

基于纳米材料改良酶联免疫吸附法的研究进展

Research progress of improved enzyme-linked immunosorbent assay based on nanomaterials

张光胤^{1,2} 鲁 迨^{1,2} 邓放明^{1,2} 赵 倩^{1,2} 石星波^{1,2}

ZHANG Guang-yin^{1,2} LU Dai^{1,2} DENG Fang-ming^{1,2} ZHAO Qian^{1,2} SHI Xing-bo^{1,2}

(1. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha, Hunan 410128, China;

2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:文章重点总结了近年来基于纳米材料作为传统生物酶代替物,作为比色、荧光、电化学、光热效应、表面增强拉曼散射以及化学发光的信号底物构建的改良型 ELISA;对改良型 ELISA 发展方向以及所面临的挑战进行了分析,并展望了其应用前景。

关键词:酶联免疫吸附;信号输出;纳米;比色;荧光

Abstract: The recent development of improved ELISA was summarized. Nanomaterials as a substitute for traditional biological enzymes and signal substrates for colorimetry, fluorescence, electrochemistry, photothermal effects, surface enhanced Raman scattering, and chemiluminescence were also reviewed. Finally, the development direction and challenges of the improved ELISA were analyzed, and its application prospect was prospected.

Keywords: ELISA; signal; nanomaterials; colorimetry; fluorescence

酶联免疫吸附(ELISA)是一种基于抗原与抗体的特异性相结合,以及酶催化反应建立的方法,通过酶与抗体或抗原偶联形成酶偶联物,当抗原与抗体特异结合时,酶偶联物催化无色底物分子转化为易于检测的产物(例如有色产物)^[1]。通过底物信号的变化可以判断免疫反应是否发生,进而分析目标物(抗原、抗体)的浓度^[2]。由于操作简便,检测成本低,高通量且可以目测预判等优点,ELISA 已成为临床诊断、食品质量控制和环境监测等

领域公认的标准方法^[3]。但这种传统的 ELISA 检测性能在很大程度上取决于酶的催化活性和负载量。而传统的生物酶耐热性差、保质期短、容易失活等,并且酶负载量有限,导致其检测稳定性与灵敏度较差^[4]。

近年来,具有特殊的光、电、磁以及催化性质的新型纳米材料的成功合成为开发新型 ELISA 法带来了新的机遇。目前,关于改良型 ELISA 的研究较多^[5-6],如利用金纳米颗粒(AuNPs)作为比色信号底物与金纳米棒(AuNRs)酶载体的改良型 ELISA。但是,随着基于纳米材料构建的改良型 ELISA 的迅速发展,相关综述总结其进展尚未见报道。

文章拟聚焦基于纳米材料构建的改良型 ELISA,总结其在信号检测模式(如比色法、荧光法、电化学和光热传感)方面的研究进展,对其发展方向以及所面临的挑战进行展望与分析,为 ELISA 在生物分子检测方面提供新思路。

1 改良型比色 ELISA

1.1 基于纳米材料改良信号输出比色 ELISA

传统酶底物的颜色响应能力可以满足高浓度目标物的检测需求,但不适用于痕量目标物的高灵敏度检测。纳米材料特殊的光、电、磁以及催化性质,使其可以作为信号底物的替代物,以改善肉眼的视觉感知,适合超灵敏检测。

由于具有较大的摩尔消光系数和很强的局部表面等离子体共振(LSPR)效应,AuNPs 可以作为信号底物。其信号的产生主要基于 AuNPs 的聚集及原位生长。表面修饰的抗体、核酸以及化学配体可以触发金纳米颗粒的聚集。Jiang 等^[7]构建了辣根过氧化物酶(HRP)介导的碘化物催化的级联反应,以调节 AuNPs 的分散/聚集。由图 1 可知,在过氧化氢(H_2O_2)存在下,通过在抗体上

基金项目:湖南省教育厅一般项目(编号:18C0131);湖南省自然科学基金面上项目(编号:2019JJ40115);中国博士后科学基金项目(编号:2018M642980)

作者简介:张光胤,男,湖南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:邓放明(1962—),男,湖南农业大学教授,博士。

E-mail: Fmdenghnau@sina.com;

赵倩(1989—),女,湖南农业大学副教授,博士。

E-mail: zhaoqian@hunau.edu.cn

收稿日期:2020-01-09

修饰的 HRP 将碘化物氧化为碘单质,从而发生半胱氨酸诱导的金纳米粒子聚集,使溶液由红色变为蓝色。与基于 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的 ELISA 相比,这种级联反应可使肉眼读出的灵敏度提高 20 倍。此外,

Huang 等^[8]通过氧化氢酶(CAT)调节 H_2O_2 浓度介导的 AuNPs 生长开发的改良型 ELISA 对赭曲霉毒素 A (OTA)表现出极高的灵敏度,检测限为 5×10^{-20} g/mL,比常规 ELISA(10^{-11} g/mL)低 8 个数量级。

