

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 11 月 28 日 (28.11.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/239352 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 21/64 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/096734
- (22) 国际申请日: 2023 年 5 月 29 日 (29.05.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310589390.X 2023年5月24日 (24.05.2023) CN
- (71) 申请人: 集美大学 (JIMEI UNIVERSITY) [CN/CN];
中国福建省厦门市集美银江路 185 号, Fujian
361021 (CN)。江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY)

[CN/CN]; 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

- (72) 发明人: 陈全胜 (CHEN, Quansheng); 中国福建省厦门市集美银江路 185 号, Fujian 361021 (CN)。吴继忠 (WU, Jizhong); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。欧阳琴 (OUYANG, Qin); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。魏文雅 (WEI, Wenya); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。赵松光 (ZHAO, Songguang); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。朱阿芳 (ZHU, Afang); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。王震 (WANG, Zhen); 中国江苏省镇江市学府路 301 号, Jiangsu 212013 (CN)。

(54) Title: MICROFLUIDIC BIOSENSING PLATFORM BASED ON UP-CONVERSION LUMINESCENCE

(54) 发明名称: 一种基于上转换发光的微流体生物传感平台

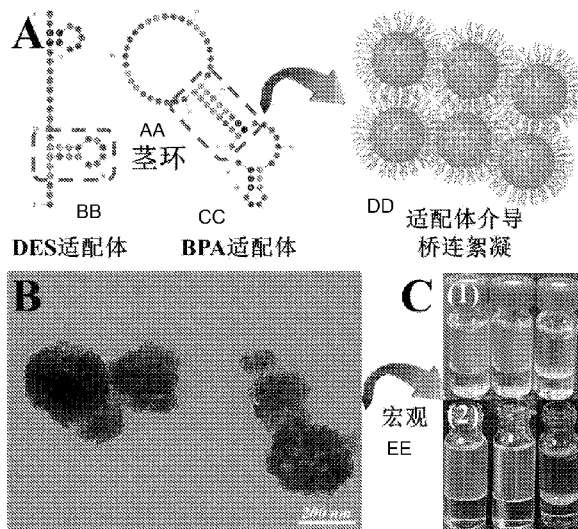


图 4

AA Stem-loop
BB DES aptamers
CC BPA aptamers
DD Aptamer-mediated bridging flocculation
EE Macroscopic view

(57) Abstract: A microfluidic biosensing platform based on up-conversion luminescence, the microfluidic biosensing platform comprising an up-conversion luminescent biosensor, which is used for specifically recognizing EDCs, and a microfluidic chip, which is configured such that the mixing, reaction, separation and measurement of the up-conversion luminescent biosensor and a sample to be subjected to measurement are integrated therein, wherein the microfluidic chip comprises: sample feeding reservoirs, which are used for sample feeding of the up-conversion luminescent biosensor and the sample to be subjected to measurement; an arc-shaped channel, a

[见续页]



(74) 代理人: 深圳市韦恩肯知识产权代理有限公司 (WAYNE INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国广东省深圳市宝安区甲岸南路22号易尚创意科技大厦401室, Guangdong 518100 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

feeding port of the arc-shaped channel being in communication with both the sample feeding reservoir of the up-conversion luminescent biosensor and the sample feeding reservoir of the sample to be subjected to measurement, and after the up-conversion luminescent biosensor and the sample to be subjected to measurement enter the arc-shaped channel, the arc-shaped channel being configured for the mixing and reaction between the up-conversion luminescent biosensor and the sample to be subjected to measurement; a separation channel (7), which is in communication with a discharge port of the arc-shaped channel and is used for the magnetic separation of the up-conversion luminescent biosensor after the reaction is finished; and a measurement reservoir (8), which is in communication with a discharge port of the separation channel and is used for completing luminescence enhancement quantitative measurement of the EDCs.

(57) 摘要: 一种基于上转换发光的微流体生物传感平台, 包括: 上转换发光的生物传感器, 用于特异性识别EDCs; 以及微流体芯片, 用于集成上转换发光的生物传感器与待测样本的混合、反应、分离、检测; 微流体芯片包括: 进样池, 用于上转换发光的生物传感器和待测样本进样; 弧形通道, 弧形通道的进料口同时连通于上转换发光的生物传感器的进样池和待测样本的进样池, 待上转换发光的生物传感器和待测样本进入弧形通道后, 弧形通道用于二者的混合和反应; 分离通道(7), 与弧形通道的出料口连通, 用于反应结束后的上转换发光的生物传感器的磁分离; 检测池(8), 与分离通道的出料口连通, 用于完成发光增强定量检测EDCs。

一种基于上转换发光的微流体生物传感平台

技术领域

本发明涉及食品安全检测技术领域,特别涉及一种基于上转换发光的微流体生物传感平台。

背景技术

内分泌干扰化学物(EDCs)被定义为“干扰存在于人体内部负责平衡、繁殖和发育过程的天然血源性激素的合成、分泌、运输、代谢、结合或消除的外源性制剂”。人类可能通过食品生产(食品添加剂、杀虫剂、食品容器)、工业活动(空气污染、水污染物、工业化学品)、医疗(医疗产品)等摄入数百种EDCs。其中,具有雌激素作用的外源性制剂,例如双酚A(BPA)、己烯雌酚(DES)、雌二醇(E2)、壬基酚等吸引了广泛的关注,这类EDCs可能会导致严重的健康危害,包括神经发育障碍,脑、肝和肺损伤,生殖和内分泌失调,代谢紊乱等。因此,建立有效的评估方法来确定人类可能接触媒介中的EDCs含量是非常重要的。

以往的研究中,对于EDCs含量的测定是基于高效液相色谱、气质联用色谱、电化学传感器、光电化学免疫传感器等方法,但这些测定方法往往面临着检测仪器设备昂贵、背景干扰强、样品预处理步骤繁琐、试剂消耗量大等困难,难以实现EDCs的现场快速定量检测。因此,开发新型的检测平台用以克服上述缺陷是至关重要的。

发明内容

针对现有技术的不足,本发明提供了一种基于上转换发光的微流体生物传感平台,用以实现对EDCs的微量取样和简便的高灵敏定量检测。

基于此,本发明的目的在于提供一种基于上转换发光的微流体生物传感平台,包括:上转换发光的生物传感器,用于特异性识别EDCs;以及微流体芯片,作为所述上转换发光的生物传感器与待测样本反应平台,用于集成所述上转换发光的生物传感器与待测样本的混合、反应、分离、检测;

所述微流体芯片,包括:进样池,用于所述上转换发光的生物传感器和待测样本进样;弧形通道,所述弧形通道的进料口同时连通于所述上转换发光的生物传感器的进样池和待测样本的进样池,待所述上转换发光的生物传感器和待测样本进入弧形通道后,弧形通道用于二者的混合和反应;分离通道,与所述弧形通道的出料口连通,用于反应结束后的所

述上转换发光的生物传感器的磁分离；检测池，与所述分离通道的出料口连通，用于发光增强定量检测EDCs。

进一步地，所述微流体芯片的所有微通道的宽度均为400 μ m，深度均为200 μ m。

根据上述技术方案，上转换发光的生物传感器与待测样本在微流体芯片上的混合、反应、分离、检测集成，其具体过程为：将上转换发光的生物传感器与待测样本分别从微流体芯片的两个进样池注入，两种微流体在弧形通道内充分混合、反应；之后在分离通道处外加磁场，分离未与EDCs反应的生物传感器；最后在检测池中，脱落的CSUCNPs完成桥连絮凝和沉降，并完成上转换荧光信号的采集，从而可以定量检测EDCs。

进一步地，生物传感器与待测样本溶液的注射流速为12 μ L/min和3 μ L/min。

进一步地，生物传感器与待测样本溶液的注射时间为8-12min。

本发明的第二目的在于提供上述一种基于上转换发光的微流体生物传感平台的制备方法。

所述上转换发光的生物传感器的制备方法包括如下步骤：

S1、制备含有稀土元素的上转换纳米粒子种子(CUCNPs)；

S2、步骤S1制备得到的CUCNPs外层进行包覆处理，制备得到具有核壳结构的上转换纳米粒子(CSUCNPs)；

S3、改性步骤S2制备得到的CSUCNPs为亲水性；

S4、将步骤S3得到的亲水性CSUCNPs生物分子功能化，得到生物分子功能化CSUCNPs；

S5、制备磁性纳米粒子(MNPs)；

S6、将步骤S5得到的MNPs生物分子功能化，得到生物分子功能化MNPs；

S7、步骤S4得到生物分子功能化CSUCNPs和步骤S6得到生物分子功能化CSUCNPs相结合，制备得到所述上转换发光的生物传感器。

进一步地，步骤S1的过程为，

分别取六水合氯化钇、六水合氯化镱和六水合稀土元素溶解于甲醇中，之后加入油酸和1-十八稀，混合后加热至150-170 $^{\circ}$ C反应25-35min，反应结束冷却后，滴加氢氧化钠和氯化铵的混合溶液，并于125-135 $^{\circ}$ C反应25-35min，随后升温至290-310 $^{\circ}$ C保持50-60min；反应结束后，加入乙醇和超纯水离心分离得到上转换纳米粒子种子(CUCNPs)。

