

# 基于上转换纳米粒子与金纳米粒子构建荧光共振 能量转移体系检测双酚 A 方法研究

## Highly Sensitive Detection of Bisphenol A Based on FRET from Up-conversion Nanoparticles to Gold Nanoparticles

许宙<sup>1</sup> 鲁士珍<sup>1</sup> 陈茂龙<sup>1</sup> 朱颖越<sup>2</sup> 丁利<sup>1</sup> 程云辉<sup>1</sup>

XU Zhou<sup>1</sup> LU Shi-zhen<sup>1</sup> CHEN Mao-long<sup>1</sup> ZHU Ying-yue<sup>2</sup> DING Li<sup>1</sup> CHENG Yun-hui<sup>1</sup>

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南长沙 410114; 2. 常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏常熟 215500)

(1. School of Chemistry and Biological Engineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. School of Biotechnology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500, China)

**摘要:**制备了粒径为 13 nm 的金纳米粒子,在其表面修饰双酚 A(BPA)适配体作为能量受体探针;并利用聚丙烯酸(PAA)包覆油溶性的上转换荧光纳米材料(UCNPs)制备水溶性的 UCNPs,在其表面修饰适配体互补链形成功能化 UCNPs 作为能量供体,构建了基于 FRET 原理的 BPA 生物传感检测平台。结果表明:该检测体系在  $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-3}$  mol/L 时具有良好的线性关系( $R^2 = 0.9923$ ),检出限低至  $1 \times 10^{-10}$  mol/L。

**关键词:**荧光共振能量转移;上转换荧光纳米材料;金纳米颗粒;双酚 A

**Abstract:** The 13 nm gold nanoparticles were synthesized and were modified with Bisphenol A (BPA) aptamer. The oil-solubility Up-conversion nanoparticles (UCNPs) were modified with polyacrylic acid (PAA) to form water-solubility UCNPs. Then water-solubility UCNPs were coated with the complementary DNA strand. Based these nanoparticles, a FRET aptasensor for BPA was successfully fabricated by using Up-conversion nanoparticles as energy donor and gold nanoparticles as energy acceptor. The results show that the detection system has a good linear relationship at  $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-3}$  mol/L ( $R^2 = 0.9923$ ), and the detection limit is as low as  $1 \times 10^{-10}$  mol/L. The method is proved to be of good practicability

**基金项目:**国家自然科学基金(编号:31401566);国家重点研发计划(编号:2016YFF0203701);粮食深加工与品质控制湖南省 2011 协同创新项目;常熟市科技发展计划(社会发展类)项目(编号:CS201605);苏州市科技计划项目(编号:SNG201617)

**作者简介:**许宙,男,长沙理工大学讲师,博士。

**通信作者:**程云辉(1964—),女,长沙理工大学教授,博士。

E-mail: xz\_jnu@126.com

**收稿日期:**2018-05-08

through the experiment of adding the standard of water and milk samples.

**Keywords:** fluorescence resonance energy transfer; Up-conversion nanoparticles; gold nanoparticles; bisphenol A

双酚 A 是一种固化聚碳酸酯塑料和合成环氧树脂的有机小分子物质<sup>[1]</sup>,其广泛用于食品包装容器、奶瓶、包装材料、餐具和微波炉等的生产<sup>[2-3]</sup>。但 BPA 具有不稳定性,酸、碱环境和加热等因素均会导致其迁移至所包装的食品或饮料中<sup>[4]</sup>,使其广泛存在于环境和食物链。同时,BPA 是一种内分泌干扰物,可模拟雌激素的作用与雌激素受体结合干扰生物体内的激素代谢<sup>[5-6]</sup>,从而导致人和动物的生殖系统、神经系统<sup>[7]</sup>以及免疫系统异常,甚至有可能诱发癌变<sup>[8-9]</sup>和威胁胎儿及儿童的生长和发育,使其出现出生缺陷,不孕、女孩早熟和肥胖等问题<sup>[10]</sup>。

