟¹,刘志兵¹,刘晶¹

(1.中国人民解放军32311部队,北京102112;2.中国人民解放军陆军防化学院,北京102205)

摘要:随着现代检测技术的简约化、快速化、低成本的发展趋势,基于纸的各类检测方法应运而生.纸作为一种新的检测载体,既能满足传统检测方法的基本要求,还具备了便捷、成本低、检测时间短、适合户外及发展中国家实验室需求等优点.近年来纸基检测发展迅速,在酶联免疫吸附测定法、微流控检测、电传感器、荧光检测、核酸检测等方法中应用广泛.分析并梳理纸基检测方法在以上领域存在的不足,展望其在蛋白质检测、生物标志物筛查和临床诊断中的应用前景,对后续研究具有重要意义.

关键词:纸;传感器;酶联免疫法;微流控;核酸检测

中图分类号:Q31

文献标志码:A

生物检测方法用于发现和鉴定生物标志物.目前常用的生物检测方法有:酶联免疫法(ELISA法)^[1-2]、western blotting法^[3-4]、荧光探针法^[5-6]、电传感器法^[7-9]等.生物检测方法的灵敏度、成本、检测速度以及对样本的要求等都会影响其在实际工作中的应用.随着科研工作对检测灵敏度要求越来越高,各种新的检测方法不断出现.新方法的检测成本高,对检测人员要求严,对检测环境要求苛刻等特点限制了其广泛应用.因此,各种“简装”的检测方法应运而生,比如,文献[10]在2010年提出了纸基ELISA方法(paper-based ELISA),是纸基检测方法开始的里程碑,随后几年,各种纸基检测方法相继问世.KIM团队^[11]提出一种光学阅读器,可以在纸聚合物离心圆盘平台上以非常灵敏和快速的方式测量透射率,该装置可实现对多个样品的实时监控.文献[12]报道了基于颜色变化的荧光试纸传感器,可快速、直观地监测人尿中内源性Cu²⁺.经过不断完善和改进,目前该方法已在人类尿液目标金属离子检测中广泛应用.文献[13]提出并设计了一种测定游离胆红素的纸基电位传感器,该传感器通过聚合物离子选择膜,可快速、选择性地测量游离离子胆红素.文献[14]对纸的分子结构、功能化修饰、实际应用、批量生产,以及目前和未来在各领域的应用进行了系统研究,并指出未来基于纸质的诊断设备有着光明的前景.文献[15]提出静电自组装柔性纸基湿度传感器.由于纸纤维素具有良好的亲水性、生物降解性和低廉的成本,同时克服了传统传感器结构刚性大、成本高、集成过程耗时等不足,因此基于纸纤维材料的传感器被认为是一种理想的改进方法.实验证明,新方法灵敏度高,耐久性好,结果令人满意.

纸基检测方法具有操作简便、价格低廉、节省样本、方便户外使用等特点.由于纸基载体对微量样本即可产生有效反应,因此适合那些生物样本很难制得或样本量很少的情况.该方法不需要电源、昂贵设备及其他配套器材,因此在多种环境检测中应用广泛.

1 纸基 ELISA 检测

1.1 纸基 ELISA 原理

纸基 ELISA 方法主要创新点在于用功能化处理过的纸代替传统的 96 孔板,将免疫反应的载体换成了

收稿日期:2020-06-08;修回日期:2021-05-20.

基金项目:国家科技重大专项(2017ZX09304026)

作者简介(通信作者):林虹君(1981—),男,山东菏泽人,博士,研究方向为蛋白质组学和药物分析,E-mail:13718007858@163.com.

纸.该方法的突出优点是:所需样本量少,检测成本低,可用于户外即时检测,适用于军事和人道主义野外援助等.纸基 ELISA 的工作流程与传统 ELISA 相似,通过抗原与抗体结合,再加入连接酶标抗体显色,根据反应颜色的深浅来定性或定量待测物.