进一步地，所述六水合氯化钇、六水合氯化镱和六水合稀土元素的总用量为1-1.5mmol。

进一步地,所述稀土元素为铈时,六水合氯化钪、六水合氯化镱和六水合稀土元素的比例为0.78:0.2:0.02。

进一步地,所述稀土元素为铈时,六水合氯化钪、六水合氯化镱和六水合稀土元素的比例为0.795:0.2:0.005。

进一步地,所述甲醇、油酸、1-十八稀的体积比例为10:(5-7):(14-17)。

进一步地,所述氢氧化钠和氯化铵的摩尔比为5:(7-9)。

进一步地,所述乙醇和超纯水的体积比为1:(0.6-1)。

进一步的,所述离心参数为8000-12000rpm转速下离心5-10min。

进一步地,步骤S2的过程为,

取六水合氯化钪溶解于甲醇中,之后加入油酸和1-十八稀,混合后加热至150-170°C反应25-35min;反应结束冷却后,加入步骤S1制备得到的CUCNPs,并滴加氢氧化钠和氯化铵的混合溶液,并于125-135°C反应25-35min,随后升温至290-310°C保持20-40min;反应结束后,加入乙醇和超纯水离心分离得到核壳上转换纳米粒子 (CSUCNPs)。

进一步地,所述六水合氯化钪的用量为0.35-0.45mmol。

进一步地,所述甲醇、油酸、1-十八稀的体积比例为10:(2.5-3.5):(7-9)。

进一步地,所述氢氧化钠和氯化铵的摩尔比为2:(2.5-3.5)。

进一步地,所述乙醇和超纯水的体积比为1:(0.6-1)。

进一步的,所述离心参数为8000-12000rpm转速下离心5-10min。

进一步地,步骤S3的过程为,

取步骤S2制备得到的CSUCNPs加入三氯甲烷和甲苯的混合溶液中,随后加入聚丙烯酸水溶液并密封,剧烈搅拌反应;结束后使用乙醇和超纯水清洗并离心,得到具有亲水性的聚丙烯酸修饰的CSUCNPs (PAA-CSUCNPs)。

进一步地,所述CSUCNPs、三氯甲烷、甲苯和聚丙烯酸的比例为50mg:(2-6mL):(4-10mL):(15-20mL)。

进一步地,所述聚丙烯酸水溶液浓度为10-20mg/mL。

进一步地,所述搅拌反应时间为24-48h。

进一步地,所述乙醇和超纯水的体积比为1:(0.6-1)。

进一步的,所述离心参数为8000-12000rpm转速下离心5-10min。

进一步地,步骤S4的过程为,

取步骤S3制备得到的PAA-CSUCNPs,加入含有碳酰二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺

的吗啉乙磺酸缓冲溶液中，进行第一次孵育；孵育结束后，离心分离得到活化的PAA-CSUCNPs，并分散在磷酸盐缓冲液中；向溶液中加入链霉亲和素溶液，进行第二次孵育；孵育结束后，离心分离得到修饰链霉亲和素的CSUCNPs，并分散在磷酸盐缓冲液中；随后加入5'端修饰生物素的EDCs适配体，进行第三次孵育；孵育结束后离心分离得到修饰适配体的CSUCNPs，并重新分散在磷酸盐缓冲液中；随后加入牛血清白蛋白溶液，进行第四次孵育；孵育结束后离心分离，并使用磷酸盐缓冲液清洗，制备得到生物分子功能化的CSUCNPs。

进一步地，所述PAA-CSUCNPs、碳酰二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺和吗啉乙磺酸缓冲溶液的比例为(0.8-1.2mg):4mg:2mg:(2.0-2.4mL)。

进一步地，第一次孵育条件为20-40°C，2-4h。

进一步地，链霉亲和素的用量为0.8-1.2mg。

进一步地，第二次孵育条件为30-40°C，10-14h。

进一步地，适配体的用量为200-300μL，浓度为10μM。

进一步地，第三次孵育条件为30-40°C，10-14h。

进一步地，牛血清白蛋白的用量为3-6mL，质量分数为2%。

进一步地，第四次孵育条件为30-40°C，1.5-3h。

进一步地，步骤S4中，离心分离参数为8000-12000rpm转速下离心5-10min。

进一步地，步骤S4中，磷酸盐缓冲液的pH为7.2-7.4，用量为5-15mL。

进一步地，步骤S5的过程为，

分别取六水合氯化铁、二水合柠檬酸三钠、醋酸钠加入乙二醇溶液中，剧烈搅拌充分溶解后，转移到反应釜中，高温反应；反应结束通过磁场收集制备得到的磁性纳米粒子(MNPs)，并使用乙醇和超纯水清洗。

进一步地，六水合氯化铁、二水合柠檬酸三钠、醋酸钠和乙二醇用量比例为5mmol:0.4mmol:(1.2-1.5g):(15-25mL)。

进一步地，高温反应的条件为190-210°C，8-12h。

进一步地，所述乙醇和超纯水的体积比为1:(0.6-1)。

进一步地，步骤S6的过程为，

取步骤S5制备得到的MNPs，加入含有碳酰二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的吗啉乙磺酸缓冲溶液中，进行第一次孵育；孵育结束后，磁分离得到活化的MNPs，并分散在磷酸盐缓冲液中；向溶液中加入链霉亲和素溶液，进行第二次孵育；孵育结束后，磁分离得

到修饰链霉亲和素的MNPs，并分散在磷酸盐缓冲液中；随后加入5'端修饰生物素的EDCs适配体互补序列，进行第三次孵育；孵育结束后磁分离得到修饰适配体的MNPs，并重新分散在磷酸盐缓冲液中；随后加入牛血清白蛋白溶液，进行第四次孵育；孵育结束后磁分离，并使用磷酸盐缓冲液清洗，制备得到生物分子功能化的MNPs。

进一步地，所述MNPs、碳酰二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺和吗啉乙磺酸缓冲溶液的比例为(8-12mg):10mg:5mg:(0.8-1.2mL)。

进一步地，第一次孵育条件为20-40°C，2-4h。

进一步地，链霉亲和素的用量为0.8-1.2mg。

进一步地，第二次孵育条件为30-40°C，10-14h。

进一步地，适配体互补序列的用量为200-300 μ L，浓度为10 μ M。

进一步地，第三次孵育条件为30-40°C，10-14h。

进一步地，牛血清白蛋白的用量为3-6mL，质量分数为2%。

进一步地，第四次孵育条件为30-40°C，1.5-3h。

进一步地，步骤S4中，磷酸盐缓冲液pH为7.2-7.4，用量为5-15mL。

进一步地，步骤S7的过程为，

取步骤S4制备得到的生物分子功能化的CSUCNPs和步骤S6制备得到的生物分子功能化的MNPs加入磷酸盐缓冲液中，高温加热；加热结束后缓慢退火，并转移至摇床孵育；孵育结束后，磁分离得到上转换发光的生物传感器，并使用磷酸盐缓冲液清洗三次，最后分散于磷酸盐缓冲液中。

进一步地，EDCs适配体修饰的CSUCNPs和EDCs适配体互补序列修饰的MNPs质量比为(1.5-2):5。

进一步地，高温反应条件为90-95°C，3-5min。

进一步地，退火条件为3-5°C/min，至60-65°C。

进一步地，孵育条件为20-40°C，0.5-2h。

进一步地，步骤7中，磷酸盐缓冲液pH为7.2-7.4，用量为5-10mL。

根据上述技术方案，适配体介导的纳米粒子桥连絮凝，用以实现所述上转换发光的生物传感器的高效发光增强过程为，将步骤S7制备的上转换发光的生物传感器与待测样本溶液混合反应后，适配体与EDCs特异性的结合，导致CSUCNPs从MNPs表面脱落；磁分离去除未与EDCs靶标反应的生物传感器，脱落在溶液中的CSUCNPs反映了靶标EDCs的

数量；脱落的CSUCNPs表面未结合靶标EDCs的适配体发生碱基的互补配对，产生适配体介导的纳米粒子桥连絮凝，进一步沉降，实现纳米粒子的浓度富集；通过优化调节焦距，对沉降的CSUCNPs信号采集，实现发光增强定量检测EDCs。

进一步地，步骤S7制备的上转换发光的生物传感器与待测样本溶液体积比4:1。

进一步地，信号采集的焦距为11.5mm。

进一步地，脱落的CSUCNPs的沉降时间为20-30min。

本发明的第三目的在于提供上述的一种基于上转换发光的微流体生物传感平台的使用方法，具体包括以下步骤：

取0-250ng/mL一系列浓度的EDCs标准溶液，与制备的上转换发光生物传感器共同注射进入所述微流体芯片中，完成生物传感器与靶标EDCs的混合、反应、分离与检测步骤；