目前,测定双酚 A 的主要分析方法是高效液相色谱<sup>[11]</sup>、液-质联用法、气相色谱-质谱法<sup>[12-13]</sup>、荧光法<sup>[14-15]</sup>和酶联免疫吸附法<sup>[16-17]</sup>等,其中常用的分析方法为色谱法和 MS 技术。这些技术能够实现对双酚 A 的高灵敏度分析,但需要专业人员操作、资本投入高、样品制备和预处理复杂费时等要求限制了其在双酚 A 检测中的广泛应用<sup>[18-19]</sup>,且无法满足目前对检测技术高速度、高通量、高便携性的要求。因此,建立一种样品前处理简单、成本低、灵敏度高的双酚 A 快速检测方法具有重要意义。

荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)是当能量供体分子的荧光光谱与能量受体分子的激发光谱重叠时,2 个荧光分子之间通过偶极-偶极相互作用发生非辐射能量跃迁,供体分子激发态的能量通过

分子间的电偶极相互作用转移给受体分子基态,从而使能量供体分子的荧光强度减弱或淬灭、出现荧光寿命缩短,与此相反,能量受体分子的荧光强度增加,荧光寿命延长的现象<sup>[20]</sup>。荧光共振能量转移是一种均相分析检测技术,具有灵敏度高、选择性好、操作简单方便等优点而广泛应用于食品安全检测领域。传统的荧光供体通常是有机荧光染料,存在吸收光谱较窄,吸收峰和发射峰之间的斯托克斯位移较小等缺陷。而上转换荧光纳米材料是使用近红外光(980 nm 或者 880 nm)作为激发光源,发射光在可见光区域分布,具有宽广的吸收光谱,斯托克斯位移较大等特点,并可以克服生物组织或者复杂样品自身荧光干扰,降低了检测体系中的信噪比。因此,上转换纳米材料是理想的荧光共振能量转移体系能量供体。

本研究拟利用适配体核苷酸的碱基互补配对作用,驱动适配体功能化 AuNPs 和适配体互补链功能化 UCNP 进行组装,将适配体对 BPA 的识别过程转化为检测体系荧光发射强度变化,建立高选择性、高灵敏度的 BPA 检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与设备

YCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(99.99%)、YbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(99.99%)、ErCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O(99.99%)、油酸(OA)、1-十八烯(ODE)、聚丙烯酸(PAA,相对分子量 5 000);北京百灵威科技有限公司;

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、*N*-羧基琥珀酰亚胺磺酸钠盐(sufllo-NHS):98%,上海麦克林生化科技有限公司;

氢氧化钠、氟化铵、柠檬酸三钠、氯金酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠:≥99%,国药集团化学试剂有限公司;

氯化钠、氯化钾:≥99%,广东光华科技股份有限公司;

十二烷基磺酸钠(SDS):99%,合肥博美生物科技责任有限公司;

实验室用超纯水:18.2 MΩ·cm 的 Millipore 制备;

其他试剂:分析纯,市售;

荧光分光光度计:F96PRO 型,上海棱光技术有限公司;

激光发射器:MDL-III-980-2W 型,中国长春新产品光电技术有限公司;

磁力搅拌电热套:ZNCL-TS 型,河南巩义市宏华仪器设备有限公司;

透射电子显微镜:JEOLJEM-2100 型,日本电子株式会社;

紫外可见分光光度计:UV-1800 型,日本岛津公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 水溶性上转换纳米材料的制备 按照 Li 等<sup>[17]</sup>报道的合成方法制备油溶性上转换纳米材料:称取 YCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.236 g、YbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.077 g、ErCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.007 g(Ln:78% Y<sup>3+</sup>、20% Yb<sup>3+</sup>、2% Er<sup>3+</sup>;共计 1 mmol)加入到 100 mL 三颈烧瓶中,加入 4 mL OA 和 15 mL 1-ODE,1 500 r/min 磁力搅拌同时逐渐升温至 130 °C,氮气保护以除去环境中的空气和水蒸气,进一步升温至 160 °C,至混合