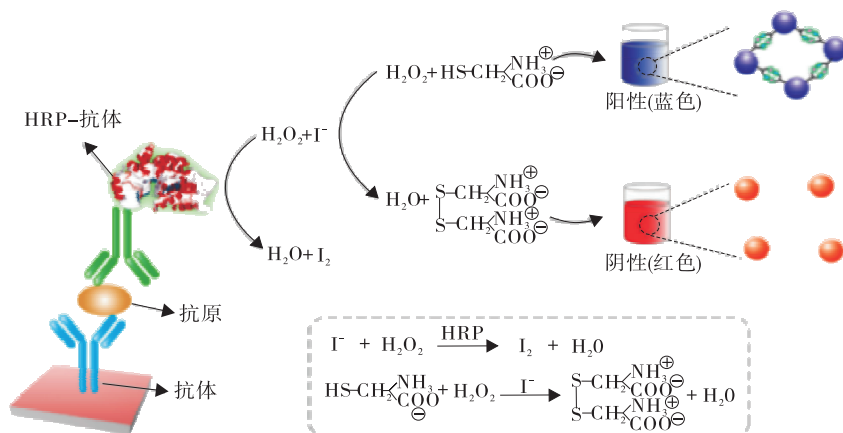


图 1 基于 HRP 介导的 AuNPs 可视 ELISA 示意图^[7]

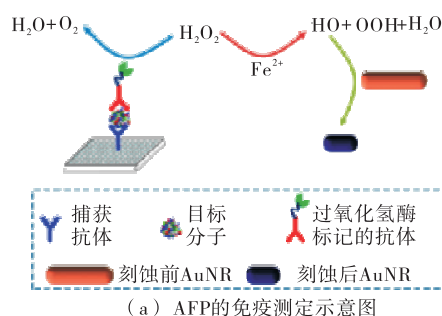
Figure 1 Schematic diagram of HRP-mediated AuNPs visual ELISA

与球形 AuNPs 相比, AuNRs 对周围电介质环境的变化反应更加灵敏,且具有更好的呈色性能^[9-10]。研究^[11]表明,一些氧化剂从 AuNRs 的末端开始刻蚀,使 AuNRs 出现不同长宽比以呈现不同的颜色。根据这一现象, AuNRs 作为信号输出底物广受研究者的青睐^[12]。Ma 等^[13]利用 Fe^{2+} 离子充当催化剂,催化 H_2O_2 歧化以产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$),进而刻蚀 AuNRs,开发了一种用于检测甲胎蛋白(AFP)的改良型 ELISA。利用固定在 96 孔板表面的单克隆抗体捕获抗原(靶分子/蛋白质),过氧化氢酶标记的多克隆抗体与抗原结合,在平板表面形成“抗体—抗原—第二抗体”夹心复合物[图 2(a)]。附着在板表面的过氧化氢酶起催化剂作用,催化 H_2O_2 分解为水和氧气。在没有 AFP 的情况下, Fe^{2+} 催化 H_2O_2 歧化产生 $\cdot\text{OH}$ 刻蚀 AuNRs 使溶液的颜色为黄色,随着 AFP 浓度的增加,溶液颜色逐渐由黄色变为无色,再变为粉色、绿色、橙色[图 2(b)]。AFP 的可视检查动态范围为 0~120 ng/mL,可视检测限为 5.0 ng/mL。

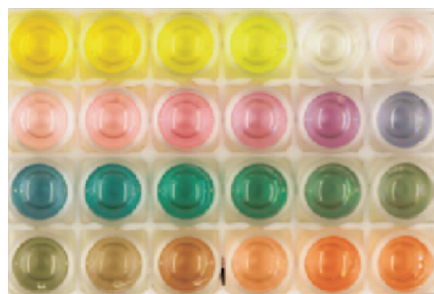
由于其良好的光学性能, AuNPs、AuNRs、金纳米星(AuNS)^[14]、金纳米双锥体(Au NBP)^[15]、银纳米颗粒(AgNPs)^[16]、三角银纳米棱镜(AgNPR)^[17] 被作为信号底物以改良比色 ELISA。这类纳米材料用于显色底物,其颜色信号输出丰富改善了比色 ELISA 的可视检测能力和检测灵敏度。

1.2 基于纳米酶的改良型比色 ELISA

纳米酶具有易于制备,坚固耐用,稳定性好,可调节催化特性,增强夹心比色法的检测灵敏度和效率等多种优势。这些基于纳米酶的夹心比色法不仅可以检测蛋白



(a) AFP 的免疫测定示意图



(b) 溶液颜色随 AFP 浓度的变化

图 2 基于 AuNRs 构建的改良型 ELISA 示意图^[18]