静置以完成脱落的CSUCNPs的桥连絮凝和沉降，通过荧光光谱仪采集检测池中沉降形成的CSUCNPs界面的荧光光谱，以EDCs标准溶液的浓度对数值和荧光信号特征值进行线性拟合，建立EDCs含量检测的标准曲线；所述荧光信号特征值为特异性识别EDCs的生物传感器使用的稀土元素的特征荧光发射光强；

取待测样本溶液，代替上述EDCs标准溶液，与生物传感器共同注射进入微流体芯片，将采集得到的荧光信号特征值代入标准曲线计算，得出待测样本中EDCs的含量。

综上所述，本发明具有以下有益效果：

1、本发明公开了一种新型的适配体介导的纳米粒子桥连絮凝现象，并基于此发现，实现了纳米生物传感器荧光信号的大幅度增强，这极大的提高了对靶标检测的灵敏度，将检测限提升至少一个数量级；此外，通过适配体介导纳米粒子桥连絮凝形成稳定界面，大大减少了重力场对纳米粒子分散液的影响，有效提高纳米生物传感器的信号稳定性。

2、本发明设计了一种新型的微流体芯片，在有限的空间内集成了126个半圆通道和12个四分之一圆弧通道，为雷诺数约为0.79的层流态微流体增加湍流程度，实现了生物传感器与待测样本的重复混合与反应，通过外加磁场的辅助，实现了再微流体芯片上的混合、反应、分离、检测步骤的一体化集成，大大提高了检测效率。

3、本发明制备了一种上转换发光的微流体生物传感器，上转换发光过程有效的避免了其它基质的背景荧光干扰，同时生物识别元件适配体具有良好的经济性和特异性；进一步在芯片上集成为微流体生物传感器后，实现了微量取样（30 μ L）和快速检测（10min），这为实际现场应用提供了良好的前景。

4、本发明实现了多种EDCs的同时检测。低于危害阈值的单一EDCs成分,在多种EDCs混合后,可能呈现严重的健康危害,即可能存在累计效应。本发明通过调谐制备多色CSUCNPs并分别修饰特异性EDCs适配体,制备了同时检测BPA和DES的生物传感器,并实现了低至0.0076ng/mL和0.0131ng/mL的超灵敏检测。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

图1为制备的纳米粒子的表征图;其中,A为掺杂铕元素的CUCNPs透射电镜图;B为掺杂铕元素的CSUCNPs透射电镜图;C为掺杂铕元素的CUCNPs透射电镜图;D为掺杂铕元素的CSUCNPs透射电镜图;E为MNP s的透射电镜图;F为MNP s的扫描电镜图。

图2为制备的生物传感器的表征图;其中,A为掺杂铕元素的生物传感器的透射电镜图;B为掺杂铕元素的生物传感器的高倍透射电镜表征,其中B1为高倍透射电镜图,B2-B4分别为铁和铕元素的映射图像;C为掺杂铕元素的生物传感器的透射电镜图;D为掺杂铕元素的生物传感器的高倍透射电镜表征,其中D1为高倍透射电镜图,D2-D4分别为铁和铕元素的映射图像。

图3为微流体芯片示意图;其中,A为微流体芯片总体结构示意图;B为微流体芯片微通道图,其中,1、样本进样口;2、生物传感器进样口;3、进液通道;4、半圆通道;5、连接通道;6、1/4圆弧通道;7、分离通道;8、检测池。

图4为适配体介导纳米粒子桥连絮凝的图解与表征;其中,A为BPA和DES适配体二级结构分析及介导纳米粒子桥连絮凝示意图;B为适配体介导的CSUCNPs桥连絮凝的透射电镜图;C为宏观状态下适配体介导CSUCNPs桥连絮凝前后对比图,其中C1为未被激光激发状态,C2为被980nm激光激发状态。

图5为CSUCNPs发光增强图解与表征;其中,A为单粒子水平构建核壳结构得到的发光增强示意图及光谱;B为适配体介导的CSUCNPs桥连絮凝形成界面示意图;C为适配体介导的CSUCNPs桥连絮凝形成界面增强发光的光谱。

图6为生物传感器检测不同浓度EDCs结果图;其中,A为检测不同浓度EDCs的荧光光谱图;B为450nm处荧光信号特征值与DES浓度关系图;C为荧光特征值与EDCs浓度对数值的线性拟合曲线和方程;D为541nm处荧光信号特征值与BPA浓度关系图。

具体实施方式

下面将结合本发明实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料和试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径获得。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，数据为三次重复实验的平均值或平均值±标准差。

另外，全文中的“和/或”包括三个方案，以A和/或B为例，包括A技术方案、B技术方案，以及A和B同时满足的技术方案；另外，各个实施例之间的技术方案可以相互结合，但是必须是以本领域普通技术人员能够实现为基础，当技术方案的结合出现相互矛盾或无法实现应当认为这种技术方案的结合不存在，也不在本发明要求的保护范围之内。

实施例1

本实施例制备掺杂铕元素的上转换发光生物传感器，且上转换发光的生物传感器是在氮气保护、持续磁力搅拌条件下合成的。

掺杂铕元素的上转换发光生物传感器的制备方法，包括以下步骤：

S1：取0.78mmol六水合氯化钇、0.2mmol六水合氯化镱和0.02mmol六水合氯化铕溶解于10mL甲醇中，之后加入8mL油酸和15mL 1-十八稀，混合后加热至150℃反应35min，反应结束冷却后，滴加2.5mmol氢氧化钠和4mmol氟化铵的混合溶液，并于125℃反应35min，随后升温至300℃保持60min；反应结束后，加入10mL乙醇和8mL超纯水，8500rpm离心分离10min得到掺杂铕元素的上转换纳米粒子种子(CUCNPs)，其透射电镜图如图1A所示。

S2：取0.4mmol六水合氯化钇溶解于10mL甲醇中，之后加入3mL油酸和8mL 1-十八稀，混合后加热至170℃反应25min；反应结束冷却后，加入步骤S1制备得到的CUCNPs，并滴加1mmol氢氧化钠和1.5mmol氟化铵的混合溶液，并于135℃反应25min，随后升温至290℃保持40min；反应结束后，加入10mL乙醇和8mL超纯水，8500rpm离心分离10min，得到掺杂铕元素的核壳上转换纳米粒子(CSUCNPs)，其透射电镜图如图1B所示。

S3：取50mg步骤S2制备得到的CSUCNPs，加入4mL三氯甲烷和6mL甲苯的混合溶液中，随后加入20mL 10mg/mL的聚丙烯酸水溶液并密封，室温下剧烈搅拌反应48h；结束后使用10mL乙醇和10mL超纯水清洗后，9000rpm离心8min，得到具有亲水性的聚丙烯酸

修饰的CSUCNPs (PAA-CSUCNPs)。

S4: 取5mg步骤S3制备得到的PAA-CSUCNPs, 加入含有20mg碳酰二亚胺和10mg N-羟基琥珀酰亚胺的咪唑乙磺酸缓冲溶液(10mL)中, 25℃孵育3h; 孵育结束后, 8000rpm离心分离10min得到活化的PAA-CSUCNPs, 并分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 向溶液中加入1mL 1mg/mL的链霉亲和素溶液, 37℃孵育12h; 孵育结束后, 8500rpm离心分离6min得到修饰链霉亲和素的CSUCNPs, 并分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 随后加入200μL 10μM的5'端修饰生物素的BPA适配体, 37℃孵育12h; 孵育结束后9000rpm离心分离5min得到修饰BPA适配体的CSUCNPs, 并重新分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 随后加入5mL 2%的牛血清白蛋白溶液, 37℃孵育2h; 孵育结束后10000rpm离心分离5min, 并使用10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)清洗, 制备得到生物分子功能化的CSUCNPs; 其中, BPA适配体的序列为5'-Biotin-CCG GTG GGT GGT CAG GTG GGA TAG CGT TCC GCG TAT GGC CCA GCG CAT CAC GGG TTC GCA CCA-3'。

S5: 取1.3515 g六水合氯化铁、0.1178 g二水合柠檬酸三钠、1.2 g醋酸钠加入20 mL乙二醇溶液中, 剧烈搅拌30min充分溶解后, 转移到反应釜中, 200℃高温反应12h; 反应结束后通过磁场收集制备得到的磁性纳米粒子(MNPs), 并使用10mL乙醇和10mL超纯水清洗。MNPs的透射电镜图如图1E所示, 扫描电镜图如图1F所示。

S6: 取100mg步骤S5制备得到的MNPs, 加入含有200mg碳酰二亚胺和100mgN-羟基琥珀酰亚胺的20mL咪唑乙磺酸缓冲溶液中, 25℃孵育3h; 孵育结束后, 磁分离得到活化的MNPs, 并分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 向溶液中加入1mL 1mg/mL的链霉亲和素溶液, 37℃孵育12h; 孵育结束后, 磁分离得到修饰链霉亲和素的MNPs, 并分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 随后加入200μL 10μM的5'端修饰生物素的BPA适配体互补序列, 37℃孵育12h; 孵育结束后磁分离得到修饰BPA适配体互补序列的MNPs, 并重新分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 随后加入5mL 2%的牛血清白蛋白溶液, 37℃孵育2h; 孵育结束后磁分离, 并使用10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)清洗, 制备得到生物分子功能化的MNPs; 其中, BPA适配体的互补序列为5'-Biotin-TTT TTT TGG TGC GAA CCC GTG ATG-3'。

