

分析测试

纸基微流控芯片在癌症标志物检测中的研究进展

程菲¹, 李明^{2,3,4}, 张友航^{1,3}, 吕昭锦¹, 张甜^{1,2,3,4*}

(1. 武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 湖北 武汉 430000;

2. 武汉理工大学资源与环境工程学院, 湖北 武汉 430000;

3. 武汉理工大学三亚科教创新园, 海南 三亚 572000;

4. 武汉理工大学绍兴高等研究院, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 综述了用于癌症标志物检测的分析方法, 包括比色法、荧光法和电化学法, 详细探讨了纸基微流控芯片在其中的应用研究, 讨论了其面临的挑战, 同时对该领域未来的发展方向进行了展望。

关键词: 癌症标志物; 纸基微流控芯片; 分析方法

中图分类号: R73.9; TP18

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2025)03-0254-06

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2025.03.045

Progress on application of paper-based microfluidic chips in detecting cancer biomarkers

CHENG Fei¹, LI Ming^{2,3,4}, ZHANG You-hang^{1,3}, LV Zhao-jin¹, ZHANG Tian^{1,2,3,4*}

(1. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430000, China; 2. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430000, China; 3. Sanya Science and Education Innovation Park, Wuhan University of Technology, Sanya 572000, China; 4. Shaoxing Institute of Advanced Research, Wuhan University of Technology, Shaoxing 312000, China)

Abstract: Cancer biomarkers detection shows great potential in the early screening diagnosis and prognosis of cancer. Analytical methods for detecting cancer biomarkers are reviewed, including colorimetry, fluorescence, and electrochemical methods. The research on application of paper-based microfluidic chips in detecting cancer biomarkers is introduced in detail, and the challenges faced in this field are discussed. The prospects of development direction in this field in the future are also outlined.

Key words: cancer biomarker; paper-based microfluidic chips; analysis method

癌症在世界范围内普遍存在, 是导致人类死亡的主要原因之一。通过进行癌症的早期筛查, 可以有效地降低癌症死亡率^[1]。目前, 检测癌症的主要方法有影像学检查、病理学检查、血液学检查等, 但是这些方法都需要昂贵的设备和经过专业培训的人员。影像学检查可以提供准确的癌症病变部位, 但是该方法会对患者造成辐射暴露, 增加患癌风险^[2]。病理学检查虽然准确率高, 但是耗时较长, 而且通常需要在无尘无菌的手术室进行组织取样^[3]。血液学检查具有微创、经济等优点, 血液中包含了全身的信息, 然而, 炎症、自身免疫疾病等非癌症疾病也可能导致血液学检查中标志物的升高, 从而影响对癌症的诊断^[4]。因此, 传统的诊断方法

在癌症的早期诊断方面还存在不足。

微流控芯片是一种体积小、重量轻且具有高集成度的器件, 经过精细加工后, 可以将制备、反应、分离、检测等各个功能部件集成于微米级尺度, 完成从添加样品到读取结果的全过程实验分析。根据样品流动的动力可以将微流控芯片分为主动设备和被动设备, 主动微流体设备需要外加泵使流体通过通道, 而被动微流体装置借助通道的物理特性来实现自驱动。在被动微流体系统中, 基于纸张的微流控芯片是最有前途的系统之一^[5]。美国哈佛大学 Whitesides 研究组于 2007 年提出了纸基微流控芯片 (paper-based microfluidic analytical devices, μ PAD) 的概念^[6]。纸基微流控芯片是一种由纸或其他多

收稿日期: 2024-06-07; 修回日期: 2024-12-30

基金项目: 国家中组部“千人计划”青年项目(40127002); 三亚崖州湾科技城海南专项博士研究生科学研究基金项目(HSPHDSRF-2022-03-024)

作者简介: 程菲(2000-), 女, 硕士生; 张甜(1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向为电化学传感器及新型绿色生物能源技术的开发, 通讯联系人, tzhang@whut.edu.cn。

孔膜制成的检测设备,可通过毛细作用控制微量流体。与传统微流控设备不同,纸基设备无需洁净室设施即可轻松制造,由廉价且易得的材料制成,并且不需要计算机控制的泵即可运行。因此,纸基微流控技术更容易被研究人员高度关注。本文中主要综述了 μ PAD及其在癌症标志物检测方面的研究进展,重点对基于比色法、荧光法和电化学法的癌症标志物检测方法进行了总结,并探讨了该领域的未来发展和所面临的挑战。