物形成均一溶液后自然冷却至室温;准确称取 0.13 g NaOH 和 0.13 g NH<sub>4</sub>F 溶于 10 mL 甲醇中,将上述溶液逐滴加入到三颈烧瓶中,磁力搅拌 30 min 至反应体系充分混合,随后缓慢加热以蒸发甲醇,再逐渐升温至 300 °C,氮气保护加热 1 h 后,溶液自然冷却,产品用乙醇从溶液中沉淀出来,乙醇/环己烷(体积比 5:1)清洗 3 次,烘干,即得 NaY<sub>0.78</sub>F<sub>4</sub>:Yb<sub>0.2</sub>;Er<sub>0.02</sub> 油溶性上转换荧光纳米材料。

油酸包覆的上转换荧光纳米材料由于油酸分子的烃链起疏水作用,材料在水中的分散性极差,需要对该材料表面进行 PAA 修饰。本研究按照 Dai 等<sup>[21]</sup>报道采用配体交换法制备 PAA 包裹的水溶性上转换荧光纳米材料:10 mL PAA 分散在乙醇溶液(~20 mL wt 99.8%)中,5 mL OA-UCNPs 分散在氯仿(~10 mL wt 99.8%),然后将乙醇溶液加入到氯仿中,隔夜搅拌。再用乙醇清洗 3 次,最后将上转换荧光纳米材料分散在水中。

1.2.2 金纳米颗粒的制备 根据文献<sup>[22]</sup>记录采用柠檬酸三钠还原氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>)法来合成金纳米颗粒,步骤如下:取超纯水 97.5 mL 以及质量浓度为 0.412% (10 mmol/L)的 HAuCl<sub>4</sub> 溶液 2.5 mL 加入到有磁性搅拌子的洁净锥形瓶中,采用磁力加热搅拌器,搅拌、加热至沸腾,7~8 min 后,加入质量浓度为 1% 的柠檬酸三钠溶液 2 mL,溶液从无色变为酒红色,保持 10 min,然后停止加热,但保持原来的磁力搅拌状态;维持 15 min 后从磁力加热搅拌器上取下锥形瓶,所得酒红色液体即为 13 nm AuNPs。

1.2.3 金纳米探针的制备 利用 BPA 适配体取 1 mL 制备得到的 AuNPs 溶液高速离心得到 AuNPs 沉淀,然后分散在 1 mL 10 mmol/L pH 7.4 PBS 缓冲液中,加入 BPA 适配体溶液(DNA1)10 μL,振荡混合后摇床孵育过夜,反应结束后,溶液用 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,保留底部暗红色的 AuNPs-DNA1 探针,重悬于 SDS 溶液中,于 4 °C 冰箱中储存备用。

双酚 A 适配体序列 5 端巯基:5-CCGGTGGGTGGT-CAGGTGGGATAGCGTTCCGCGTATGGCCCAGCGCAT-CACGGGTTCCGACCA-3。

1.2.4 上转换荧光纳米探针的制备 称取 10 mg PAA 修饰的 NaYF<sub>4</sub>:Yb<sub>0.2</sub>,Er<sub>0.02</sub> UCNP 分散在 5 mL 10 mmol/L PBS(pH 7.4)缓冲液中,超声充分分散,加入 200 mmol/L EDC 和 100 mmol/L sulfo-NHS 溶液各 100 μL,37 °C 摇床活化 2 h。之后加入一定量的 BPA 适配体互补链(DNA2),在 37 °C 摇床中孵育过夜,离心收集材料,用 PBS 缓冲液清洗 3 次,将最后得到的核酸适配体互补链修饰的功能化 UCNP(UCNP-DNA2)分散在 0.01% SDS 溶液中,UCNP-DNA2 的浓度为 2 nmol/L。

互补链 5 端氨基修饰:5-CCCACCTGACCACCCAC CGG-3。

1.2.5 检测体系的构建 用超纯水配制所需浓度的 BPA 标准溶液(1.0×10<sup>-3</sup>,1.0×10<sup>-4</sup>,1.0×10<sup>-5</sup>,1.0×10<sup>-6</sup>,1.0×10<sup>-7</sup>,1.0×10<sup>-8</sup>,1.0×10<sup>-9</sup> mol/L),各取 10 μL 加入到制备好的功能化金纳米探针(AuNPs-DNA1)中,室温下振荡孵育