S7: 取400μL 0.5mg/mL步骤S4制备得到的生物分子功能化的CSUCNPs和500μL 1mg/mL步骤S6制备得到的生物分子功能化的MNPs加入1mL磷酸盐缓冲液中, 95℃高温加热3min; 加热结束后缓慢退火至65℃, 并转移至摇床37℃孵育1h; 孵育结束后, 磁分离得到掺杂铕元素的上转换发光生物传感器, 并使用10mL磷酸盐缓冲液清洗三次, 最后分

散于5mL磷酸盐缓冲液中；铕元素掺杂的上转换发光生物传感器透射电镜图如图2A所示，高倍透射电镜图和元素映射图如图2B所示，表明成功制备掺杂铕元素的上转换发光生物传感器。

实施例2

本实施例制备掺杂铕元素的上转换发光生物传感器，且上转换发光的生物传感器是在氮气保护、持续磁力搅拌条件下合成的。

掺杂铕元素的上转换发光生物传感器的制备方法，包括以下步骤：

S1：取0.795mmol六水合氯化钇、0.2mmol六水合氯化镱和0.005mmol六水合氯化铕溶解于10mL甲醇中，之后加入7mL油酸和14mL 1-十八稀，混合后加热至170°C反应25min，反应结束冷却后，滴加2.5mmol氢氧化钠和4mmol氟化铵的混合溶液，并于135°C反应25min，随后升温至295°C保持55min；反应结束后，加入10mL乙醇和10mL超纯水，9500rpm离心分离5min得到掺杂铕元素的上转换纳米粒子种子(CUCNPs)，透射电镜图如图1C所示。

S2：取0.45mmol六水合氯化钇溶解于10mL甲醇中，之后加入2.5mL油酸和8mL 1-十八稀，混合后加热至150°C反应35min；反应结束冷却后，加入步骤S1制备得到的CUCNPs，并滴加1mmol氢氧化钠和1.5mmol氟化铵的混合溶液，并于125°C反应35min，随后升温至300°C保持20min；反应结束后，加入10mL乙醇和10mL超纯水，12000rpm离心分离4min，得到掺杂铕元素的核壳上转换纳米粒子(CSUCNPs)，其透射电镜图如图1D所示。

S3：取50mg步骤S2制备得到的CSUCNPs，加入4mL三氯甲烷和6mL甲苯的混合溶液中，随后加入15mL 20mg/mL的聚丙烯酸水溶液并密封，室温下剧烈搅拌反应36h；结束后使用10mL乙醇和6mL超纯水清洗，并9500rpm离心7min，得到具有亲水性的聚丙烯酸修饰的CSUCNPs (PAA-CSUCNPs)；

S4：取5mg步骤S3制备得到的PAA-CSUCNPs，加入含有20mg碳酰二亚胺和10mgN-羟基琥珀酰亚胺的12mL吗啉乙磺酸缓冲溶液中，30°C孵育2h；孵育结束后，9500rpm离心分离6min得到活化的PAA-CSUCNPs，并分散在10mL磷酸盐缓冲液（pH为7.2）中；向溶液中加入1mL 1mg/mL的链霉亲和素溶液，37°C孵育10h；孵育结束后，11000rpm离心分离5min得到修饰链霉亲和素的CSUCNPs，并分散在10mL磷酸盐缓冲液（pH为7.2）中；随后加入200μL 10μM的5'端修饰生物素的DES适配体，37°C孵育13h；孵育结束后11500rpm离心分离3min得到修饰DES适配体的CSUCNPs，并重新分散在10mL磷酸盐缓冲液（pH为7.2）中；随后加入5mL 2%的牛血清白蛋白溶液，37°C孵育2h；；孵育结束后

10000rpm离心分离5min, 并使用10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)清洗, 制备得到生物分子功能化的CSUCNPs; 其中, DES适配体的序列为5'-Biotin-GCC CTC TGA GGA TGC CGA AAA AGAAAA GAA ATT CTC TGG C-3'。

S5、取1.3515 g六水合氯化铁、0.1178 g二水合柠檬酸三钠、1.2 g醋酸钠加入25 mL乙二醇溶液中, 剧烈搅拌30min充分溶解后, 转移到反应釜中, 200°C高温反应10h; 反应结束后通过磁场收集制备得到的磁性纳米粒子(MNPs), 并使用10mL乙醇和10mL超纯水清洗。

S6、取120mg步骤S5制备得到的MNPs, 加入含有200mg碳酰二亚胺和100mgN-羟基琥珀酰亚胺的20mL吗啉乙磺酸缓冲溶液中, 30°C孵育2h; 孵育结束后, 磁分离得到活化的MNPs, 并分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 向溶液中加入1mL 1mg/mL的链霉亲和素溶液, 37°C孵育10h; 孵育结束后, 磁分离得到修饰链霉亲和素的MNPs, 并分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 随后加入200μL 10μM的5'端修饰生物素的DES适配体互补序列, 37°C孵育13h; 孵育结束后磁分离得到修饰DES适配体互补序列的MNPs, 并重新分散在10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)中; 随后加入5mL 2%的牛血清白蛋白溶液, 37°C孵育3h; 孵育结束后磁分离, 并使用10mL磷酸盐缓冲液(pH为7.2)清洗, 制备得到生物分子功能化的MNPs; 其中, DES适配体的互补序列为5'-Biotin-TTTTTT GCC AGA GAA TTT CTT-3'。

S7、取300μL 0.5mg/mL步骤S4制备得到的生物分子功能化的CSUCNPs和500μL 1mg/mL步骤S6制备得到的生物分子功能化的MNPs加入1mL磷酸盐缓冲液中, 90°C高温加热5min; 加热结束后缓慢退火至65°C, 并转移至摇床37°C孵育2h; 孵育结束后, 磁分离得到掺杂铕元素的上转换发光生物传感器, 并使用10mL磷酸盐缓冲液清洗三次, 最后分散在5mL磷酸盐缓冲液中; 掺杂铕元素的上转换发光生物传感器透射电镜图如图2C所示, 高倍透射电镜图和元素映射图如图2D所示, 表明成功制备掺杂铕元素的上转换发光生物传感器。

实施例3

通过软光刻法制备的微流体芯片, 其结构如图3A和图3B所示, 包括样本进样口1、以及生物传感器进样口2, 样本进样口1和生物传感器进样口2的截面呈圆形, 直径为8mm, 且二者的深度为1cm。

样本进样口1和生物传感器进样口2分别连通有进液通道3, 两个进液通道3的另一端相

交连通，其夹角为 90° ，两个进液通道3长9mm。

微流体芯片还包含有半圆通道4和1/4圆弧通道6，且各个通道的连接处均为相切连接，以实现微流体在微通道内的平稳过渡；微流体芯片还包括有连接通道5，连接通道5的两端分别切向连接半圆通道4和1/4圆弧通道6，用以改变弧形通道的方向。

126个半圆通道4（半径为 $800\mu\text{m}$ ）、25个1/4圆弧通道6（半径为 $800\mu\text{m}$ ）、11个连接通道5（长度为 $500\mu\text{m}$ ），组成本实施例中如图3B的弧形通道，弧形通道的进料口与两个进液通道3的相交处连通，且出料口连通有分离通道7。分离通道7为长度6.8mm的直形通道，分离通道7的另一端连通有检测池8，检测池8用于生物传感器的磁分离。检测池8的直径为1.2cm，深度为1cm，用于脱落的CSUCNPs的桥连絮凝、沉降、荧光信号采集；本实施例中所有通道的宽度均为 $400\mu\text{m}$ ，深度均为 $200\mu\text{m}$ 。

适配体介导的纳米粒子桥连絮凝和发光增强，包括以下步骤：

实施例1和实施例2分别制备了核壳结构的CSUCNPs，从单纳米粒子水平实现了第一次发光增强，如图5A所示，其中，掺杂铕元素的CSUCNPs实现了1.72倍的发光增强，掺杂铕元素的CSUCNPs实现了2.28倍的发光增强；DES和BPA适配体的二级结构预测如图4A所示，存在茎环结构，表明适配体序列中存在互补配对的碱基序列并可以稳定的杂交，从而导致修饰了适配体序列的CSUCNPs相互结合形成桥连絮凝，如图4A所示；适配体介导的CSUCNPs桥连絮凝的微观透射电镜图如图4B所示，可以明显观察到CSUCNPs由分散的单纳米粒子（图1A-1D）团聚成纳米聚集体；这使得表面生物分子功能化的CSUCNPs从宏观上，由分散的溶液状态沉降形成界面（图4C、图5B），调整荧光信号采集方式为平行于重力场方向（图4C2），实现在纳米粒子群体水平上的发光增强，如图5C所示，掺杂铕元素的生物传感器发光得到7.10倍增强，掺杂铕元素的生物传感器发光实现了8.94倍的增强。