1 纸基微流控芯片的概述

1.1 纸基微流控芯片的定义

一般来说,纸是由压制的纤维交织制成的柔性片材。在纸基微流控的背景下,纸被更广泛地定义为通过毛细管作用吸走流体的多孔膜。自19世纪以来,从最初的石蕊试纸开始^[7],纸一直被用作分析测定的平台。最常见的2种多孔膜为纤维纸和硝酸纤维素膜。纤维纸具有亲水性,而硝酸纤维素膜与蛋白具有很强的结合性,并且还有许多其他具有各种物理和化学特性的多孔膜类型,可以用于开发纸基微流体设备。

μ PAD是一种利用纸质材料制成的微流体系统,结合微流体学和纸张的吸附特性进行液体操控和化学反应,用于样品的处理、分析和检测。 μ PAD通常以纤维纸或其他吸水性纸张为基础材料,通过设计微通道、化学处理区域和检测区域,实现对样品的控制、混合和反应。其中,纸片作为基底,具有传输样品、样品处理和检测的功能,通过纸张的毛细吸附和传递性质,实现了微量液体的精确操控。 μ PAD具有多个优点,由于纸张本身具有毛细效应,可以引导试剂流动,因此不需要额外的电源。另外,纸张尺寸小,体积小,易于运输和储存。并且,由于它比其他合成材料更容易降解,减少了对材料使用的环境限制,更加环保。因此,在即时诊断、环境监测和生物分析等生物医学领域被广泛应用。

1.2 纸基微流控芯片的材料

在制造 μ PAD时,纸基材料的设计和制备发挥着决定性的作用。目前,生产纸质芯片主要使用如下3种纸基材料,包括滤纸^[8]、硝酸纤维纸^[9]和玻璃纤维纸^[7]。它们各自具有独特的特性和应用,可以单独使用或与其他材料结合以实现整体功能。例如,滤纸的吸水性好且易获得,具有较高的机械稳定性和拉伸强度,适用于各类纸基传感器,是应用最为广泛的纸基材料。硝酸纤维纸的成本较高,但能结

合和固定蛋白质,适用于作胶体金反应的试纸。玻璃纤维纸性能稳定,不易断裂,耐高温耐腐蚀,适用于基于化学反应的检测。通常需要根据不同的检测要求选择不同类型的纸张。

2 基于纸基微流控芯片的癌症标志物检测方法

2.1 基于比色法的纸基微流控芯片

比色法通常是基于检测系统的颜色变化,由于目标分析物与着色试剂之间发生化学或生化反应,因此可以获得定性和定量测量值。比色法的优势在于不需要依赖复杂的外部检测系统,仅通过肉眼即可进行读取^[10]。比色法的灵敏度通常较低,而金纳米颗粒(AuNPs)具有良好的光学特性、可控合成和易于表面共轭等优点,因此,AuNPs已被广泛用于比色检测以提高测定的灵敏度。Appidi等^[11]研发了一种基于原位形成金纳米颗粒的无标记比色技术,用于宫颈癌的定性筛查。该技术显示出96%的高灵敏度和87%的高特异性,检测时间不到1 min,在宫颈癌的即时检测和临床筛查方面显示出巨大的潜力,这也是金纳米粒子首次被应用于宫颈癌的比色筛查方法中。Kumar等^[12]开发了一种纸基微流体比色装置,用于检测与糖尿病、肾病和心脏病等多种疾病相关的尿酸。在该微流体装置中,带正电的AuNPs用于促进变色底物和 H_2O_2 之间的反应,产生清晰的颜色变化。结果发现,比色法可以检测浓度低至8.1 mg/mL的尿酸。然而,通过肉眼观察的纸基比色传感器通常只能进行定性测量,并且在进行颜色深浅的读取时存在较大误差。而将比色法与智能设备结合,能够将颜色分析转换为定量测量,并减小因读数造成的人为误差。Lei等^[13]开发了一种基于AuNPs的比色免疫测定芯片,使用AuNPs进行信号放大。免疫测定结果由反应孔上的颜色强度表示,可以用普通相机检测或肉眼观察。这种检测方法不需要任何复杂的光学系统,可直接读取结果。因此,可以将其小型化并集成到微流控系统中,用于开发便携式免疫测定设备。