Figure 2 Schematic diagram of improved ELISA based on AuNRs

质,还有检测其他生物分子的潜在应用空间。基于纳米酶的过氧化物酶活性, Huang 等^[18]以金纳米簇(AuNCs)作为纳米酶,以 AuNPs 作为显色底物,设计了一种用于 T3 甲状腺激素检测的改良型 ELISA (图 3)。利用 AuNCs 催化 H_2O_2 分解,在 HAuCl_4 存在的情况下,得到不同颜色的 AuNPs。该传感器拥有超高的灵敏度,实现了

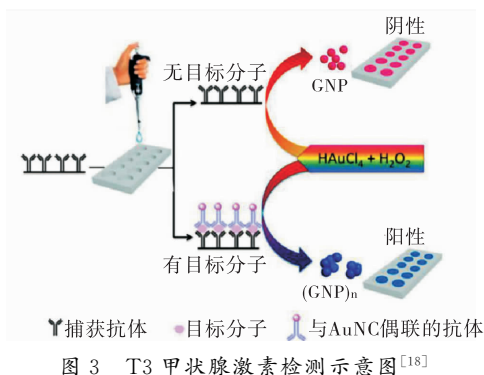


Figure 3 Schematic diagram of T3 thyroid hormone detection

T3 甲状腺激素的痕量检测,检测限为 2.0×10^{-15} mg/mL。此类改良型 ELISA 不但简化了系统,还降低了成本,利于实际应用。

此外,基于 AgNPs 的比色传感器具有更高的消光系数和更低的价格等优势^[19-20],已被广泛用于生物分子的比色测定。Chen 等^[21]利用 3D-MnO₂-PEG 纳米花和 4-巯基苯甲酸与三聚氰胺改性的银纳米颗粒(4-MBA-MA-AgNPs)设计了一种改良型 ELISA,用于检测肠道病毒 71 型(EV71)(图 4)。采用 3D-MnO₂-PEG 代替酶,并修饰抗体;捕获目标物后,利用 V_C 还原 3D-MnO₂-PEG,释放 Mn²⁺;加入 4-MBA-MA-AgNPs,通过 Mn²⁺ 聚集 AgNPs,溶液颜色和紫外-可见光谱发生变化,通过还原反应释放 Mn²⁺ 以提高检测灵敏度。

2 改良型荧光 ELISA

Albert 等^[22-23]提出了荧光免疫概念,并应用于肺炎球菌的检测。近年来,基于新型荧光纳米材料的改良型 ELISA 和荧光免疫测定(FELISA)引起了研究人员的广泛关注。由于量子点(QD)特有的光学特性、高光稳定性以及尺寸和形状可调等优点,引起了研究人员对提高 FELISA 灵敏度的关注^[24-26]。Xu 等^[27]基于 CAT 调控的 CdTe QD 荧光转换,开发了一种竞争型 FELISA,用于检测伏马毒素 B₁(FB₁)(图 5)。巯基丙酸修饰的 CdTe 量

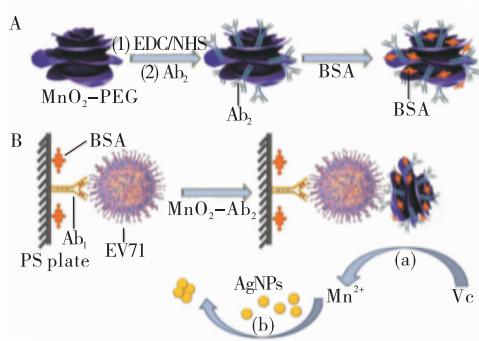


Figure 4 Schematic diagram of EV71 immunoassay

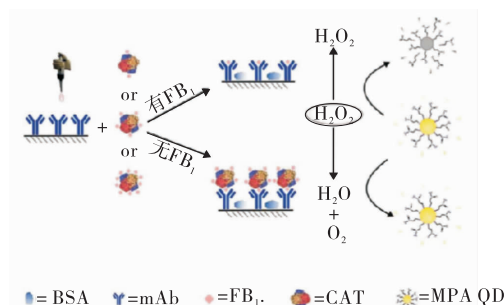


Figure 5 Schematic diagram of FB₁ detection by ELISA

子点(MPA-QD)的荧光被 H₂O₂ 淬灭,CAT 作为竞争性抗原的载体,调节 H₂O₂ 的浓度实现对目标物的检测。若体系中不存在 FB₁,CdTe QD 的荧光被 H₂O₂ 淬灭;若样品中存在 FB₁,则体系中存在 CAT,H₂O₂ 被分解,CdTe QD 的荧光不会被淬灭。检测限为 0.33 ng/mL,为基于 HRP 的传统 ELISA 的 1/15。

