

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.11.001

核酸负载纳米金的改良 ELISA 高灵敏检测平台的构建*

程 易, 马粤婷, 吴日红, 徐 瑜, 杨舒凌, 王永霞[△]
海南医学院教育部热带病重点实验室, 海南海口 571109

摘要:目的 构建基于核酸负载纳米金(AuNPs)的酶联免疫吸附试验(ELISA)高灵敏检测平台。方法 将生物素化 DNA 通过金-硫键结合在 AuNPs 上, 制备纳米金生物素化 DNA(AuNPs@DNA-B)信号探针, 在 ELISA 检测目标分子的基础上, 使信号探针通过链霉亲和素结合于夹心复合物中的生物素化抗体上, 发挥信号放大作用, 实现对目标分子的高灵敏检测。该研究选用血清水平极低的抗体免疫球蛋白(Ig)E 作为目标分子, 验证该检测平台的可行性。结果 通过紫外光谱扫描、透射电镜观察, 发现制备的 AuNPs 颗粒大小均匀、分散性好。在最优条件下, 该方法对选定的目标分子 IgE 的最低检测限为 0.012 ng/mL; 批内变异系数 < 2.0%, 批间变异系数 < 6.1%; 该方法的回收率为 (99.956 ± 0.168)% ~ (104.733 ± 3.376)%, 传统 ELISA 为 (99.100 ± 0.529)% ~ (100.044 ± 0.276)%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。其检测灵敏度与化学发光法相近。结论 该研究成功构建了基于 AuNPs@DNA-B 的信号放大 ELISA 高灵敏检测平台。

关键词: 纳米金; 纳米金生物素化 DNA; 酶联免疫吸附试验; 免疫球蛋白 E

中图法分类号: R392-33

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)11-1441-05

Construction of modified ELISA high sensitivity detection platform by nucleic acid loaded nanogold*CHENG Yi, MA Yueting, WU Rihong, XU Yu, YANG Shuling, WANG Yongxia[△]

Key Laboratory of Tropical Disease of Ministry of Education, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571109, China

Abstract: Objective To construct a high sensitivity detection platform of ELISA based on the nucleic acid loaded nanogold (AuNPs). **Methods** The biotinylated DNA (DNA-B) was binded to AuNPs via the gold-sulfur bond. The nanogold biotinylated DNA signal probe (AuNPs@DNA-B) was prepared. On the basis of ELISA detecting the target molecule, the signal probe was combined to the biotinylated antibody in sandwich compound via streptavidin for playing the signal amplification effect and realizing the high sensitive detection on the target molecule. This study selected IgE with serum extreme low level as the target molecule to verify the feasibility of this detection platform. **Results** The prepared AuNPs particles were uniform with good dispersibility by the ultraviolet spectral scanning, transmission electron microscopy observation. On the optimal condition, the lowest detection limit for the selected target molecule IgE was 0.012 ng/mL. The coefficient of variation of intra-assay and inter-assay was < 2.0% and < 6.1% respectively. The recovery rate of this method was (99.956 ± 0.168)%—(104.733 ± 3.376)%, which of the traditional ELISA was (99.100 ± 0.529)%—(100.044 ± 0.276)%, and the differences had no statistical significance ($P > 0.05$). Its detection sensitivity was similar to that of chemiluminescence assay. **Conclusion** This study successfully constructs the high sensitivity ELISA detection platform for the signal amplification based on AuNPs@DNA-B.

Key words: nanogold; nanogold biotinylated DNA; ELISA; IgE

酶联免疫吸附试验(ELISA)是 20 世纪 70 年代发展起来的一种新型免疫检测技术,其测定原理是基 于抗原与抗体的特异性结合反应及酶催化底物的高效放大作用,实现对目标分子的高灵敏检测^[1-2]。由

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81560006); 海南省自然科学基金高层次人才项目(820RC65); 大学生创新创业项目(X201911810004)。

作者简介: 程易, 女, 本科在读, 主要从事免疫学检测新技术的设计与研发方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: hy0211033@hainmc.edu.cn。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220506.1449.010.html\(2022-05-07\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220506.1449.010.html(2022-05-07))