智能手机不仅可以用来采集图像,还能进行图像分析,直接读取数据。Aydingogan等^[14]以甲胎蛋白(AFP)和黏蛋白(MUC16)为模型分析物,开发了一种用于检测癌症生物标志物的新型斑点状纸基检测传感器,使用智能手机图像分析AuNPs表面的颜色变化,使平台自动化并提供便携的分析。然而,该方法中智能手机仅作为图像捕获工具,还需要人为

使用图像编辑软件进行结果的分析与读取,没有充分利用智能手机的程序处理模块以及显示组件,在智能手机内部开发设计特定的应用程序可以实现自动检测。Wang 等^[15]开发了一种蜡印多层 μ PAD,用于癌胚抗原(CEA)的比色检测(图 1)。当用手机拍照时,该装置会自动进行颜色分析,并使用开发的应用程序计算 CEA 浓度。该平台还经过了临床样本测试,检测 CEA 的灵敏度高达 98%,可应用于资源有限的实验室和偏远地区的敏捷测试。通过改变该技术所采用的试剂,还可以将该方法扩展应用到其他生物分子、病毒和蛋白质的定量检测。尽管比色法应用广泛,发展前景广阔,但实际应用仍存在一些挑战,如背景干扰、意外预处理、重现性低、检测灵敏度不足等。

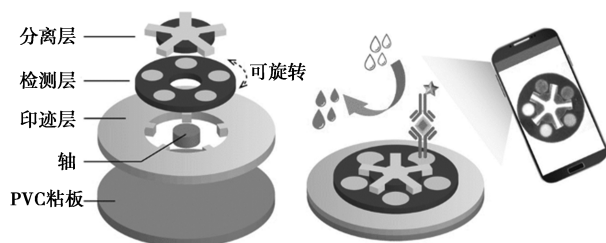


图 1 基于智能手机的比色法纸基微流控

2.2 基于荧光法的纸基微流控芯片

荧光检测是一种非接触式检测方法,荧光团吸收特定波长区域的能量后,在其他波长区域重新发射能量,因此可以产生不同颜色的荧光,进行可视化结果分析。此外,通过测量能级转变期间发射光的荧光信号,可以对分析物进行定量分析。此外,荧光检测法在检测过程中减少了来自样品的干扰。将荧光检测技术与纸基微流控技术相结合,不仅可以降低成本,还能提高检测灵敏度。Jiao 等^[16]基于折纸原理开发了一种新型的三维垂直流动纸基传感器,将异硫氰酸荧光素标记的抗体放置在分裂层上,将小鼠单克隆捕获抗体放置在检测区(图 2),通过夹心型荧光免疫测定法,可同时检测人血清中的癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)和癌抗原 199(CA199)3 种癌症标志物。

传统的化学染料分子通常具有较差的化学稳定性和光稳定性^[17],相比而言,量子点具有可调谐的荧光特征、窄发射光谱、更亮的发射和良好的光学稳定性等优点,使用量子点作为荧光探针有助于提高测定的灵敏度。此外,由于量子点具有宽吸收光谱和窄光致发光光谱,不同尺寸的多色量子点可以由单一激发波长同步照射,产生多种颜色的荧光信号,