作为新兴材料,碳点(CDs)具有易于合成、成本低、无毒和良好的生物相容性等优点,其荧光特性和过氧化物酶特性被广泛用于免疫测定^[28-31]。Dong 等^[32]利用 CDs 的荧光特性和 MnO₂ NSs 的淬灭特性,建立了一种新型的 FELISA。该方法中荧光 CDs 和 MnO₂ NSs 通过静电吸附结合,由于 CDs 和 MnO₂ NSs 之间的荧光能量转移(FRET),CDs 的荧光被淬灭。碱性磷酸酶(ALP)催化抗坏血酸 2-磷酸酯(AAP)水解产生的 AA 可将 MnO₂ NSs 还原为 Mn²⁺,释放 CDs。基于这种荧光“开启”机制,FELISA 实现了金刚烷胺的检测,检测限达 0.035 ng/mL。此外,利用 CDs 的荧光特性与过氧化物酶特性,开发了一种结合荧光与比色的改良型 ELISA 法用于检测 AFP^[29](图 6)。将 CDs 与抗 AFP 抗体(Ab₂)通过戊二醛胺-胺偶联,当 AFP 存在时,加入 Ab₂后形成夹心复合物。基于 CDs 的荧光特性,夹心免疫复合物的荧光强度与 AFP 浓度呈正相关,检测范围为 0~350 ng/mL,R²为 0.995。而传统免疫分析使用 HRP 的 R²为 0.964,荧光素异硫氰酸酯(FITC)的 R²为 0.973,表明 CDs 具有很大的潜力,可用于免疫分析的生物标记。

Tan 等^[33]将 Pd-Ir 纳米立方体作为纳米酶及 CDs 信号读出底物有机结合,开发了检测心肌钙蛋白 I(cTnI)的 FELISA(图 7)。在 H₂O₂ 存在的情况下,纳米酶催化邻苯二胺(OPD)转化为其氧化物(O_x-OPD),在 400 nm 激发波长下,570 nm 处有发射峰,O_x-OPD 可吸附于 CDs 表面上,淬灭 CDs 的荧光。在 cTnI 存在的情况下,O_x-OPD 在 570 nm 处的荧光峰增加,同时 CDs 在 450 nm 处的荧光峰减少,从而形成比例荧光信号用于 cTnI 的定量,FELISA 的检测限为 0.31 pg/mL。同理,Zhu 等^[34]利用 Au@Pt 纳米材料作为 OPD 氧化的纳米酶,O_x-OPD 的

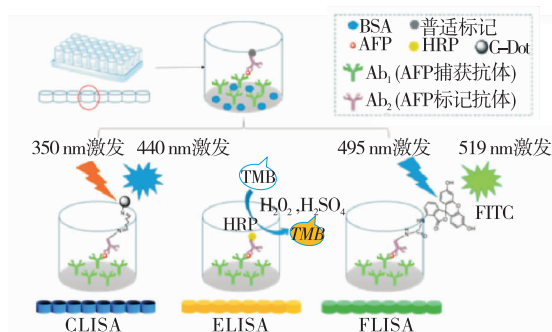
图 6 免疫吸附示意图^[29]

Figure 6 Schematic diagram of immunoabsorption

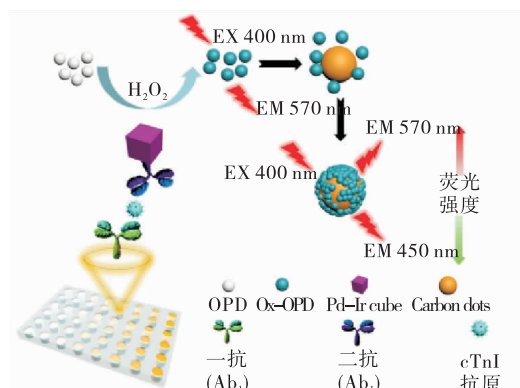
图 7 基于 Pd-Ir 纳米酶与 CDs 的荧光免疫测定示意图^[33]

Figure 7 Schematic diagram of fluorescent immunoassay based on Pd-Ir nanozyme and CDs

颜色变化实现了比色检测,而双发射峰的荧光变化实现了 cTnI 的荧光检测。因此,纳米酶和纳米底物共同构建的 FELISA 可为生物分子检测提供准确、灵敏的免疫测定。

3 其他改良型 ELISA

近年来,除比色法和荧光法外,还探索了其他方法来改良 ELISA,如电化学免疫测定(ECLISA)、光热效应技术(PTE)、表面增强拉曼散射技术(SERS)和化学发光免疫测定(CLIA)。这些技术与 ELISA 结合可得到更加灵敏和便捷的方法,满足痕量检测与降低成本的要求。

3.1 基于电化学免疫分析的改良型 ELISA

作为快速现场检测中最有前途的方法,电化学免疫测定法既具有电化学传感器价格低廉、携带方便、灵敏度高,又具有免疫分析工具便于操作和高选择性,弥补了传统 ELISA 灵敏度不足、背景高和成本高的缺陷^[35-37]。纳米级 PbS 胶体(PbS CSs)被成功应用于新型 ECL ELISA 的构建,实现了人附睾蛋白 4 (HE4) 的超灵敏检测^[38]。将修饰了抗体的富勒烯-壳聚糖(C60-Chit)纳米复合物固定于玻璃碳电极(GCE),扩大了 Pb^{2+} 的检测灵敏度;夹