3.0 h;离心分离去除未反应的双酚 A,水洗 3 次重悬于 500  $\mu\text{L}$  的 0.01% 的 SDS 缓冲液中,制备得 AuNPs-DNA1-BPA 纳米粒子;向上述溶液中加入 500  $\mu\text{L}$  制备好的功能化 UCNP(UCNPs-DNA2),混合均匀,室温下振荡孵育 1.0 h 后,用激光发射器 980 nm 激发检测体系,紫外-可见分光光度计检测其在 500~700 nm 波长范围内的荧光强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测原理

检测原理如图 1 所示。通过 BPA 适配体功能化修饰的

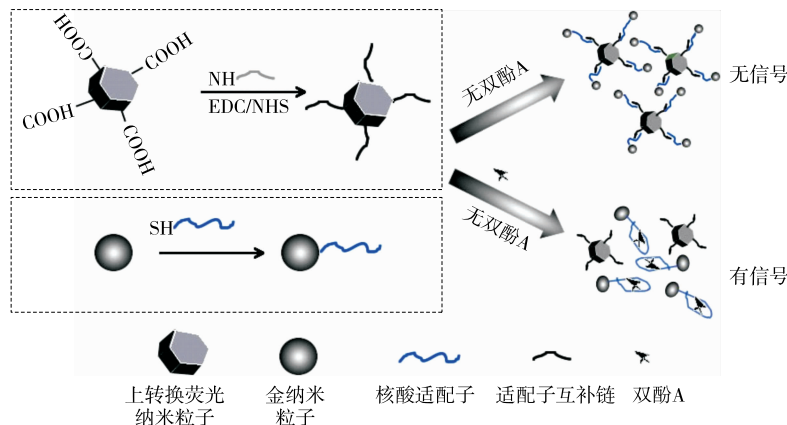


图 1 荧光共振能量转移体系检测双酚 A 原理图

Figure 1 Schematic diagram of FRET sensor for detection BPA

### 2.2 功能化 AuNPs 和 UCNP 纳米材料的表征

透射电镜分析是纳米材料最重要的表征手段之一,可以直观地反映纳米材料的形貌、粒径和分散性等状态。其中,材料粒径过大易导致聚沉而无法检测要求;分散性是传感器建立的重要条件,直接影响纳米材料的功能化修饰和特异性竞争结合的结果。图 2、3 是透射电子显微镜 (TEM) 和水合粒径仪 (DLS) 对适配体功能化 AuNPs 和互补链功能化 UCNP 的表征结果。从图 2 可观察到,功能化 UCNP 和 AuNPs 均呈现出良好的分散性,并且颗粒大小相对均匀、一致,其平均粒径分别为 120,13 nm。当体系中不存在双酚 A 时,UCNP 表面的适配体互补链会与金纳米粒子表面的适配体发生特异性结合,如图 2(c) 所示。

从图 3(a)、(b)可观察到功能化 UCNP 和 AuNPs 均呈正态分布,说明 2 种材料均呈现良好的分散性且颗粒大小相对均匀,其平均粒径分别为 92,23 nm,分散性和粒径均满足下一步组装要求。在图 3(c)中显示,组装后形成的 UCNP-AuNP 复合物的平均粒径分布范围为 30~820 nm,基本对应 AuNP-DNA1 和 UCNP-DNA2 数据的相加,说明功能化修饰的 UCNP-DNA2 和 AuNP-DNA1 通过碱基互补配对原则发生 DNA 杂交,形成 UCNP-AuNP 复合物,满足形成 FRET 原理中缩短供受体之间的空间距离的要求。

### 2.3 BPA 测定

通过 BPA 与 AuNP 表面的适配体特异性结合改变检测体系中功能化纳米材料组装程度,考察不同浓度的镉离子对应荧光强度的影响,由图 4 可知,在检测体系中加入 BPA