1.2 纸基 ELISA 对大肠杆菌的检测

目前对大肠杆菌的检测方法主要是聚合酶链式反应(PCR)^[16-18],由于 PCR 方法的诸多限制(如,内质控、阴性和阳性质控),PANG 团队^[19]研发了纸基 ELISA 法,用于大肠杆菌检测,该方法具有操作时间短、成本低、灵敏度高等特点.具体步骤如下:首先用壳聚糖和戊二醛对纸进行预处理(为了提高细菌固定效率),然后裁剪成长 2 cm、宽 1.5 cm 的纸片.在处理过的滤纸上加入 5 μL 样品,随后在室温下干燥.再加入质量分数 10% BSA(牛血清白蛋白)封闭,干燥 10 min.其次,加入 5 μL 的大肠杆菌抗体,孵育 10 min,用 PBS(磷酸盐缓冲液)冲洗掉过量的抗体.干燥 10 min 后,用 5 μL 辣根过氧化物酶(HRP)结合的二级抗体孵育 10 min,如前所述方法再次洗涤和干燥.最后,加入 5 μL 四甲基联苯胺过氧化氢(TMB- H_2O_2)显色.结果表明,该方法能成功对大肠杆菌进行检测,检测限达到了 1×10^4 CFU/mL.该方法基于视觉检测,简化了显色步骤,扩大了应用范围.由于该方法检测成本低、检测速度快,且对检测环境要求不高,因此,可广泛应用于农村等欠发达地区.

在这方面做出贡献的还有 SHIH 团队^[20],他们研制了一种基于比色平台检测大肠杆菌纸基 ELISA 法.具体如下:通过悬浮大肠杆菌制备供试品,将大肠杆菌活性细胞接种到 5 mL 的 Luria-Broth(LB)培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 过夜,250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下摇匀.不断调整 LB 培养基的体积,直到吸收率达到 600 nm 定为 1,然后连续稀释 10、100、1 000、10 000 倍,共制备了浓度不同的样品:“对照”、0 cells/mL、 1×10^5 cells/mL、 1×10^6 cells/mL、 1×10^7 cells/mL、 1×10^8 cells/mL 和 1×10^9 cells/mL.用质量分数 1% 的 BSA 封闭 1 h,用 200 μL 体积分数 0.05% 的磷酸盐缓冲液 20 洗涤,然后用 20 μL 辣根过氧化物酶结合的链霉亲和素孵育 1 h,接下来用营养液培养 120 s.对纸在 40 s、80 s 和 120 s 分别拍照,整个过程在 5 h 内完成.该方法反应颜色较强,灵敏度达 10^5 CFU/mL,而且无须昂贵设备.不过,该方法对实际的临床尿液样本检测还有待验证.

2 纸基微流控装置

2.1 纸基微流控原理

微流控是一种在微纳米尺度空间对微流体进行精确操控的科学技术.微流控具有将生物、化学等实验室的基本功能(诸如样品制备、反应、分离和检测等)缩微到一个几平方厘米芯片上的能力,其基本特征和最大优势是多种单元技术在整体可控的微平台上灵活组合,且规模集成.纸基微流控就是用选定的纸实现传统芯片中的部分功能,以达到同样的检测目的^[21-23].

2.2 纸基微流控对目标蛋白的检测

微流控检测设备具有体积轻巧、样品及试剂量少、能耗低、反应速度快等诸多优点,但是价格较高,阻碍了其广泛应用.为了解决这一问题,VERMA 团队^[24]研制了一种基于三维微流体的纸基分析装置.该装置由两部分组成:滑动条(用纸做成,包含主动传感区域)和滑动条周围的结构(包含缓冲剂、抗体、酶底物等区域).纸基滑动条微流控装置可以很容易地形成三维微流控通道,有助于将流体样品分布到密排试验中,适用于低成本的即时诊断.整个装置重量轻、体积小,比微流控装置更容易运输.纸基滑动条微流控装置成功应用于 C 反应蛋白的检测,结果显示,该方法对新生儿败血症和盆腔炎症疾病的 C 反应蛋白的准确率较高.此外,成本低也是该方法的一大优势.不过,该检测方法的准确性还有待提高.

WANG 团队^[25]将微流控纸基检测装置的简易性和低成本,与化学发光 ELISA 的敏感性和选择性相结合,设计了一种新型的纸基微流控——ELISA 新装置.该装置具有批量分析、快速、稳定和可重复使用等优点.具体流程如下:首先,将抗原溶于 PBS 中,添加到纸的相应区域,孵化 150 s 后,清洗两次.然后,将 HRP 标记过的信号抗体添加到相应的纸区,孵育 210 s,洗涤两次.最后,进行显色反应.在最佳条件下,该方法对不同浓度的 α -甲胎蛋白、癌抗原 125 和癌胚抗原三种肿瘤标志物进行检测,信噪比为 3 时检测限分别是 0.06 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.33 U/mL 和 0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$,而 3 种肿瘤标志物在临床诊断中的临界值分别为 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、35 U/mL