实施例4

基于上转换发光的生物传感器实现BPA和DES的同时检测，包括以下步骤：

A、将实施例1和实施例2制备得到的上转换发光生物传感器等体积混合均匀形成可同时识别BPA和DES的混合生物传感器溶液；之后将待测样本溶液与混合生物传感器溶液分别从微流体芯片的样本进样口1和生物传感器进样口2注入，注射流速分别为 $12\mu\text{L}/\text{min}$ 和 $3\mu\text{L}/\text{min}$ ，注射时间为10min；两种微流体在微流体芯片的微通道内充分混合、反应；同时在分离通道7处外加磁场，分离未与BPA和DES反应的生物传感器；之后混合液体进入

检测池8中，脱落的CSUCNPs完成桥连絮凝和沉降，沉降达到稳态的时间为20min，完成上转换荧光信号的采集。

B、取0-250ng/mL一系列浓度的BPA和DES混合标准溶液，与制备得到的上转换发光生物传感器按照步骤S1共同注射进入微流体芯片中，完成生物传感器与靶标EDCs的混合、反应、分离与检测步骤；不同浓度混合标准溶液检测采集的上转荧光光谱如图6A所示，随着的BPA和DES浓度的升高，541nm和450nm处的荧光强度也逐渐增强；450nm处荧光信号特征值 I_{450} 与DES浓度的关系如图6B所示；541nm处的荧光信号特征值 I_{541} 与BPA浓度的关系图如图6D所示。

C、将荧光信号特征值与靶标EDCs浓度进行拟合，得到检测的线性数学公式，如图6C所示，对BPA检测的标准曲线拟合为 $y_1=0.2475x_1+0.4337$ ， $R^2=0.9962$ ，检测范围为0.025-100ng/mL，检测限为0.0076ng/mL，其中 x_1 为BPA浓度对数值， y_1 为450nm处荧光信号特征值 I_{450} 的归一化荧光强度；对DES检测的标准曲线拟合为 $y_2=0.1267x_2+0.2432$ ， $R^2=0.9958$ ，检测范围为0.025-250ng/mL，检测限为0.0131ng/mL，其中 x_2 为DES浓度对数值， y_2 为541nm处荧光信号特征值 I_{541} 的归一化荧光强度。

应用实施例1

本实施例中，待测样本为海水。

采集海域沿岸的原始海水样本，在4000rpm离心10min后保留上清液，进一步将海水上清液用0.45 μ m滤膜过滤以去除杂质，并用于检测。

使用上转换发光的微流体生物传感平台进行检测，测定得到的荧光信号特征值 I_{450} 和荧光信号特征值 I_{541} 分别为0.3592和0.6720，带入标准曲线计算得到海水样本中DES和BPA含量分别为8.24ng/mL和9.18ng/mL。

为验证本发明检测方法的准确性，按照中国国家标准GB31660.2-2019规定，对相同的实验样本使用气相色谱-质谱联用方法（GC-MS）进行测定。使用GC-MS建立BPA检测标准曲线为 $y_3=721.83x_3-6218.20$ ， $R^2=0.9947$ ，其中 x_3 为BPA浓度， y_3 为BPA特征峰对应的峰面积；DES检测标准曲线为 $y_4=372.07x_4-2004.95$ ， $R^2=0.9953$ ，其中 x_4 为DES浓度， y_4 为DES特征峰对应的峰面积。

使用GC-MS方法进行检测，测定得到的DES特征峰对应的峰面积和BPA特征峰对应的峰面积分别为5585和7575，带入标准曲线计算得到海水样本中DES和BPA含量分别为8.16ng/mL和7.64ng/mL。

应用实施例2

本实施例中，待测样本为对虾。

将从超市购买得到的新鲜对虾样本，取5g可食用部分均质处理，并随机添加未知浓度的DES和BPA标准溶液；将对虾样本于50mL离心管中加碳酸钠溶液3mL、乙酸乙酯20mL，涡旋混匀，超声提取10min；随后于4000r/min离心10min，取上清液至100mL梨形瓶中；残渣用乙酸乙酯10mL重复提取一次，合并两次离心的上清液，于40℃旋转蒸发至干，用体积分数为50%环己烷乙酸乙酯溶液5mL溶解残留物，并使用60mg/mL的固相萃取柱提取DES和BPA；最后将固相萃取柱的淋洗液用于检测。

使用上转换发光的微流体生物传感平台进行检测，测定得到的荧光信号特征值 I_{450} 和荧光信号特征值 I_{541} 分别为0.3535和0.6801，带入标准曲线计算得到对虾样本中DES和BPA含量分别为7.42ng/mL和9.90ng/mL。

使用GC-MS方法进行检测，测定得到的DES特征峰对应的峰面积和BPA特征峰对应的峰面积分别为5315和11480，带入标准曲线计算得到对虾样本中DES和BPA含量分别为7.79ng/mL和9.71ng/mL。

应用实施例3

本实施例中，待测样本为鱼肉。

将从超市购买得到的新鲜鱼肉样本，取5g可食用部分均质处理，并随机添加未知浓度的DES和BPA标准溶液；将鱼肉样本于50mL离心管中加碳酸钠溶液3mL、乙酸乙酯20mL，涡旋混匀，超声提取10min；随后于4000r/min离心10min，取上清液至100mL梨形瓶中；残渣用乙酸乙酯10mL重复提取一次，合并两次离心的上清液，于40℃旋转蒸发至干，用体积分数为50%环己烷乙酸乙酯溶液5mL溶解残留物，并使用60mg/mL的固相萃取柱提取DES和BPA；最后将固相萃取柱的淋洗液用于检测。

使用上转换发光的微流体生物传感平台进行检测，测定得到的荧光信号特征值 I_{450} 和荧光信号特征值 I_{541} 分别为0.4462和0.6749，带入标准曲线计算得到鱼肉样本中DES和BPA含量分别为40.00ng/mL和9.43ng/mL。

使用GC-MS方法进行检测，测定得到的DES特征峰对应的峰面积和BPA特征峰对应的峰面积分别为31959和10527，带入标准曲线计算得到鱼肉样本中DES和BPA含量分别为36.01ng/mL和9.15ng/mL。

以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例

中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载范围。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权 利 要 求 书

1.一种基于上转换发光的微流体生物传感平台,其特征在于,包括:上转换发光的生物传感器,用于特异性识别 EDCs;以及微流体芯片,作为所述上转换发光的生物传感器与待测样本反应平台,用于集成所述上转换发光的生物传感器与待测样本的混合、反应、分离、检测;

所述微流体芯片,包括:进样池,用于所述上转换发光的生物传感器和待测样本进样;弧形通道,所述弧形通道的进料口同时连通于所述上转换发光的生物传感器的进样池和待测样本的进样池,待所述上转换发光的生物传感器和待测样本进入弧形通道后,弧形通道用于二者的混合和反应;分离通道,与所述弧形通道的出料口连通,用于反应结束后的所述上转换发光的生物传感器的磁分离;检测池,与所述分离通道的出料口连通,用于完成发光增强定量检测 EDCs。

2.一种如权利要求 1 所述上转换发光的生物传感器的制备方法,其特征在于,所述上转换发光的生物传感器的制备方法包括如下步骤:

S1、制备含有稀土元素的上转换纳米粒子种子(CUCNPs);

S2、步骤 S1 制备得到的 CUCNPs 外层进行包覆处理,制备得到具有核壳结构的上转换纳米粒子(CSUCNPs);

S3、改性步骤 S2 制备得到的 CSUCNPs 为亲水性;

S4、将步骤 S3 得到的亲水性 CSUCNPs 生物分子功能化,得到生物分子功能化 CSUCNPs;

S5、制备磁性纳米粒子(MNPs);

S6、将步骤 S5 得到的 MNPs 生物分子功能化,得到生物分子功能化 MNPs;

S7、步骤 S4 得到生物分子功能化 CSUCNPs 和步骤 S6 得到生物分子功能化 CSUCNPs 相结合,制备得到所述上转换发光的生物传感器。

3.根据权利要求2所述上转换发光的生物传感器的制备方法,其特征在于:步骤S1的过程为,

分别取六水合氯化钇、六水合氯化镱和六水合稀土元素溶解于甲醇中,之后加入油酸和1-十八稀,混合后加热至150-170°C反应25-35min,反应结束冷却后,滴加氢氧化钠和氟化铵的混合溶液,并于125-135°C反应25-35min,随后升温至290-310°C保持50-60min;反应结束后,加入乙醇和超纯水离心分离得到上转换纳米粒子种子(CUCNPs);