AuNPs 与双酚 A 发生特异性识别,当检测体系中没有 BPA 存在时,功能化 AuNPs 与功能化 UCNP 通过 DNA 杂交作用进行结合;反之,当体系中存在 BPA 时,BPA 会与适配体功能化 AuNPs 发生竞争性结合,导致功能化 AuNPs 从 UCNP 表面脱落。随着 BPA 浓度的升高,功能化 UCNP 与功能化 AuNPs 结合形成组装体的程度逐渐降低,使用激光 980 nm 激发检测体系,随着组装体组装程度降低,在发射光 543 nm 波长处特征峰的光强度逐渐增强,据此建立基于 FRET 原理的金纳米粒子淬灭上转换荧光的 BPA 检测传感平台。

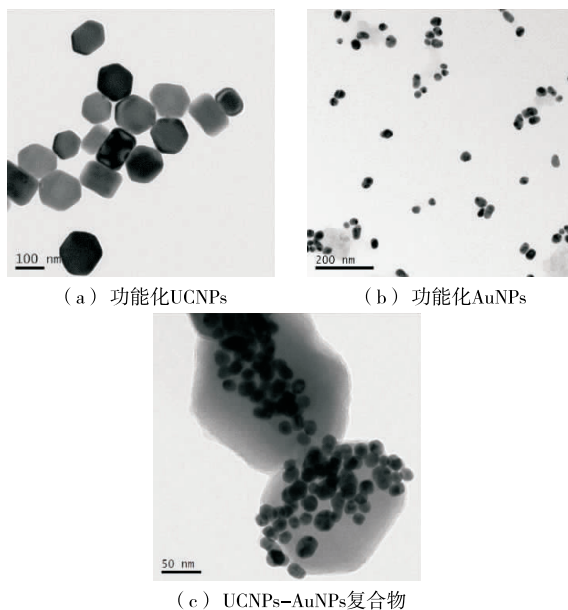


图 2 功能化 UCNP、功能化 AuNP、UCNP-AuNP 复合物的透射电镜图

Figure 2 TEM of functionalized UCNP, functionalized AuNP, assembled nanocomposite

后,检测体系在 543 nm 处的特征峰荧光强度逐渐提高。由图 5 可知,检测体系在 543 nm 处的特征峰值与 BPA 浓度之间存在线性关系  $y = 18.967 \ln(x) + 539.36 (R^2 = 0.9923)$ ,检出限为  $1 \times 10^{-10}$  mol/L。

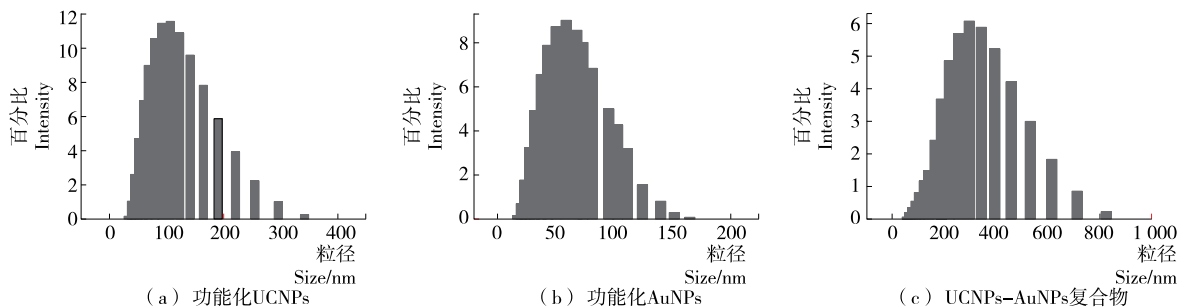


图 3 功能化 UCNPs、功能化 AuNPs、UCNPs-AuNPs 复合物的水合粒径图

Figure 3 DLS of functionalized UCNPs, functionalized AuNPs, assembled nanocomposite

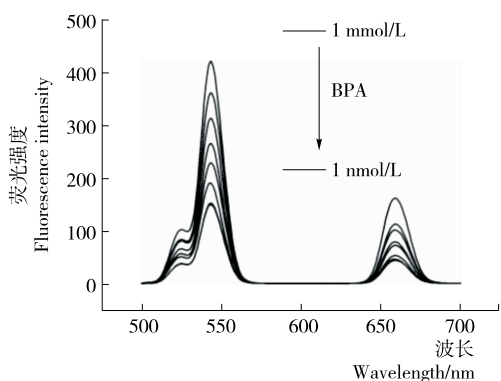


图 4 不同 BPA 浓度对应的荧光发射光谱图

Figure 4 A typical recording output for the detection of different concentrations of BPA by the developed method