和 $5 \mu\text{g/L}$ 。因此,该方法的灵敏度和线性范围完全可以满足临床诊断中检测的要求。本方法具备纸基检测装置的简便性和低成本优势,同时还具备化学发光 ELISA 方法的高敏感性和高选择性的优点。该方法可用于实际样本检测,尤其适用于偏远地区、发展中国家或设备简陋的实验室。

在此领域做出贡献的还有 MA 团队^[26],他们用自研发的纸基微流体 ELISA 成功对牛奶中的克仑特罗进行快速检测。克仑特罗是 β 兴奋剂的一种^[27],可促进动物体蛋白质沉积,促进脂肪分解抑制,提高胴体的瘦肉率。长期食用残留克仑特罗的食品,可能引起人体四肢、面部、颈部骨骼肌震颤,并导致内分泌紊乱。文献^[26]采用加热到一定温度使纸上的蜡均匀熔化形成疏水屏障,以增强抗体在纸上的固定率和牢固程度。然后用壳聚糖和戊二醛对纸进一步功能化修饰,以增强纸张的湿强度和抗体的固定化率。结果表明,新方法检测限可达 $0.2 \mu\text{g/L}$,总检测时间约为 1 h,真正达到了便携、低成本、快速、灵敏的要求。此外,该方法对抗原抗体的溶出量较低,这对乳品工业来说,是一种经济有效、快速的检测技术。因此,本方法对食品中化学危害品检测具有明显的优势和潜力。在本领域做出贡献的还有 KONG^[28],LIU^[29],LAN^[30]等研究团队。

3 纸基传感器

3.1 纸基传感器原理

传感器是把某个待测物理量转换成另外一个易测的物理量(如电信号),以便于观察、测量或处理的装置。比如离子烟感探测器,用于探测烟雾,当烟雾达到一定的浓度时,给出对应的数字信号并发出声光报警信号。纸基传感器就是用纸来代替原传感器的信号收集、传导的载体,进而实现与原有载体产生同样的、甚至更好的效果,同时具备价格更低、准确性更高等优点^[31-33]。

3.2 纸基湿度传感器

目前监测呼吸的设备大多较为笨重,携带不方便,且价格相对较高,这就限制了其在普通人员中的普及和应用。文献^[34]报道了一种纸基湿度传感器,利用纸张的可逆吸湿特性(即纸张的吸附及解吸附水的性质),通过将吸入和呼出气体引起的湿度变化转换成电信号来测量呼吸模式和呼吸速率。纸张的离子导电率与纸纤维表面的水量多少有关,所以可根据呼吸引起的离子导电率变化来监测呼吸。当呼气时,人的呼吸增加了传感器上的水量,从而增加了传感器的离子导电性。当吸气时,由于周围的空气几乎总是比呼出的空气相对湿度低,纤维表面的水分减少。吸附水量的这种变化直接影响传感器的离子导电性,而离子导电性可以通过电子设备进行测量,并将此数据传送到智能手机或平板电脑进行后处理。同样利用可逆原理的还有 KASSAL 团队^[35]提出的可逆钾离子监测,该方法不仅简单、成本低,而且能够在纸载体上实现完全可逆的传感特性,可检测出样品中的钾离子浓度范围是 $10^{-4} \sim 10^{-1} \text{ mol/L}$ 。WU 等^[36]采用干浸镀法自组装了一个简单、灵敏、快速、高电导率的纸基生物监测传感器,并在牛奶样品中成功检测到抗生素残留。具体步骤如下:首先将质量浓度为 3 g/L 的羧基化单壁碳纳米管通过超声波分散在聚-4-苯乙烯磺酸钠水溶液中,该溶液是一种高效、生物相容性好、适用于碳纳米管分散的蛋白质稳定剂。然后将按饱和和硫酸铵法纯化的抗新霉素抗体加入到前面分散好的碳纳米管溶液中,抗体与单壁碳纳米管的重量比约为 $1:2000$,30 min 后,将尺寸为 $4 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的纸浸入该溶液中,在真空冷冻干燥以减少抗体的变性。用该纸载免疫传感器对牛奶中氨基糖苷类抗生素残留进行检测分析,结果显示检测限低至 $0.04 \mu\text{g/L}$,线性检测范围宽至 $0.2 \sim 125 \mu\text{g/L}$,且具有高特异性。此外,该传感器还具有成本低、易大批量生产等优点。该方法的成功,也为其他抗生素的检测以及多种抗生素同时分析提供了参考。在此领域做出贡献的还有 KHAN^[37]和 WANG^[38]。