层结构形成后,可从 PbS CSs 释放的 Pb^{2+} 侧面反映 HE4 的浓度,其检测限为 3.4 fg/mL。Knopp 等^[39-41]开发了一种基于气体的非接触式电化学生物传感器,实现了传感器的重复使用,还提高了精度、稳定性和可重复性。将氢(H_2)和钯(Pd)纳米材料结合,构建了基于气体的电化学生物传感器, H_2 与 Pd 反应形成 PdH_x ,增加 Pd 电阻。氧气的干扰是传感器的固有局限性,为了减轻氧对灵敏度的影响,Knopp 等^[42]构建了一种改良的 ELISA 传感平台。以包裹在 Pd 纳米线表面的沸石咪唑盐骨架(ZIFs-67)作为检测探针,与抗 AFP 抗体偶联用于 AFP 检测,由于氧不能透过 ZIFs-67,其检测限达 0.04 ng/mL^[43]。

3.2 基于光热效应的改良型 ELISA

近年来,光热纳米材料的光热效应(PTEs)是改良型 ELISA 的研究热点之一^[44-45],以光热纳米材料为基础已开发了使用普通温度计对目标进行定量读取的光热免疫测定法(PTIA)^[46]。同时,使用温度计作为信号读出系统的改良型 ELISA 也得到了广泛发展,如将 Fe_3O_4 NP 锚定在功能化的氧化石墨烯上并偶联 DNA 制备成检测探针,无目标物 PSA 时,DNA 与 PSA 适配体之间的杂交反应捕获信号探针, Fe_3O_4 NP 转化为普鲁士蓝纳米颗粒(PB),通过 808 nm 激光辐照将生物信号转化为热信号,实现 PSA 定量检测,检测限为 0.31 ng/mL^[47]。Jiao 等^[48]利用 Au@Pt 纳米枝晶介导的多模信号输出,开发了一种改良型 ELISA。基于其过氧化物酶活性实现了比色及荧光信号读出,同时因 Au@Pt 较强的光热效应,实现了 808 nm 照射下的热信号读出,完成了 cTnI 的定量免疫分析。

3.3 基于表面增强拉曼散射的改良型 ELISA

基于表面增强拉曼散射(SERS)的技术具有抗光漂白、较少的背景干扰、高灵敏度以及较好的稳定性^[49]。这些优势使 SERS 在生物学分析中具有潜在的应用前景^[50-53]。近年来,Yang 等^[54]将 SERS 技术与 ELISA 结合,开发了一种改良型 ELISA 检测 PSA。该方法利用 $Cu_{2-x}S_ySe_{1-y}$ 纳米颗粒作为纳米酶,催化 $C\equiv C-PEG_2CH_2CH_2NH_2$ 和 $N_3-PEG_3-CH_2CH_2NH_2$ 的点击化学反应,有效避免了光漂白以及背景对结果的影响。Su 等^[55]利用结合了 AuNPs 的共价有机骨架(COF)复合材料作为纳米酶,催化 4-硝基苯硫酚(4-NTP)还原转化为 4-氨基苯硫酚(4-ATP),构建了一种新型 SERS-ELISA。在 $NaBH_4$ 存在的情况下,新产生的 4-ATP 与 AuNS 触发了拉曼信号“开启”实现了 β -乳球蛋白的高灵敏检测,其检测限达 0.01 ng/mL。

3.4 基于化学发光免疫分析的改良型 ELISA

化学发光免疫测定(CLIA)是基于底物吸收化学反应产生的能量转化为化学发光的方法^[56-57]。由于其背景干扰小,能有效避免背景光和光漂白,具有高灵敏度和

宽线性范围的优点,已广泛应用于生物传感器和生物医学检测领域^[58-59]。Yang 等^[60]利用亲和素化的磁纳米颗粒(SA-MNP)开发了一种 CLIA 方法。在免疫球蛋白(rIgG)存在的情况下,加入 $K_4Fe(CN)_6$ 使磁颗粒表面生成 PB,提高了 PB 过氧化物酶样活性,使鲁米诺的 CL 信号增强,且 CL 强度与 rIgG 的浓度呈正相关,其检测限分别为 0.28 ng/mL,0.044 pmol。

4 总结与展望

文章简要分析了传统 ELISA 作为检测手段的局限性,重点总结了近年来基于纳米材料开发的改良型 ELISA 方法。其中,以贵金属纳米材料(如金纳米颗粒、金纳米棒、银纳米颗粒等)作为底物输出多色信号的策略已在很大程度上提高了比色 ELISA 的肉眼检测能力和检测灵敏度。以纳米酶替代传统生物酶为特点的新型 ELISA 不仅弥补了传统 ELISA 中酶的耐热性差、保质期短、容易失活的缺陷,也为提高测定灵敏度和稳定性,缩短测定时间等方面提供了解决思路,且检测策略相对简单、价格便宜,展现出了较大的应用前景。