所述稀土元素为钪时,六水合氯化钇、六水合氯化镱和六水合稀土元素的比例为

0.78:0.2:0.02; 或

所述稀土元素为铈时, 六水合氯化钇、六水合氯化镱和六水合稀土元素的比例为0.795:0.2:0.005。

4.根据权利要求2所述上转换发光的生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤S2的过程为,

取六水合氯化钇溶解于甲醇中, 之后加入油酸和1-十八烯, 混合后加热至150-170°C反应25-35min; 反应结束冷却后, 加入步骤S1制备得到的CUCNPs, 并滴加氢氧化钠和氟化铵的混合溶液, 并于125-135°C反应25-35min, 随后升温至290-310°C保持20-40min; 反应结束后, 加入乙醇和超纯水离心分离得到核壳上转换纳米粒子(CSUCNPs)。

5.根据权利要求2所述上转换发光的生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤S3的过程为,

取步骤S2制备得到的CSUCNPs加入三氯甲烷和甲苯的混合溶液中, 随后加入聚丙烯酸水溶液并密封, 剧烈搅拌反应; 结束后使用乙醇和超纯水清洗并离心, 得到具有亲水性的聚丙烯酸修饰的CSUCNPs (PAA-CSUCNPs)。

6.根据权利要求2所述上转换发光的生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤S4的过程为,

取步骤S3制备得到的PAA-CSUCNPs, 加入含有碳酰二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的吗啉乙磺酸缓冲溶液中, 进行第一次孵育; 孵育结束后, 离心分离得到活化的PAA-CSUCNPs, 并分散在磷酸盐缓冲液中; 向溶液中加入链霉亲和素溶液, 进行第二次孵育; 孵育结束后, 离心分离得到修饰链霉亲和素的CSUCNPs, 并分散在磷酸盐缓冲液中; 随后加入5'端修饰生物素的EDCs适配体, 进行第三次孵育; 孵育结束后离心分离得到修饰适配体的CSUCNPs, 并重新分散在磷酸盐缓冲液中; 随后加入牛血清白蛋白溶液, 进行第四次孵育; 孵育结束后离心分离, 并使用磷酸盐缓冲液清洗, 制备得到生物分子功能化的CSUCNPs。

7.根据权利要求2所述上转换发光的生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤S5的过程为,

分别取六水合氯化铁、二水合柠檬酸三钠、醋酸钠加入乙二醇溶液中, 剧烈搅拌充分溶解后, 转移到反应釜中, 高温反应; 反应结束通过磁场收集制备得到的磁性纳米粒子(MNPs), 并使用乙醇和超纯水清洗。

8.根据权利要求2所述上转换发光的生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤S6的过程

为,

取步骤S5制备得到的MNPs,加入含有碳酰二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的咪唑乙磺酸缓冲溶液中,进行第一次孵育;孵育结束后,磁分离得到活化的MNPs,并分散在磷酸盐缓冲液中;向溶液中加入链霉亲和素溶液,进行第二次孵育;孵育结束后,磁分离得到修饰链霉亲和素的MNPs,并分散在磷酸盐缓冲液中;随后加入5'端修饰生物素的EDCs适配体互补序列,进行第三次孵育;孵育结束后磁分离得到修饰适配体的MNPs,并重新分散在磷酸盐缓冲液中;随后加入牛血清白蛋白溶液,进行第四次孵育;孵育结束后磁分离,并使用磷酸盐缓冲液清洗,制备得到生物分子功能化的MNPs。

9.根据权利要求2所述上转换发光的生物传感器的制备方法,其特征在于:步骤S7的过程为,

取步骤S4制备得到的EDCs适配体修饰的CSUCNPs和步骤S6制备得到的EDCs适配体互补序列修饰的MNPs加入磷酸盐缓冲液中,高温加热;加热结束后缓慢退火,并转移至摇床孵育;孵育结束后,磁分离得到上转换发光的生物传感器,并使用磷酸盐缓冲液清洗三次,最后分散于磷酸盐缓冲液中。

10.一种如权利要求1所述基于上转换发光的微流体生物传感平台的使用方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

取0-250ng/mL一系列浓度的EDCs标准溶液,与制备的上转换发光生物传感器共同注射进入所述微流体芯片中,完成生物传感器与靶标EDCs的混合、反应、分离与检测步骤;

静置以完成脱落的CSUCNPs的桥连絮凝和沉降,通过荧光光谱仪采集检测池中沉降形成的CSUCNPs界面的荧光光谱,以EDCs标准溶液的浓度对数值和荧光信号特征值进行线性拟合,建立EDCs含量检测的标准曲线;所述荧光信号特征值为特异性识别EDCs的生物传感器使用的稀土元素的特征荧光发射光强;