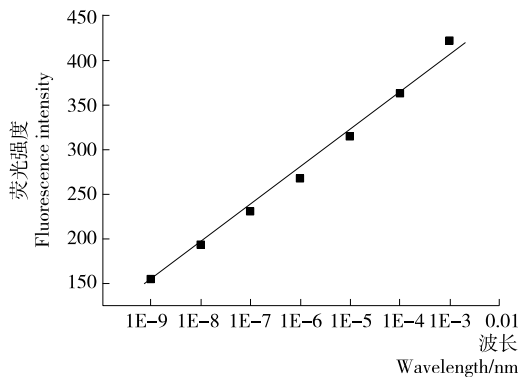


图 5 BPA 浓度与 543 nm 处的荧光信号强度的线性关系  
Figure 5 Standard curve of the fluorescence at 543 nm versus BPA concentration by the developed method

2.4 特异性分析

为了评价本方法对双酚 A 的检测特异性,采用多种 BPA 结构类似物检验检测体系,如对苯二甲酸二辛酯(DOTP)、己二酸二(2-乙基己基)酯(DEHA)、双酚 F 双(2,3-二羟基丙基)醚(BFDGE)、双酚 A 二(3-氯-2-羟基醚)醚(DOA)、双酚 F 缩水甘油醚(BDFGE)、4-辛基酚(4-OP)进行了分析检测,添加浓度为 1 μmol/L,在对照组中添加 BPA (浓度为 100 nmol/L),结果如图 6 所示,1 μmol/L BPA 结构类似物回收率均低于 5%,说明本试验所构建的 BPA 适配体

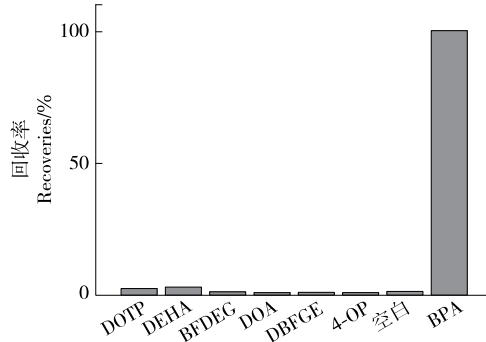


图 6 不同 BPA 结构类似物对传感器的影响

Figure 6 Different fluorescence response of the aptasensor at 543 nm to BPA and different BPA analogs

传感器具有良好的特异性。

2.5 回收试验

为了验证所建立的上转换-荧光共振能量转移生物传感器的实用性,本研究对牛奶和自来水样品进行了加标回收试验。在实际样品中加入不同浓度的 BPA,用本研究建立的上转换-荧光共振能量转移生物传感器进行检测,结果如表 1 所示,自来水的回收率为 95.6%~103.1%;经过前处理后牛奶样品的回收率为 91.2%~92.3%,说明本研究构建的生物传感器适合用于自来水和牛奶的分析检测。

表 1 实际样品(自来水、牛奶)回收率测定  
Table 1 Recoveries of BPA

样品	加入量/ (nmol · L <sup>-1</sup> )	检测值/ (nmol · L <sup>-1</sup> )	回收率/%
自来水	100	101.60	101.6
	10	9.26	92.6
牛奶	100	91.20	91.2
	10	9.23	92.3

3 结论

本研究利用双酚 A 适配体功能化金纳米粒子与适配体互补链功能化上转换荧光纳米粒子构建了一种基于荧光共振能量转移原理的双酚 A 检测方法。方法最低检测限为 1 × 10<sup>-10</sup> mol/L,该方法相比于传统荧光检测方法可以克服样品中生物组织带来的荧光干扰,且前处理简单快速,能够获得