4 纸基与荧光检测的结合

4.1 荧光检测原理

某些化学物质从外界吸收并储存能量进入激发态,当其从激发态回到基态时,过剩的能量以电磁辐射的形式发射出来,称之为荧光。溶液的荧光发射强度由荧光物质的荧光效率、溶液的吸光程度和液层厚度共同决定,在特定频率特定光强的照射下,且当溶液种类固定时,溶液的浓度与其产生的荧光强度近似成正比关系,因此根据荧光的强度即可推断出溶液的浓度。

4.2 纸基荧光检测

WU 团队^[39]提出了纸基荧光器件,用于医疗系统的外诊断。由于基于纸基荧光检测具有高灵敏度和高选择性,近年来受到广泛关注。由于许多疾病与蛋白质的高/低存在有关,因此对这些蛋白质的快速定量检测在临床诊断中非常重要,纸基荧光器件在这方面显示出巨大的潜力。例如,该团队描述了一种检测 β -D-半乳糖苷酶的荧光分析方法。该反应装置包含 1 个内部流体电池,表面安有 LED 显示,一段 2 mm 的透明吸管作为反应器。产生的可见荧光被转换成数字信号,然后使用图像处理软件进行形象化展示。

CAI 团队^[40]报道了一种基于颜色渐变的荧光试纸传感器,通过在滤纸上打印三色探针,实现了对人尿中 Cu^{2+} 的快速、可视化监测。三色探针由蓝色发射碳点(bCDs)、绿色发射量子点(gQDs)和红色发射量子点(rQDs)组成,其原理是 gQDs 和 rQDs 的荧光同时被 Cu^{2+} 猝灭,而作为可光内标的 bCDs 对 Cu^{2+} 不敏感。加入不同量的 Cu^{2+} 后,三色探针的比色荧光强度不断变化,随着 Cu^{2+} 浓度的增加,测试纸颜色依次从浅粉色、浅三文鱼色、深橙色、橄榄色、深橄榄绿、板岩蓝、皇家蓝,最终再到深蓝色,检测限为 1.3 nm,明显低于 6.0 nm 的内标剂量。该检测试纸简单、快速、价格低廉,可作为人体尿液内源性 Cu^{2+} 超灵敏监测的可视化平台。该宽色差荧光试纸传感器的剂量依赖性和可视性分析的优点包括:(1)构建三色探针非常简单,避免了 CDs 与量子点共价键合的复杂制备过程;(2)与其他分析技术相比,方便了非专业操作人员的操作;(3)三色探针提供了丰富而广泛的色差。

5 纸基核酸检测

5.1 核酸检测原理

核酸检测作为一种分子诊断技术,包括核酸的提取、扩增和检测,在医学诊断领域作用显著。但该技术需要相对高端的仪器设备、熟练的技术人员,且耗时较长。因此迫切需要研发一种快速、便携、价格低廉的核酸检测诊断工具。鉴于此,纸基核酸检测的思路应运而生,该方法将核酸检测的 3 个步骤集成到 1 个基于纸张的平台上,以实现快速诊断^[41-43]。

5.2 纸基核酸检测的应用

在核酸的提取、扩增和检测三个步骤中,扩增至关重要,由于目标核酸浓度较低,现有技术通常无法检测到提取的核酸^[44]。目前广泛使用的核酸扩增技术是 PCR,但是该技术需要实验空间、稳定的电力、昂贵的设备和专业的人员,这些特点限制了其在低资源地区的适用性。因此,需要一种低成本的核酸扩增技术代替 PCR 来完成核酸检测任务。纸作为一种多孔材料,能够以干燥的形式储存热稳定的试剂,这为纸基核酸检测仪的研发提供了可能。将重组酶聚合酶扩增技术与纸质设备相结合,并在纸基设备中存储和混合试剂。由于重组酶聚合酶扩增技术具有简便、快速的特点,而且其不依赖于温度,而是依赖于酶的催化反应过程,因此更适合在低资源环境下实现。GAO 等^[45]提出三维纳米金信号放大策略,实现了对核酸的超灵敏纸基检测。首先,采用柠檬酸还原法制备纳米金(AuNPs),用于合成核酸功能化 AuNPs。链霉亲和素通过静电吸附方法涂覆在 AuNPs 表面。当目标出现时,分析物被夹在 DNA 探针和附着在 AuNPs 表面的检测 DNA 探针之间,形成了由 AuNPs 和 DNA 组成的三维网络,随着液体的不断迁移,在控制线上形成红色带。当试验线和对照线上出现两条红色带时,结果为阳性,当只有对照线出现时,结果为阴性。此外,测试线上的信号可由便携式读条器量化。