虽然各种改良型 ELISA 在临床医学、环境测量和食品行业中广泛应用,但对改良型 ELISA 的研究还存在以下不足:

(1) 纳米底物的引入很大程度上提高了比色 ELISA 的检测灵敏度,但对于分析物浓度的微小变化导致的色度变化还难以区分。因此,提高纳米底物对微小浓度变化的响应能力,制备出响应性能更佳,选择性更好的纳米底物,将是未来一个重要的研究方向。

(2) 基于荧光的 ELISA 已被广泛应用于改良型 ELISA,且具有较高的灵敏度,但在如何克服其他基质背景干扰,荧光探针的光漂白现象,以及荧光涨落及淬灭现象方面需进一步开发研究。

(3) 新兴的信号(电化学信号、光热效应、表面增强拉曼和化学发光)有足够的稳定性、准确性、较高的灵敏度以及低背景信号的优点,但其策略相对复杂,需要特定的设备与专业人员的操作,不能满足现场快速检测的要求。若能与智能手机,便携式、高分辨率检测器结合使用,有望实现便携式信号读取,进而满足现场即时检测需求。

参考文献

[1] ENGVALL E, PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G[J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(9): 871-874.

[2] 曹金博, 胡晓飞, 王耀, 等. 土霉素完全抗原的制备及 ELISA 检测方法的建立[J]. *食品与机械*, 2019, 35(9): 77-83.

[3] 尚淑娜, 生威, 王璐璐, 等. 间接竞争 ELISA 检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯[J]. *食品与机械*, 2019, 35(5): 67-

71, 155.

[4] RENNARD S I, BERG R, MARTIN G R, et al. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components[J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, 104(1): 205-214.

[5] LIU Ding-bin, YANG Jie, WANG He-fang, et al. Glucose oxidase-catalyzed growth of gold nanoparticles enables quantitative detection of attomolar cancer biomarkers[J]. *Analytical chemistry*, 2014, 86(12): 5 800-5 806.

[6] ALEX S A, CHANDRASEKARN N, MUKHERJEE A. Gold nanorod-based fluorometric ELISA for the sensitive detection of a cancer biomarker[J]. *New Journal of Chemistry*, 2018, 42(19): 15 852-15 859.

[7] XIANYU Yun-lei, CHEN Yi-ping, JIANG Xing-yu. Horseradish peroxidase-mediated, Iodide-catalyzed cascade reaction for plasmonic immunoassays [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(21): 10 688-10 692.

[8] HUANG Xiao-lin, CHEN Rui, XU Heng-yi, et al. Nanospherical brush as catalase container for enhancing the detection sensitivity of competitive plasmonic ELISA [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(3): 1 951-1 958.

[9] JANA N R, GEARHEART L, MURPHY C J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratioElectronic supplementary information (ESI) available; UV-VIS spectra of silver nanorods[J]. *Chemical Communications*, 2001(7): 617-618.

[10] WANG Chun-gang, IRUDAYARAJ J. Gold nanorod probes for the detection of multiple pathogens[J]. *Small*, 2008, 4(12): 2 204-2 208.

[11] LIU Xin, ZHANG Shu-yu, TAN Peng-ling, et al. A plasmonic blood glucose monitor based on enzymatic etching of gold nanorods[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(18): 1 856-1 858.

[12] MA Xiao-ming, LIN Yue, GUO Long-hua, et al. A universal multicolor immunosensor for semiquantitative visual detection of biomarkers with the naked eyes[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 87: 112-118.

[13] MA Xiao-ming, CHEN Zhi-tao, KANNAN P, et al. Gold nanorods as colorful chromogenic substrates for semiquantitative detection of nucleic acids, proteins, and small molecules with the naked eye[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(6): 3 227-3 234.

[14] LIU Ya-hua, PAN Min, WANG Wen-xiao, et al. Plasmonic and photothermal immunoassay via enzyme-triggered crystal growth on gold nanostars [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 2 086-2 092.

[15] XU Shao-hua, OUYANG Wen-jun, XIE Pei-si, et al. Highly uniform gold nanobipyramids for ultrasensitive colorimetric detection of influenza virus[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 87(3): 1 617-1 623.