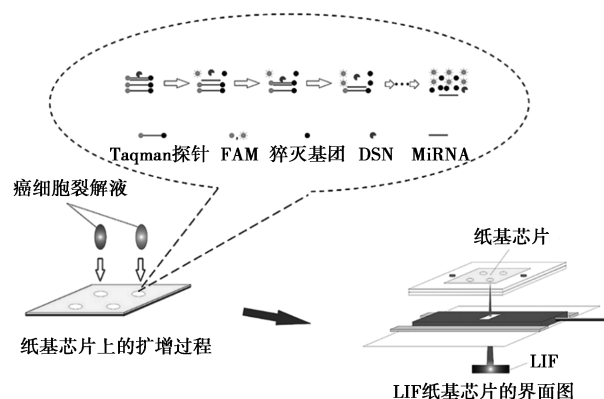


图 2 基于 LIF 的 3D 垂直流动纸基芯片

可以实现癌症标志物的多重检测。Hu 等^[18]使用水相合成的 CdTe/CdS 量子点作为荧光信号放大器,开发了一种用于癌症生物标志物多重检测的微流控蛋白芯片。将二抗偶联到发光的 CdTe/CdS 量子点上作为荧光探针,显示出极低的检测限和极宽的线性范围。Tian 等^[19]开发了一种基于 T 形双链体结构的微流控纸基荧光传感器器件,用于检测细胞表面的 miRNA-21 和叶酸受体(FR)。MnO₂ 对荧光团标记的单链 DNA 表现出优异的猝灭能力,通过 T 型双链体结构的动态自组装实现了癌症中 2 种生物标志物的同时检测。该装置对于 miRNA-21 的检测限为 0.003 3 fmol/L,对于 FR 具有 0.667 ng/mL 的检测限。总而言之,使用量子点作为荧光探针可以有效识别不同类型的癌细胞,显示出极大的应用前景。

激光诱导荧光(laser-induced fluorescence, LIF)检测是一种特殊的荧光检测模式^[20],与其他商用荧光仪器相比,LIF 检测器具有超高灵敏度,可检测不同形态(固体、液体或气体)的样品。此外,LIF 仪器体积小、价格便宜且便于携带,非常适合与纸基传感器结合进行检测。然而,当检测器施加在 μ PAD 上时,LIF 探测器的光电倍增管长时间暴露在纸张的反射光下会产生疲劳,导致 LIF 信号不稳定。为解决这个问题,Cai 等^[21]开发了一种配备 μ PAD-LIF 接口的激光诱导荧光(LIF)纸基传感器,以采集稳定的荧光信号,这是首次在 μ PAD 上应用共聚焦 LIF 检测器(图 2),有效提高肝癌细胞中 miRNA 的检测灵敏度。同样,Wang 等^[22]设计了一种具有共聚焦激光诱导荧光检测功能的纸基芯片,用于测定肝癌患者血清中的甲胎蛋白(AFP)。该装置采用杂链式反应放大荧光信号,大大提高了该方法的灵敏度,使血清中低浓度 AFP 的测定成为可能。在最

优条件下, AFP 的检测限为 1.0 pg/mL。

2.3 基于电化学法的纸基微流控芯片

近年来, μ PADs 与电化学相结合的技术在医学诊断中备受关注, 尤其是在癌症早期的检测中。Dungchai 等^[23] 基于电化学信号使用光刻和丝网印刷制造了 μ PAD, 首次将电化学检测方法与 μ PADs 集成, 显著提高了 μ PAD 的灵敏度。电化学检测将反应信号转换为电容、电流、电压等电信号, 实现对生物实体的检测。该检测方法不依赖于颜色, 避免了样品中某些有色物质的干扰。近年来, 这种方法在纸质检测中最具代表性的成果是检测 SARS-CoV-2 抗体的装置^[24]。该装置可以高灵敏度地检测人血清中的抗体, 但由于需要外部电信号检测设备, 便携性仍有优化的空间。与其他使用多种抗体的侧向层析检测技术(LFA)不同, 该装置对抗体无特定要求。SARS-CoV-2 抗体的存在将中断氧化还原指示剂的氧化还原转换, 导致电流响应降低。对真实的患者血清进行了一系列检测, 并将结果与商业标准 ELISA 方法进行了比较, 证明该方法在真实样本检测中的潜在有效性。此外, 基于纸质电化学平台的功能, 还扩展到用于直接检测 SARS-CoV-2 的刺突蛋白抗原, 为诊断 COVID-19 提供了新的可能性。而且纸张在使用后可以焚烧处理, 因此更适合传染病检测。

在检测癌症标志物方面, 基于伏安法的电化学检测技术具有良好的选择性、重现性和灵敏度。其中, 差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)是通过测量不同电位所响应的电流差异进行数据运算, 可以降低杂质所产生电流的影响。灵敏度和准确性对于癌症标志物的早期检测至关重要, 信号放大技术可以提高 μ PAD 的灵敏度^[25]。面对这一挑战, Prasad 等^[26] 开发了一种通过 DPV 信号进行胰腺癌生物标志物非典型酪氨酸激酶 1 的定量检测。该装置中 AuNPs 的颜色变化可以使用肉眼进行定性检测, 而电化学检测则可以得到更准确的数据, 电化学检测与金纳米颗粒的结合可实现高灵敏度的检测。Zhou 等^[27] 也开发了一种使用 DPV 的超灵敏双模(电化学/视觉) μ PAD(图 3), 用于前列腺特异性抗原(PSA)的检测。PSA 是一种由前列腺上皮细胞分泌的蛋白质, 正常人血清中 PSA 含量小于 4.0 μ g/L。双模 μ PAD 不仅可以通过信号放大策略实现对目标物的电化学定量检测, 还可以通过显色底物的颜色变化实现对靶标的视觉判断。同时, μ PAD 中纸基工作电极的引入可以减少背景信