6 纸基检测技术的特点与不足

6.1 特点

纸基检测方法作为一种新兴的检测手段,拥有诸多传统方法不可比拟的优势。

(1)制备简便。对纸进行功能化修饰后即可进行后续的操作,由于在纸表面连接多种官能团相对容易,条件容易达到,因此整个制备过程相对简便。

(2)适用广泛。纸基检测方法不需要电源和其他用电配套设备,所以,该方法适用于多种户外环境。

(3)成本低。纸基检测方法的所需材料均为实验室常用耗材,不需要特殊购置,相对各种成品试剂盒的价

格更为低廉.

(4)节省样本.由于检测反应在纸表面进行,反应充分,不浪费试剂.

(5)灵敏度高.由于纸基检测相对试剂盒而言属于表层反应,不存在深层位阻,所有反应几乎同时进行,因此灵敏度更高,信号更强.对于某些裸眼可视化检测,效果更加明显.

6.2 不足

纸基检测设备在生物样本检测、临床诊断等复杂情况下具有强大的分析能力,但对超低浓度待测样本检测时,纸基检测设备不是首选方法.

(1)由于纸纤维的阻挡作用,使得待测样本顺利通过纸基检测仪的流动性降低.

(2)由于纸基设备的设计和制造还处于起步阶段,各技术水平参差不齐,指标参数也没有很好的统一.

(3)纸吸水性、均热性还不够稳定,易受环境干扰,导致重复性不够好.

除此之外,在纸上制作微通道时,疏水屏障(通常使用蜡或烷基烯酮二聚体)显示疏水性,仅对表面张力大于临界值的液体渗透有阻碍作用,对于表面张力低于临界值的待测液则易发生泄漏,导致微通道短路.

7 总结与展望

纸基检测技术因其便携化、易操作、低成本等优势而备受关注,近年来得到了快速发展,并在科学理论和实际应用方面都呈现出广阔的发展空间.纸基检测技术重复性较好,检测限可以被接受,具有很强的应用价值.为发展中国家科研团队及室外科研提供了可能,大大拓宽了传统方法的应用领域.可以预见,随着基础理论研究和实验技术的不断发展,优化后的纸基检测方法将会在蛋白质检测、生物标志物筛查和临床诊断研究中发挥越来越重要的作用,也必将极大地推动纳米材料科学、生物化学及生物免疫技术的发展.

作者贡献:林虹君与张爱红对本文有同等贡献.

参 考 文 献

- [1] FUKUDA N, TANAKA H, SHOYAMA Y. Applications of ELISA, Western blotting and immunoaffinity concentration for survey of ginsenosides in crude drugs of *Panax* species and traditional Chinese herbal medicines[J]. *Analyst*, 2000, 125(8): 1425-1429.
- [2] CHO J H, HAN S M, PAEK E H, et al. Plastic ELISA-on-a-chip based on sequential cross-flow chromatography[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(3): 793-800.
- [3] BOONROD K, ROTH B, LEONG NGAR S, et al. Analysis of the effectiveness of reused primary and secondary antibodies in Western blotting analysis[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 397(1): 124-125.
- [4] CHO E, KIM C, KOOK J K, et al. Fabrication of electrospun PVDF nanofiber membrane for Western blot with high sensitivity[J]. *Journal of Membrane Science*, 2012, 389: 349-354.
- [5] VÁZQUEZ M E, NITZ M, STEHN J, et al. Fluorescent caged phosphoserine peptides as probes to investigate phosphorylation-dependent protein associations[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(34): 10150-10151.
- [6] LI H L, TIAN J Q, WANG L, et al. Multi-walled carbon nanotubes as an effective fluorescent sensing platform for nucleic acid detection [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(3): 824-828.
- [7] LIU H Y, MALHOTRA R, PECZUH M W, et al. Electrochemical immunosensors for Antibodies to Peanut Allergen Ara h2 Using Gold Nanoparticle-Peptide Films[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(13): 5865-5871.
- [8] MUNGE B S, KRAUSE C E, MALHOTRA R, et al. Electrochemical immunosensors for Interleukin-6. Comparison of Carbon Nanotube Forest and Gold Nanoparticle platforms[J]. *Electrochemistry communications*, 2009, 11(5): 1009-1012.
- [9] TANG J, TANG D P, SU B L, et al. Enzyme-free electrochemical immunoassay with catalytic reduction of p-nitrophenol and recycling of p-aminophenol using gold nanoparticles-coated carbon nanotubes as nanocatalysts[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26(7): 3219-3226.
- [10] CHENG C M, MARTINEZ A W, GONG J L, et al. Paper-based ELISA[J]. *Angewandte Chemie*, 2010, 122(28): 4881-4884.
- [11] KIM S, KIM D, KIM S. A rapid real-time quantification in hybrid paper-polymer centrifugal optical devices[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2019, 126: 200-206.
- [12] CAI Y Q, YOU J H, YOU Z Y, et al. Profuse color-evolution-based fluorescent test paper sensor for rapid and visual monitoring of endog-