- [16] GAO Jing, JIA Min-na, XU Ying-ying, et al. Prereduction-promoted enhanced growth of silver nanoparticles for ultra-sensitive colorimetric detection of alkaline phosphatase and carbohydrate antigen 125[J]. *Talanta*, 2018, 189: 129-136.
- [17] LIANG Jia-jie, YAO Cui-ze, LI Xiu-qing, et al. Silver nanoprism etching-based plasmonic ELISA for the high sensitive detection of prostate-specific antigen [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 69: 128-134.
- [18] ZHAO Qian, HUANG Hao-wen, ZHANG Ling-yang, et al. Strategy to fabricate naked-Eye readout ultrasensitive plasmonic nanosensor based on enzyme mimetic gold nano-clusters[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(2): 1 412-1 418.
- [19] WEI Hui, CHEN Chao-gui, HAN Bing-yan, et al. Enzyme colorimetric assay using unmodified silver nanoparticles[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(18): 7 051-7 055.
- [20] WANG Li-li, ZHENG Jing, LI Yin-hui, et al. AgNP-DNA @GQDs Hybrid: New approach for sensitive detection of H_2O_2 and glucose via simultaneous AgNP etching and DNA cleavage[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(24): 12 348-12 354.
- [21] CHU Cheng-chao, GE Sheng-xiang, ZHANG Jing, et al. Enzyme-free colorimetric determination of EV71 virus using a 3D-MnO₂-PEG nanoflower and 4-MBA-MA-AgNPs[J]. *Nanoscale*, 2016, 8(36): 16 168-16 171.
- [22] COONS A H, CREECH H J, JONES R N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1941, 47(2): 200-202.
- [23] COONS A H, KAPLAN M H. Localization of antigen in tissue cells; II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1950, 91(1): 1-13.
- [24] MEDINTZ I L, UYEDA H T, GOKDMANE R, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing[J]. *Nature Materials* volume, 2005, 4(6): 435-446.
- [25] SMITH A M, NIE Shu-ming. Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots[J]. *The Analyst*, 2004, 129(8): 672-677.
- [26] SUN Hu-bo, WANG Meng-meng, WANG Ji-long, et al. Development of magnetic separation and quantum dots labeled immunoassay for the detection of mercury in biological samples [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015, 30: 37-42.
- [27] LU Tian-ying, ZHAN Sheng-nan, ZHOU Yao-feng, et al. Fluorescence ELISA based on CAT- regulated fluorescence quenching of CdTe QDs for sensitive detection of FB₁ [J]. *Analytical Methods*, 2018, 10(48): 5 797-5 802.
- [28] WANG Duo, LIN Bi-xia, GAO Yu-juan, et al. A highly selective and sensitive fluorescence detection method of glyphosate based on an immune reaction strategy of carbon dots labeled antibody and antigen magnetic beads [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64 (30): 6 042-6 050.
- [29] WU Yuan-yuan, WEI Peng, PENG PUMKIAT S, et al. Development of a carbon dot (C-dot) -linked immunosorbent assay for the detection of human α -fetoprotein[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(16): 8 510-8 516.
- [30] YAO Wen-song, WU Na-mei, LIN Zhen, et al. Fluorescent turn-off competitive immunoassay for biotin based on hydrothermally synthesized carbon dots[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(3): 907-914.
- [31] YANG Lu, DENG Wen-fang, CHENG Chang, et al. Fluorescent immunoassay for the detection of pathogenic bacteria at the single-cell level using carbon dots-encapsulated breakable organosilica nanocapsule as labels[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(4): 3 441-3 448.
- [32] DONG Bao-lei, LI Hong-fang, SUN Jie-fang, et al. Development of a fluorescence immunoassay for highly sensitive detection of amantadine using the nanoassembly of carbon dots and MnO₂ nanosheets as the signal probe[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 286: 214-221.
- [33] TAN Xiao-feng, ZHANG Lian-hua, TANG Qiao-rong, et al. Ratiometric fluorescent immunoassay for the cardiac troponin-I using carbon dots and palladium-iridium nanocubes with peroxidase-mimicking activity[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(5): 280.
- [34] JIAO Lei, ZHANG Lian-hua, DE Wen-wen, et al. Au@Pt nanodendrites enhanced multimodal enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Nanoscale*, 2019, 11 (18): 8 798-8 802.
- [35] 刘洋汝, 李忠海, 任佳丽. 电化学法测量黑曲霉孢子萌发过程中葡萄糖氧化酶的活性[J]. *食品与机械*, 2017, 33(5): 87-90, 94.
- [36] CARRARA S, ALIPRANDI A, HOGAN C F, CILA L D. Aggregation-induced electrochemiluminescence of platinum (II) complexes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(41): 14 605-14 610.
- [37] MIAO Wu-jian. Electrogenenerated chemiluminescence and its biorelated applications[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108 (7): 2 506-2 553.
- [38] HAN Xiu-juan, ZHANG Hong-fang, ZHENG Jian-bin. Ultrasensitive electrochemical immunoassay based on cargo release from nanosized PbS colloidosomes [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 2 224-2 230.
- [39] SHU Jian, QIU Zhen-li, ZHOU Qian, et al. A chemiresistive thin-film translating biological recognition into electrical signals: An innovative signaling mode for contactless biosensing [J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(22): 3 262-3 265.