号的影响, 极大程度地提高了 μ PAD 的灵敏度, 这种电化学平台在资源匮乏地区进行癌症早期诊断方面具有巨大潜力。

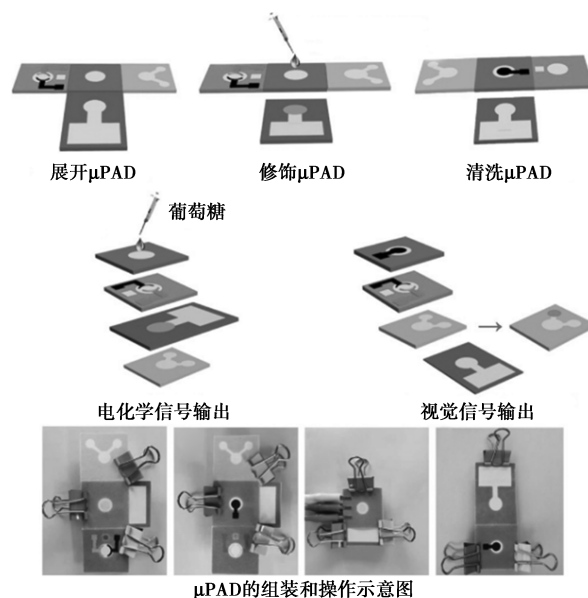


图3 基于 DPV 和视觉的双模 μ PAD

电化学发光(ECL)是一种高效的分析技术, 不仅拥有较低的背景信号, 而且还可以利用电流来控制反应。通过改变电极电压, 防止氧化/还原物质参与电化学发光反应, 提高 ECL 的选择性。将 ECL 与 μ PAD 结合用于癌症标志物的检测, 将具有更好的选择性和更高的灵敏度^[28]。Wu 等^[29] 开发了一种基于电化学发光的折纸装置, 采用多孔 AuPd 合金纳米颗粒作为生物探针, 通过特异性识别捕获乳腺癌细胞表面的甘露糖。据报道, 这是第一次在 μ PAD 中使用 ECL 进行癌细胞检测。通过将涂有金的纸电极与其他不同的识别元件(如适配体、抗体、肽和核酸)进行功能化, 该装置可以很容易地扩展到其他类型的癌细胞的细胞感应, 并且对癌症的早期诊断具有重要的临床价值。Sun 等^[30] 首次将旋转纸盘集成到微流控纸基 ECL 免疫传感器中, 用于癌症生物标志物的多重检测。在旋转纸盘的控制下, 装置进行多步 ECL 免疫测定, 对癌胚抗原(CEA)和前列腺特异性抗原(PSA)进行多重检测。因此, 通过各种策略进行信号放大以提高检测限和灵敏度还有很大的空间, 集成度高、操作简便的旋转纸基 ECL 免疫器有望成为快速、低成本和灵敏的分析平台。