- enous Cu^{2+} in human urine[J].Biosensors and Bioelectronics,2018,99:332-337.
- [13] BELL J G, MOUSAVI M P S, ABD EL-RAHMAN M K, et al. Paper-based potentiometric sensing of free bilirubin in blood serum[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2019, 126: 115-121.
- [14] HILLSCHER L M, LIEBICH V J, AVRUTINA O, et al. Functional paper-based materials for diagnostics[J]. Chemtexts, 2021, 7(2): 1-22.
- [15] ZHU P H, KUANG Y D, WEI Y, et al. Electrostatic self-assembly enabled flexible paper-based humidity sensor with high sensitivity and superior durability[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 404: 127105.
- [16] MURGIA M, RUBINO S, WAIN J, et al. A novel broadly applicable PCR-RFLP method for rapid identification and subtyping of H58 *Salmonella* Typhi[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 127: 219-223.
- [17] YONOGI S, KANKI M, OHNISHI T, et al. Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the *Clostridium perfringens* enterotoxin-encoding genes cpe and becAB[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 127: 172-175.
- [18] DOLLHOFFER V, CALLAGHAN T M, DORN-IN S, et al. Development of three specific PCR-based tools to determine quantity, cellulytic transcriptional activity and phylogeny of anaerobic fungi[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 127: 28-40.
- [19] PANG B, ZHAO C, LI L, et al. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157:H7 detection[J]. Analytical Biochemistry, 2018, 542: 58-62.
- [20] SHIH C M, CHANG C L, HSU M Y, et al. Paper-based ELISA to rapidly detect *Escherichia coli*[J]. Talanta, 2015, 145: 2-5.
- [21] SANTANGELO M F, LIBERTINO S, TURNER A P F, et al. Integrating printed microfluidics with silicon photomultipliers for miniaturised and highly sensitive ATP bioluminescence detection[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 99: 464-470.
- [22] JING T Y, RAMJI R, WARKIANI M E, et al. Jetting microfluidics with size-sorting capability for single-cell protease detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 66: 19-23.
- [23] CHEN Y Q, MENG X R, ZHU Y Z, et al. Rapid detection of four mycotoxins in corn using a microfluidics and microarray-based immunoassay system[J]. Talanta, 2018, 186: 299-305.
- [24] VERMA M S, TSALOGLOU M N, SISLEY T, et al. Sliding-strip microfluidic device enables ELISA on paper[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 99: 77-84.
- [25] WANG S M, GE L, SONG X R, et al. Paper-based chemiluminescence ELISA: lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2012, 31(1): 212-218.
- [26] MA L Y, NILGHAZ A, CHOI J R, et al. Rapid detection of clenbuterol in milk using microfluidic paper-based ELISA[J]. Food Chemistry, 2018, 246: 437-441.
- [27] KABIRAZ D C, MORITA K, SAKAMOTO K, et al. Highly sensitive detection of clenbuterol in urine sample by using surface plasmon resonance immunosensor[J]. Talanta, 2018, 186: 521-526.
- [28] KONG Q K, WANG Y H, ZHANG L N, et al. Highly sensitive microfluidic paper-based photoelectrochemical sensing platform based on reversible photo-oxidation products and morphology-preferable multi-plate ZnO nanoflowers[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 110: 58-64.
- [29] LIU C C, WANG Y N, FU L M, et al. Microfluidic paper-based chip platform for benzoic acid detection in food[J]. Food Chemistry, 2018, 249: 162-167.
- [30] LAN F F, SUN G Q, LIANG L L, et al. Microfluidic paper-based analytical device for photoelectrochemical immunoassay with multiplex signal amplification using multibranching hybridization chain reaction and PdAu enzyme mimetics[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 79: 416-422.
- [31] MOHAMED M A, EL-GENDY D M, AHMED N, et al. 3D spongy graphene-modified screen-printed sensors for the voltammetric determination of the narcotic drug codeine[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 101: 90-95.
- [32] SONG C M, LI J W, LIU J X, et al. Simple sensitive rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples by label-free immunofluorescence strip sensor[J]. Talanta, 2016, 156: 42-47.
- [33] LIU T, CHEN X H, MA Z, et al. A Cu(I)-sensing ArsR family metal sensor protein with a relaxed metal selectivity profile[J]. Biochemistry, 2008, 47(40): 10564-10575.
- [34] GÜDER F, AINLA A, REDSTON J, et al. Paper-based electrical respiration sensor[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55(19): 5727-5732.
- [35] KASSAL P, SIGURNJAK M, STEINBERG I M. Paper-based ion-selective optodes for continuous sensing: Reversible potassium ion monitoring[J]. Talanta, 2019, 193: 51-55.
- [36] WU X L, KUANG H, HAO C L, et al. Paper supported immunosensor for detection of antibiotics[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 33(1): 309-312.
- [37] KHAN M S, MISRA S K, DIGHE K, et al. Electrically-receptive and thermally-responsive paper-based sensor chip for rapid detection of bacterial cells[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 110: 132-140.