高回收率。为具有生物荧光背景的食品样品提供一种快速检测小分子危害因子的新思路。

#### 参考文献

- [1] FENG Jing-jing, XU Li-guang, CUI Gang, et al. Building SERS-active heteroassemblies for ultrasensitive Bisphenol A detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 81: 138-142.
- [2] KASHEFI-KHEYRABADI L, KIM J, GWAK H, et al. A microfluidic electrochemical aptasensor for enrichment and detection of bisphenol A [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 7(6): 346-353.
- [3] YUN Wen, WU Hong, CHEN Lin, et al. Dual enzyme-free amplification strategy for ultra-sensitive fluorescent detection of bisphenol A in water[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1 020: 104-109.
- [4] BEN N M, GHICA M E, DRIDI C, et al. A novel amperometric enzyme inhibition biosensor based on xanthine oxidase immobilised onto glassy carbon electrodes for bisphenol A determination[J]. *Talanta*, 2018, 184: 388-393.
- [5] JO M, AHN J Y, LEE J, et al. Development of single-stranded DNA aptamers for specific bisphenol A detection[J]. *Oligonucleotides*, 2011, 21(2): 85-91.
- [6] CHEN Yi, FANG Jian-zhang, REN Lu, et al. Urinary bisphenol analogues and triclosan in children from south China and implications for human exposure[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 238: 299.
- [7] HUANG Ying, LI Xiao-feng, ZHENG Si-ning. A novel and label-free immunosensor for bisphenol A using rutin as the redox probe[J]. *Talanta*, 2016, 160: 241-246.
- [8] ALONSO-MAGDALENA P, QUESADA I, NADAL A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2011, 7(6): 346-353.
- [9] ROCHESTER J R. Bisphenol A and human health: a review of the literature[J]. *Reproductive Toxicology*, 2013, 42: 132-155.
- [10] 徐耿, 苏普玉. 童年期双酚 A 暴露对女童青春期发育提前的影响[J]. *中国儿童保健杂志*, 2016, 24(7): 719-722.
- [11] HAERI S A. Bio-sorption based dispersive liquid-liquid microextraction for the highly efficient enrichment of trace-level bisphenol A from water samples prior to its determination by HPLC[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1 028: 186-191.
- [12] LI Xing-nan, FRANKE A A. Improvement of bisphenol A quantitation from urine by LCMS [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(13): 3 869-3 874.
- [13] ROS O, VALLEJO A, BLANCOZUBIAGUIRRE L, et al. Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-A, alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis[J]. *Talanta*, 2015, 134: 247-255.
- [14] ZHU Ying-yue, CAI Yi-lin, XU Li-guang, et al. Building an aptamer/graphene oxide FRET biosensor for one-step detection of bisphenol A[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(14): 7 492-7 496.
- [15] WU Ya-ting, LIU Yan-jie, GAO Xia, et al. Monitoring bisphenol A and its biodegradation in water using a fluorescent molecularly imprinted chemosensor[J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 515-523.
- [16] MAIOLINI E, FERRI E, PITASI A L, et al. Bisphenol A determination in baby bottles by chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay, lateral flow immunoassay and liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2013, 139(1): 318-324.
- [17] KIM A, LI Chun-ri, JIN Chun-feng, et al. A sensitive and reliable quantification method for Bisphenol A based on modified competitive ELISA method[J]. *Chemosphere*, 2007, 68(7): 1 204-1 209.
- [18] VARMIRA K, SAED-MOCHESHI M, JALALVAND A R. Electrochemical sensing and bio-sensing of bisphenol A and detection of its damage to DNA: A comprehensive review[J]. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2017, 15(C): 17-33.
- [19] QIU Lu, LIU Qi, ZENG Xiao-liang, et al. Sensitive detection of bisphenol A by coupling solid phase microextraction based on monolayer graphene-coated Ag nanoparticles on Si fibers to surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Talanta*, 2018, 187: 13-18.
- [20] 修景锐, 胡思怡, 李金华, 等. 基于近红外量子点的荧光共振能量转移生物探针构建及应用[J]. *中国光学*, 2018, 11(1): 74-82.
- [21] DAI Shao-liang, WU Shi-jia, DUAN Nuo, et al. An ultrasensitive aptasensor for Ochratoxin A using hexagonal core/shell up-conversion nanoparticles as luminophores [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 91: 538.
- [22] ADRIANO Ambrosi. Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(14): 5 232.