综上所述, 基于不同检测方法的纸基微流控各具优势, 表 1 详述了各种传感器的检测范围和检测限。

表 1 基于不同检测方法的 μ PAD 在癌症标志物检测中的应用

检测方法	优势	癌症标志物	检测范围	检测限
比色法	不依赖检测仪器,凭眼睛读取结果,结合智能手机后检测限更低	甲胎蛋白(AFP)、CA125 ^[14]	0.1~100 ng/mL	1.054 ng/mL
			0.1~10 ng/mL	0.413 ng/mL
		癌胚抗原(CEA) ^[15]	0.5~70 ng/mL	0.015 ng/mL
荧光法	不接触样品即可进行检测,减少来自样品的干扰,结合 LIF 后检测限更低	癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)、CA199 ^[16]	0.1~1000 ng/mL	0.05 ng/mL
			0.1~1000 ng/mL	0.03 ng/mL
			0.1~1000 U/mL	0.09 U/mL
		癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP) ^[18]	250 fM~25 nmol/L	250 fmol/L
		miRNA-21、叶酸受体(FR) ^[19]	0.01~5.0 fmol/L	0.0033 fmol/L
			2.0~30.0 ng/mL	0.667 ng/mL
		miRNA-21、miRNA-31 ^[21]	0.50~200 fmol/L	0.20 fmol/L
	1.0~200 fmol/L	0.50 fmol/L		
		甲胎蛋白(AFP) ^[22]	2.5~1000.0 pg/mL	1.0 pg/mL
电化学法	将反应信号转化为电流,检测灵敏度更高	非典型酪氨酸激酶 1(PEAK1) ^[26]	10~10 ⁶ pg/mL	10 pg/mL
		前列腺特异性抗原(PSA)、癌胚抗原(CEA) ^[27]	5~5×10 ⁴ pg/mL	0.78 pg/mL
			0.1~100 ng/mL	0.07 ng/mL
		前列腺特异性抗原(PSA) ^[30]	0.1~50 ng/mL	0.03 ng/mL

3 结论

目前,研究人员已成功开发了基于比色法、荧光法和电化学法等检测方法的 μ PAD,用于癌症标志物的检测与读数。未来 μ PAD 的主要发展方向是开发廉价且易于操作的便携式分析设备,扩大应用范围,特别是在欠发达地区。然而, μ PAD 在癌症检测方面面临的如下问题,限制了其推广。

(1) 纸质材料中癌症标志物的有效浓度较低,需要进行信号放大和信号转化,以提高信号采集能力。这种方法最具代表性的是对纸上电极的修饰,使纸器件能够通过改变生物或化学反应产生的电流来检测目标物质。然而,商业上可检测电信号的 μ PAD 很少见,因为装配昂贵的微型检测设备可能会降低纸芯片的性价比。

(2) 纸质检测需要进行样品的自动化处理,且操作复杂。虽然纸材料可以通过毛细管实现样品流动,但在样品处理的情况下仍然需要外部设备使其自动化。例如,检测病毒核酸需要将样本中的病毒裂解,然后扩增目标核酸,才能在 μ PAD 或设备上进行测试。为了提高纸芯片的集成度,可以增加样品处理模块以简化操作步骤。值得注意的是,纸芯片上的附加功能组件需要小型化,以确保便利性和性能。

(3) 纸质检测需要更准确的信号读出形式。智能手机作为常用工具,具有许多强大的功能,可以与 μ PAD 相结合,建立更多比色结果数据库,编程到智能手机或其他附件中,提高检测结果的准确度和灵敏度。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 70(4): 313.
- [2] Francesco P. Benefits and harms of lung cancer screening by chest computed tomography: A systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2021, 39(23): 3192-3193.
- [3] Webster L R, Bilous A M, Willis L, *et al.* Histopathologic indicators of breast cancer biology: Insights from population mammographic screening[J]. *British Journal of Cancer*, 2005, 92(8): 1366-1371.
- [4] Fu Y T, Zhang Y Y, Khoo B L, *et al.* Liquid biopsy technologies for hematological diseases[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2021, 41(1): 246-274.
- [5] Mahato K, Srivastava A, Chandra P, *et al.* Paper based diagnostics for personalized health care: Emerging technologies and commercial aspects[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 96: 246-259.
- [6] Martinez A W, Phillips S T, Butte M J, *et al.* Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays[J]. *Anatomical Science International*, 2007, 46(8): 1318-1320.
- [7] Deng D, Lin Q, Li H, *et al.* Rapid detection of malachite green resi-