- [38] WANG Y, XU H R, LUO J P, et al. A novel label-free microfluidic paper-based immunosensor for highly sensitive electrochemical detection of carcinoembryonic antigen[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 83: 319-326.
- [39] WU M R, LAI Q Y, JU Q, et al. Paper-based fluorogenic devices for *in vitro* diagnostics[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 102: 256-266.
- [40] CAI Y Q, YOU J H, YOU Z Y, et al. Profuse color-evolution-based fluorescent test paper sensor for rapid and visual monitoring of endogenous Cu²⁺ in human urine[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 99: 332-337.
- [41] ZHAN S S, WU Y G, WANG L M, et al. A mini-review on functional nucleic acids-based heavy metal ion detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 86: 353-368.
- [42] DENG H M, GAO Z Q. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 853: 30-45.
- [43] MICKLITSCH C M, OQUARE B Y, ZHAO C, et al. Cyclopentane-peptide nucleic acids for qualitative, quantitative, and repetitive detection of nucleic acids[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(1): 251-257.
- [44] CHOI J R, TANG R H, WANG S Q, et al. Paper-based sample-to-answer molecular diagnostic platform for point-of-care diagnostics[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 74: 427-439.
- [45] GAO Y, DENG X L, WEN W, et al. Ultrasensitive paper based nucleic acid detection realized by three-dimensional DNA-AuNPs network amplification[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 92: 529-535.

Research progress of paper-based detection methods

Lin Hongjun¹, Zhang Aihong², Li Gaowei¹, Liu Zhibing¹, Liu Jing¹

(1. Unit 32311 of PLA, Beijing 102112, China; 2. Institute of Chemical Defense of PLA, Beijing 102205, China)

Abstract: With the development of modern detection technology which is simple, fast and low cost, various detection methods based on paper came into being. As a new testing carrier, paper not only can meet the basic requirements of traditional testing methods, but also has the advantages of convenience, low cost, short testing time, suitable for outdoor and developing countries' laboratory needs. So in recent years, it has developed rapidly in various testing fields. In this paper, the application of paper in enzyme-linked immunosorbent assay, microfluidic detection, electrical sensor, fluorescence detection, nucleic acid detection and other methods are reviewed. The shortcomings of paper-based detection methods are also reviewed. The application prospect of this new idea in protein detection, biomarker screening and clinical diagnosis is also prospected.

Keywords: paper; sensor; ELISA; microfluidic; nucleic acid detection

[责任编辑 刘洋 杨浦]