取待测样本溶液,代替上述EDCs标准溶液,与生物传感器共同注射进入微流体芯片,将采集得到的荧光信号特征值代入标准曲线计算,得出待测样本中EDCs的含量。

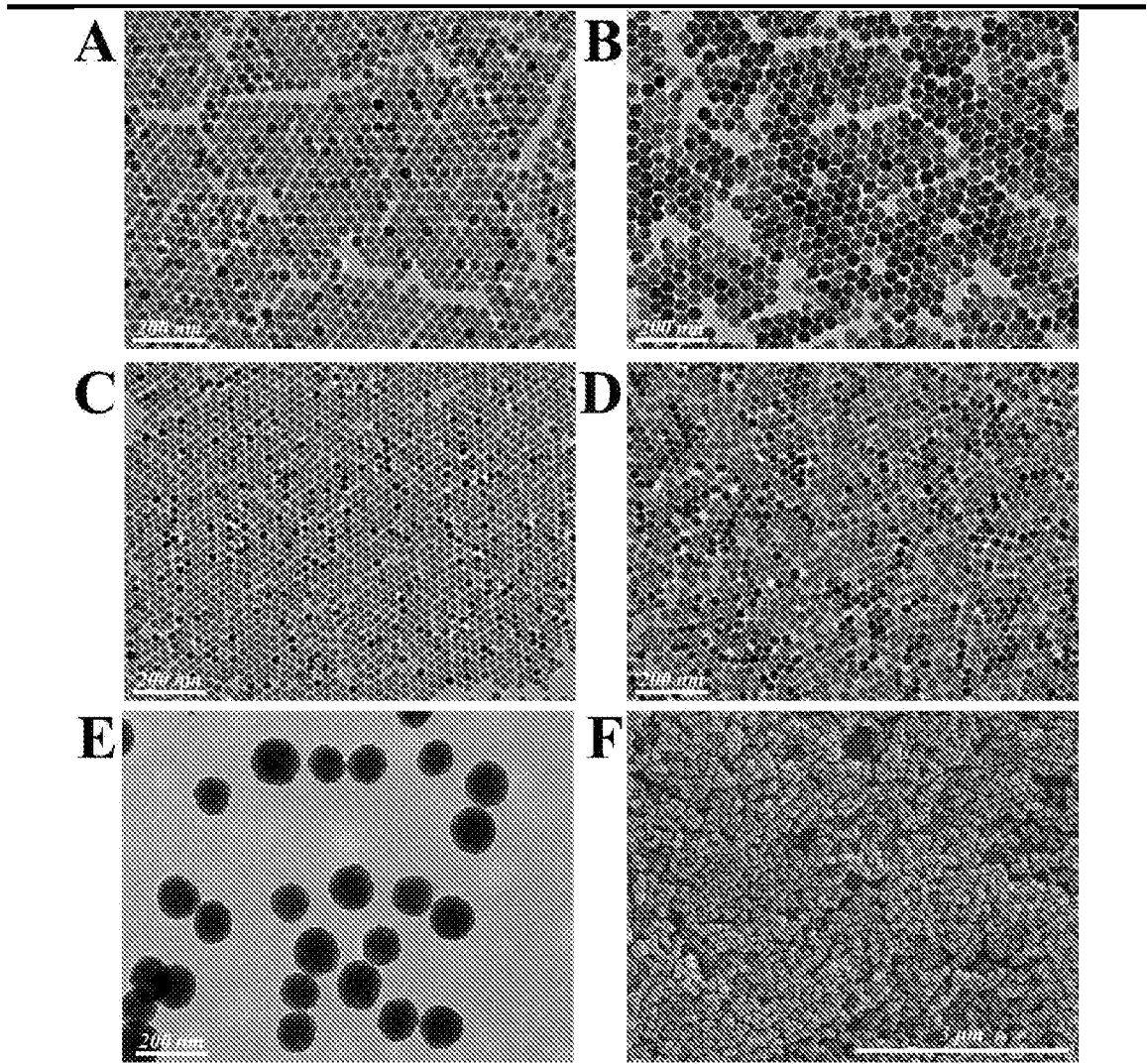


图 1

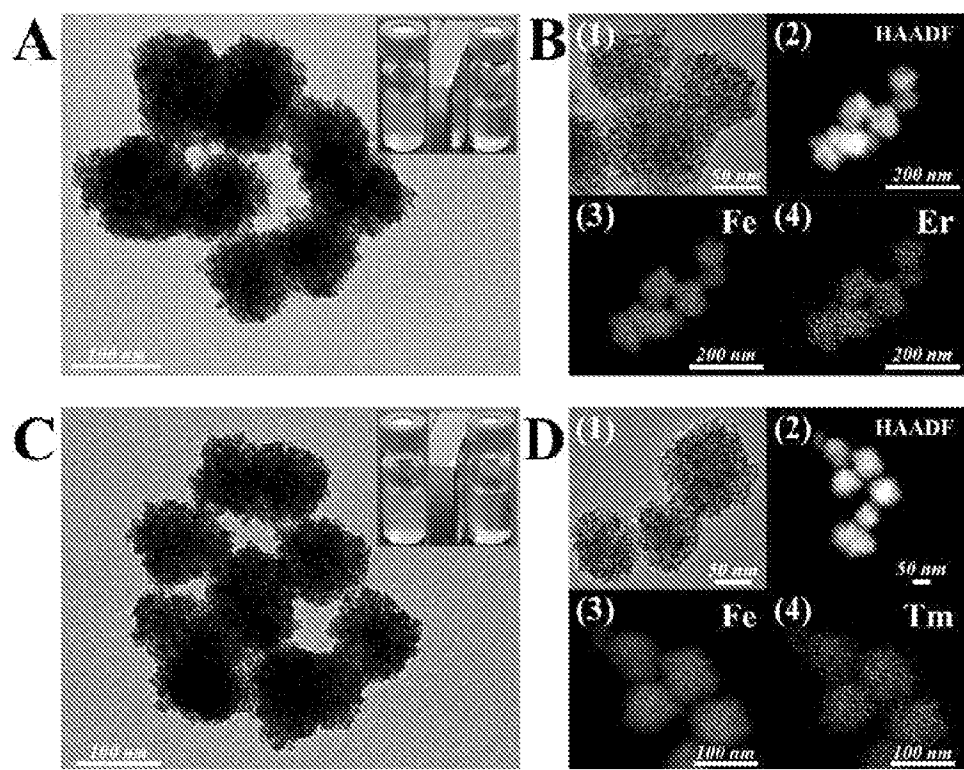


图 2

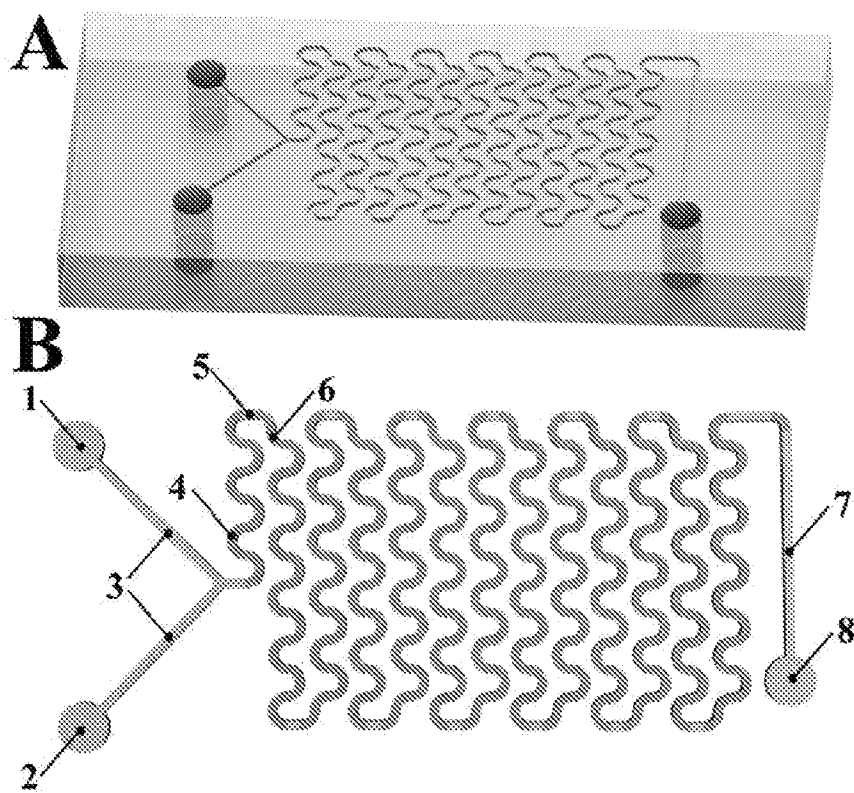


图 3

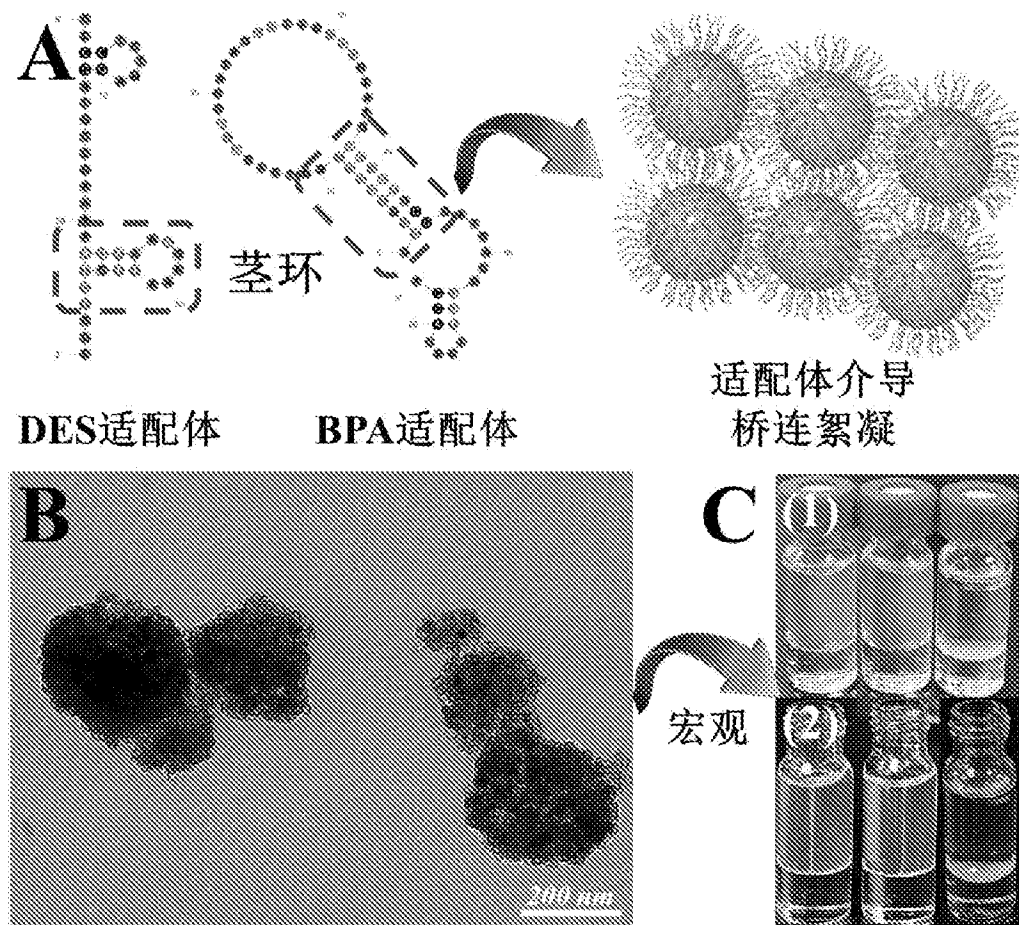


图 4

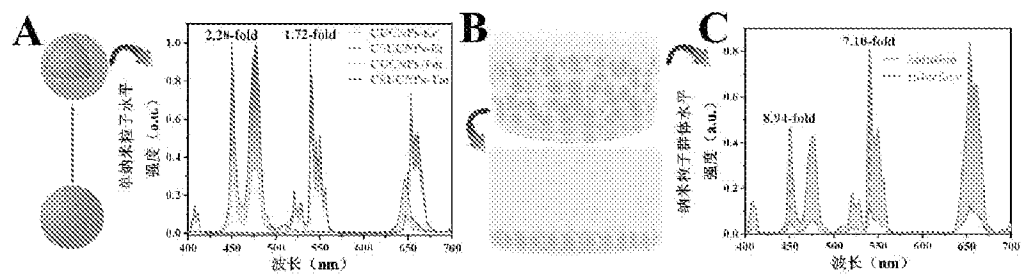


图 5

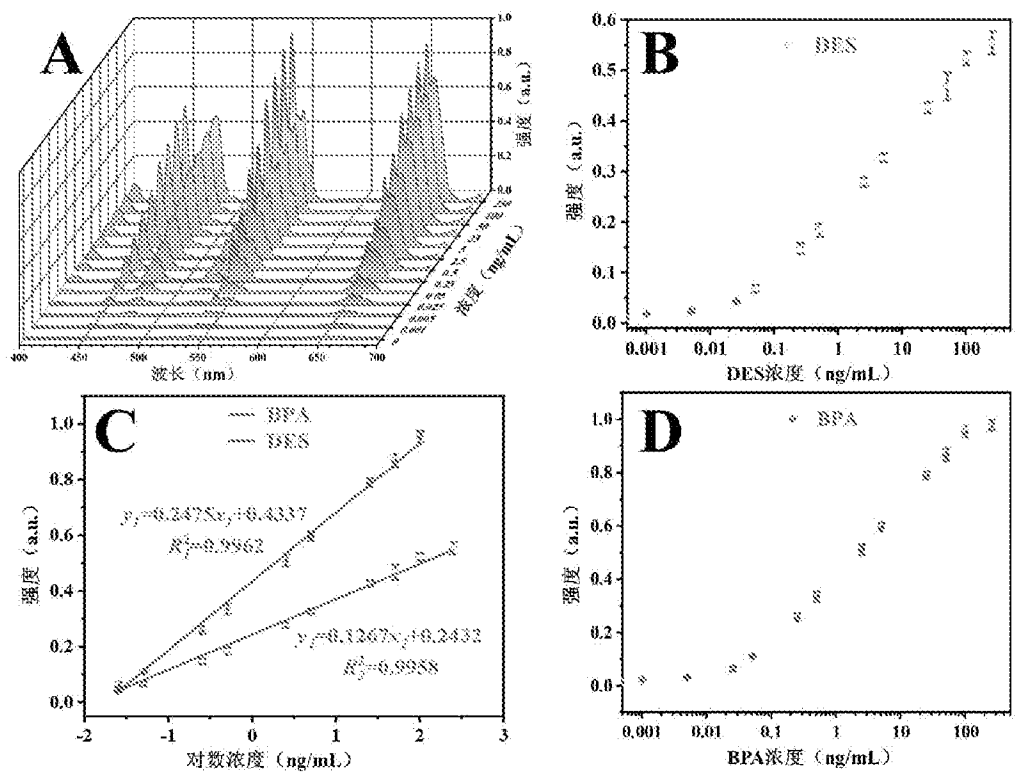


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/096734

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i; G01N33/50(2006.01)i; B01L3/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, CNKI, VEN, ENTXT, ISI: 上转换发光, 生物传感平台, 生物传感器, 内分泌干扰化学物, 微流体, 微流控, 弧形通道, 磁性纳米粒子, 桥连絮凝, up-conversion luminescence, biosensing platform, biosensor, endocrine-disrupting chemicals, EDCs, microfluidic, arc-shaped channel, magnetic nanoparticles, MNPs, bridging flocculation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 115791718 A (JIANGSU UNIVERSITY) 14 March 2023 (2023-03-14) abstract, claims 1-10, description, paragraphs 1-53, and figures 1-10	1
Y	KR 20100051497 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 17 May 2010 (2010-05-17) description, paragraphs 7 and 14-22, and figure 1	1
X	CN 115791718 A (JIANGSU UNIVERSITY) 14 March 2023 (2023-03-14) abstract, claims 1-10, description, paragraphs 1-53, and figures 1-10	2-9
Y	CN 115326768 A (JIMEI UNIVERSITY et al.) 11 November 2022 (2022-11-11) claims 1-10, description, paragraphs 5-183, and figures 1-9	1
Y	CN 110632168 A (XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY) 31 December 2019 (2019-12-31) description, paragraphs 38-58, and figures 1-6	1
Y	CN 113514488 A (YANGZHOU UNIVERSITY) 19 October 2021 (2021-10-19) description, paragraphs 5-21, 80-83, and 94-100, and figures 1-11	1



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 February 2024

Date of mailing of the international search report

05 February 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/096734

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 115266675 A (SHANGHAI 6TH PEOPLE'S HOSPITAL et al.) 01 November 2022 (2022-11-01) description, paragraphs 44-87, and figures 1-5	1
A	CN 106062210 A (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND) 26 October 2016 (2016-10-26) entire document	1-10
A	CN 111139288 A (YANGTZE NORMAL UNIVERSITY) 12 May 2020 (2020-05-12) entire document	1-10
A	WO 2016189141 A1 (UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA et al.) 01 December 2016 (2016-12-01) entire document	1-10
A	WEE, E. J. H. et al. "Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings" <i>Chemical Communications</i> , Vol. 51, No. 27, 07 April 2015 (2015-04-07), pages 5828-5831 entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/096734

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	115791718	A	14 March 2023	None			
KR	20100051497	A	17 May 2010	KR	101071449	B1	10 October 2011
CN	115326768	A	11 November 2022	None			
CN	110632168	A	31 December 2019	CN	110632168	B	19 November 2021
CN	113514488	A	19 October 2021	None			
CN	115266675	A	01 November 2022	None			
CN	106062210	A	26 October 2016	US	2017029881	A1	02 February 2017