- dues in fish using a surface-enhanced Raman scattering-active glass fiber paper prepared by in situ reduction method [J]. *Talanta*, 2019, 200: 272–278.
- [8] Zeng Y, Liang D, Zheng P, *et al.* A simple and rapid immunochromatography test based on readily available filter paper modified with chitosan to screen for 13 sulfonamides in milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(1): 126–133.
- [9] Wang C H, Wu J J, Lee G B, *et al.* Screening of highly-specific aptamers and their applications in paper-based microfluidic chips for rapid diagnosis of multiple bacteria [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 284: 395–402.
- [10] Qu W, Liu Y, Liu D, *et al.* Copper-mediated amplification allows readout of immunoassays by the naked eye [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(15): 3442–3445.
- [11] Appidi T, Mudigunda S V, Kodandapani S, *et al.* Development of label-free gold nanoparticle based rapid colorimetric assay for clinical/point-of-care screening of cervical cancer [J]. *Nanoscale Advances*, 2020, 2(12): 5737–5745.
- [12] Kumar A, Hens A, Arun R K, *et al.* A paper based microfluidic device for easy detection of uric acid using positively charged gold nanoparticles [J]. *Analyst*, 2015, 140(6): 1817–1821.
- [13] Lei K F, Butt Y K C. Colorimetric immunoassay chip based on gold nanoparticles and gold enhancement [J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2010, 8(1): 131–137.
- [14] Aydinoglu E, Ceylan A E, Timur S, *et al.* Paper-based colorimetric spot test utilizing smartphone sensing for detection of biomarkers [J]. *Talanta*, 2020, 208: 120446.
- [15] Wang K, Yang J C, Xu H, *et al.* Smartphone-imaged multilayered paper-based analytical device for colorimetric analysis of carcinoembryonic antigen [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(11): 2517–2528.
- [16] Jiao Y, Du C, Zong L, *et al.* 3D Vertical-flow paper-based device for simultaneous detection of multiple cancer biomarkers by fluorescent immunoassay [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 306: 127239.
- [17] Liu X, Gong X Y, Yuan J, *et al.* Dual-stimulus responsive near-infrared reversible ratiometric fluorescent and photoacoustic probe for in vivo tumor imaging [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(13): 5420–5429.
- [18] Hu M, Yan J, He Y, *et al.* Ultrasensitive, multiplexed detection of cancer biomarkers directly in serum by using a quantum dot-based microfluidic protein chip [J]. *ACS Nano*, 2010, 4(1): 488–494.
- [19] Tian T, Li L, Zhang Y, *et al.* Dual-mode fluorescence biosensor platform based on T-shaped duplex structure for detection of microRNA and folate receptor [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 261: 44–50.
- [20] Wang W, Cai X Y, Lin P, *et al.* Separation and determination of microRNAs by high-speed capillary sieving electrophoresis [J]. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(20): 3925–3931.
- [21] Cai X, Zhang H, Yu X, *et al.* A microfluidic paper-based laser-induced fluorescence sensor based on duplex-specific nuclease amplification for selective and sensitive detection of miRNAs in cancer cells [J]. *Talanta*, 2020, 216: 120996.
- [22] Wang W, Cai X, Li Q, *et al.* Application of a microfluidic paper-based bioimmunosensor with laser-induced fluorescence detection in the determination of alpha-fetoprotein from serum of hepatopathies [J]. *Talanta*, 2021, 221: 121660.
- [23] Dungehai W, Chailapakul O, Henry C S, *et al.* Electrochemical detection for paper-based microfluidics [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 26(6): 1214–1223.
- [24] Yakob A, Pimpitak U, Rengpipat S, *et al.* Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 176(15): 112912.
- [25] Zheng X X, Li L, Zhang L N, *et al.* Multiple self-cleaning paper-based electrochemical ratiometric biosensor based on the inner reference probe and exonuclease III-assisted signal amplification strategy [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 147(1): 111769.
- [26] Prasad K S, Cao X Y, Gao N, *et al.* A low-cost nanomaterial-based electrochemical immunosensor on paper for high-sensitivity early detection of pancreatic cancer [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 305: 127516.
- [27] Zhou C, Cui K, Liu Y, *et al.* Ultrasensitive microfluidic paper-based electrochemical/visual analytical device via signal amplification of Pd@Hollow Zn/Co core-shell ZIF67/ZIF8 nanoparticles for prostate-specific antigen detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(13): 5459–5467.
- [28] Ahmadi A, Khoshfetrat S M, Kabiri S, *et al.* Electrochemiluminescence paper-based screen-printed electrode for HbA1c detection using two-dimensional zirconium metal-organic framework/Fe₃O₄ nanosheet composites decorated with Au nano-clusters [J]. *Microchimica Acta*, 2021, 188(9): 296.
- [29] Wu L D, Ma C, Ge L, *et al.* Paper-based electrochemiluminescence origami cyto-device for multiple cancer cells detection using porous AuPd alloy as catalytically promoted nanolabels [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 63: 450–457.
- [30] Sun X E, Li B W, Tian C Y, *et al.* Rotational paper-based electrochemiluminescence immunodevices for sensitive and multiplexed detection of cancer biomarkers [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1007: 33–39. ■