- [40] MOON W J, YU J H, CHOI G M. The CO and H₂ gas selectivity of CuO-doped SnO₂-ZnO composite gas sensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2002, 87 (3): 464-470.
- [41] GAO M, CHO M, HAN H J, JUNG Y S, PARK I. Palladium-decorated silicon nanomesh fabricated by nanosphere lithography for high performance, room temperature hydrogen sensing[J]. *Small*, 2018, 14(10): 1703691.
- [42] KOO W T, QIAO S P, OGATA A F, JHA G, JIANG J S, CHEN V T, KIM I D, PENNER R M. Accelerating palladium nanowire H₂ sensors using engineered nanofiltration[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(9): 9 276-9 285.
- [43] LV Shu-zhen, ZHANG Kang-yao, ZHU Ling, et al. H₂-based electrochemical biosensor with Pd nanowires@ZIF-67 molecular sieve bilayered sensing interface for immunoassay[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(18): 12 055-12 062.
- [44] LU Nan, FAN Wen-pei, YI Xuan, et al. Biodegradable hollow mesoporous organosilica nanotheranostics for mild hyperthermia-induced bubble-enhanced oxygen-sensitized radiotherapy[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(2): 1 580-1 591.
- [45] MA Hui, MA Wei, CHEN Jian-fu, et al. Quantifying visible-light-induced electron transfer properties of single dye-sensitized ZnO entity for water splitting[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(15): 5 272-5 279.
- [46] FU Guang-lei, SANJAY S T, ZHOU Wan, et al. Exploration of nanoparticle-mediated photothermal effect of TMB-H₂O₂ colorimetric system and its application in a visual quantitative photothermal immunoassay [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(9): 5 930-5 937.
- [47] WEI Yun-yun, WANG Dan-ni, ZHANG Ying-zhi, et al. Multicolor and photothermal dual-readout biosensor for visual detection of prostate specific antigen[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 140: 111345.
- [48] JIAO Lei, ZHANG Lian-hua, DU Wen-wen, et al. Au@Pt nanodendrites enhanced multimodal enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Nanoscale*, 2019, 11 (18): 8 798-8 802.
- [49] 尉柠, 胡婕. 光谱技术在乳及乳制品研究中的应用进展[J]. *食品与机械*, 2019, 35(1): 232-236.
- [50] 陶进江, 潘桂根, 刘木华, 等. 基于表面增强拉曼光谱的鸭肉中己烯雌酚残留检测[J]. *食品与机械*, 2019, 35(2): 82-86, 195.
- [51] HWANG J, LEE S, CHOO J. Application of a SERS-based lateral flow immunoassay strip for the rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(22): 11 418-11 425.
- [52] KO J, PARK S G, LEE S, et al. Culture-free detection of bacterial pathogens on plasmonic nanopillar arrays using rapid Raman mapping[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(8): 6 831-6 840.
- [53] CAMACHO S A, SOBRAL-FILHO R G, AOKI P H B, et al. Zika immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering nanoprobes [J]. *ACS Sensors*, 2018, 3 (3): 587-594.
- [54] YANG Lin, GAO Ming-xuan, ZOU Hong-yan, et al. Plasmonic Cu_{2-x}S_ySe_{1-y} nanoparticles catalyzed click chemistry reaction for SERS immunoassay of cancer biomarker [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(19): 11 728-11 733.
- [55] SU Yi-yun, WU Di, CHENG Jian, et al. Ratiometric surface enhanced Raman scattering immunosorbent assay of allergenic proteins via covalent organic framework composite material based nanozyme tag triggered Raman signal “Turn-on” and amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(18): 11 687-11 695.
- [56] XU Yong-jie, LI Dan-dan, CHENG Wei, et al. Chemiluminescence imaging for microRNA detection based on cascade exponential isothermal amplification machinery [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 936: 229-235.
- [57] LI Xian-ming, ZHANG Hou-chun, TANG Yu-rong, et al. A both-end blocked peroxidase-mimicking DNzyme for low-background chemiluminescent sensing of miRNA [J]. *ACS Sensors*, 2017, 2(6): 810-816.
- [58] LI Xiao-gang, MENG Meng, ZHENG Lei, et al. Chemiluminescence immunoassay for s-adenosylhomocysteine detection and its application in dna methyltransferase activity evaluation and inhibitors screening [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(17): 8 556-8 561.
- [59] LIU An-ran, ZHAO Fang, ZHAO Yue-wu, et al. A portable chemiluminescence imaging immunoassay for simultaneous detection of different isoforms of prostate specific antigen in serum [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 81: 97-102.
- [60] YANG Ning, HUANG Yong-xin, DING Guo-sheng, et al. In situ generation of prussian blue with potassium ferrocyanide to improve the sensitivity of chemiluminescence immunoassay using magnetic nanoparticles as label [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(7): 4 906-4 912.

(上接第 202 页)

- [13] SANTOS M, GERBAUD V, ROUX G A C. Solid fat content of vegetable oils and simulation of interesterification reaction: Predictions from thermodynamic approach[J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 126(4): 198-205.
- [14] PEDRO E D, EATRIZ M C, MING C, et al. Modelling the effect of temperature on the lipid solid fat content (SFC) [J]. *Food Research International*, 2012, 45(1): 132-135.