				US	10465236	B2	05 November 2019
				JP	2017501719	A	19 January 2017
				WO	2015095929	A1	02 July 2015
				MX	2016008371	A	14 October 2016
				AU	2014373622	A1	28 July 2016
				AU	2014373622	B2	27 May 2021
				CA	2934641	A1	02 July 2015
				BR	112016014695	A2	08 August 2017
				EP	3087202	A1	02 November 2016
				EP	3087202	A4	05 July 2017
				EP	3087202	B1	14 October 2020
				IN	201617024556	A	31 August 2016
				HK	1230674	A0	08 December 2017
CN	111139288	A	12 May 2020	CN	111139288	B	21 March 2023
WO	2016189141	A1	01 December 2016	None			

A. 主题的分类

G01N21/64(2006.01)i; G01N33/50(2006.01)i; B01L3/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: G01N B01L

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNTXT, CNKI, VEN, ENTXT, ISI; 上转换发光, 生物传感平台, 生物传感器, 内分泌干扰化学物, 微流体, 微流控, 弧形通道, 磁性纳米粒子, 桥连絮凝, up-conversion luminescence, biosensing platform, biosensor, endocrine-disrupting chemicals, EDCs, microfluidic, arc-shaped channel, magnetic nanoparticles, MNPs, bridging flocculation

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 115791718 A (江苏大学) 2023年3月14日 (2023 - 03 - 14) 摘要, 权利要求1-10, 说明书第1-53段, 图1-10	1
Y	KR 20100051497 A (IND ACADEMIC COOP) 2010年5月17日 (2010 - 05 - 17) 说明书第7、14-22段, 图1	1
X	CN 115791718 A (江苏大学) 2023年3月14日 (2023 - 03 - 14) 摘要, 权利要求1-10, 说明书第1-53段, 图1-10	2-9
Y	CN 115326768 A (集美大学 等) 2022年11月11日 (2022 - 11 - 11) 权利要求1-10, 说明书第5-183段, 图1-9	1
Y	CN 110632168 A (西安交通大学) 2019年12月31日 (2019 - 12 - 31) 说明书第38-58段, 图1-6	1
Y	CN 113514488 A (扬州大学) 2021年10月19日 (2021 - 10 - 19) 说明书第5-21、80-83、94-100段, 图1-11	1

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年2月4日

国际检索报告邮寄日期

2024年2月5日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

胡晓佳

电话号码 (+86) 010-62085681

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 115266675 A (上海市第六人民医院 等) 2022年11月1日 (2022 - 11 - 01) 说明书第44-87段，图1-5	1
A	CN 106062210 A (昆士兰大学) 2016年10月26日 (2016 - 10 - 26) 全文	1-10
A	CN 111139288 A (长江师范学院) 2020年5月12日 (2020 - 05 - 12) 全文	1-10
A	WO 2016189141 A1 (UNIV BARCELONA AUTONOMA等) 2016年12月1日 (2016 - 12 - 01) 全文	1-10
A	E. J. H. Wee等. "Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA de- tection in resource-poor settings" Chemical Communications, 第51卷, 第27期, 2015年4月7日 (2015 - 04 - 07), 第5828-58 31页 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/096734

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	115791718	A	2023年3月14日	无	
KR	20100051497	A	2010年5月17日	KR	101071449 B1 2011年10月10日
CN	115326768	A	2022年11月11日	无	
CN	110632168	A	2019年12月31日	CN	110632168 B 2021年11月19日
CN	113514488	A	2021年10月19日	无	
CN	115266675	A	2022年11月1日	无	
CN	106062210	A	2016年10月26日	US	2017029881 A1 2017年2月2日
				US	10465236 B2 2019年11月5日
				JP	2017501719 A 2017年1月19日
				WO	2015095929 A1 2015年7月2日
				MX	2016008371 A 2016年10月14日
				AU	2014373622 A1 2016年7月28日
				AU	2014373622 B2 2021年5月27日
				CA	2934641 A1 2015年7月2日
				BR	112016014695 A2 2017年8月8日
				EP	3087202 A1 2016年11月2日
				EP	3087202 A4 2017年7月5日
				EP	3087202 B1 2020年10月14日
				IN	201617024556 A 2016年8月31日
				HK	1230674 A0 2017年12月8日
CN	111139288	A	2020年5月12日	CN	111139288 B 2023年3月21日
WO	2016189141	A1	2016年12月1日	无	