于操作简便、快速、特异性好、检测成本低且不需要复杂设备等,ELISA是目前临床和科研实验室应用最为广泛的免疫分析技术之一^[3-4]。但传统ELISA由于酶标抗体上标记的酶分子数量有限导致检测灵敏度不高,传统ELISA只能检测水平大于 10^{-12} mol/L的目标物质,但在恶性肿瘤、感染、自身免疫疾病及超敏反应性疾病的早期阶段,大部分目标分子水平为 $10^{-16} \sim < 10^{-12}$ mol/L,传统ELISA难以检测^[5-7]。纳米金(AuNPs)因颗粒小、比表面积大、生物相容性好逐渐成为生物医学领域的研究热点^[8-9]。本研究拟将AuNPs作为信号放大载体,通过金-硫键结合生物素化DNA(DNA-B),构建纳米金生物素化DNA(AuNPs@DNA-B)信号探针,将该探针借助生物素-亲和素的高亲和力结合于检测抗体上,实现信号高效放大的目的,并选择血清含量极低、易引起过敏性疾病的抗体免疫球蛋白(Ig)E作为目标分子,验证该检测平台的信号放大效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

全功能微孔板检测酶标仪(BioTek Synergy H1)购于美国伯腾仪器有限公司;P9紫外-可见分光光度计购于上海美谱达仪器有限公司;高分辨率透射电镜(JEM 2100)购于日本电子株式会社;高速冷冻离心机(Microfuge[®] 20R)购于贝克曼库尔特(美国)股份有限公司;电热恒温培养箱(BPX-162)购于上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;摇床(SLK-O3000-S)购于上海珂淮仪器有限公司。氯金酸(分子式: $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;分析纯,批号:JG9031901)购于上海思域化工科技有限公司;二水合枸橼酸三钠(分子式: $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,分析纯)购于西陇科学股份有限公司;人IgE ELISA反应板及试剂盒购于欣博盛生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记亲和素(SA-HRP)和重组链霉亲和素(SA,分析纯)购于上海碧云天生物技术有限公司;DNA-B[5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTGTCAGCCAGTGTAC-biotin-3']由上海生工生物工程有限公司合成。0.1 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)购于赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 改良ELISA检测IgE的原理

首先制备13 nm AuNPs,设计合成一段含20个碱基的DNA-B序列,其5'端经巯基化修饰,3'端经生物素化修饰,将AuNPs与DNA-B通过金-硫键结合形成AuNPs@DNA-B作为本实验的信号探针。当IgE存在时,通过与微孔板上包被抗体的结合捕获IgE,再与Ab-B结合形成夹心“三明治”结构。信号探针AuNPs@DNA-B在链霉亲和素的辅助下与生物素化抗体结合而被固定在微孔板表面,洗涤后加入SA-HRP,以

TMB和H₂O₂作为显色底物,待检物在一定水平范围内,其水平与显色深浅呈正相关。由于13 nm AuNPs比表面积大,DNA-B分子小、空间位阻小,每个AuNPs均可结合大量DNA-B分子,实现对检测信号的高效放大作用,且DNA-B中的DNA分子5'端经巯基化修饰后可与AuNPs通过金-硫键共价结合,DNA-B分子不易脱落,背景信号较低,信噪比较高,该方法与传统ELISA相比,可大大提高检测灵敏度。

1.2.2 枸橼酸三钠还原氯金酸法^[10]制备13 nm AuNPs

取100 mL 0.01%氯金酸溶液在控温搅拌器中加热至沸腾后,边搅拌边加入4.8 mL新鲜配制的1%枸橼酸三钠。溶液由淡黄色逐渐变为深紫红色,最后变为酒红色,搅拌至溶液颜色不再变化,撤去热源,继续搅拌10 min。待溶液冷却至室温后恢复至原体积,4℃保存。采用紫外-可见分光光度计和透射电镜对制备的AuNPs进行表征。

1.2.3 制备AuNPs@DNA-B信号探针

室温下,将一定量的100 μmol/L DNA-B加入5 mL制备好的AuNPs溶液中,置于摇床缓慢摇动(200 r/min)。期间每隔4小时依次加入2 mmol/L NaCl溶液20、45、55、65、90 μL,12 000 r/min,6℃离心30 min。吸出上清液后加入0.01 mmol/L(pH 7.4)的PBS重悬沉淀,洗涤2次,最后1次离心后加入5 mL 15%牛血清蛋白(BSA),室温摇床摇动6 h后,12 000 r/min离心30 min,洗涤2次,沉淀储存于4℃备用。采用紫外-可见分光光度计和透射电镜对制备的探针进行表征。

1.2.4 DNA-B结合AuNPs条件的优化

(1)DNA-B用量的优化。分别将2.4、2.6、2.8、3.0、3.2、3.4 μL 100 μmol/L DNA-B加入200 μL AuNPs溶液中。室温下置于摇床摇动24 h(200 r/min),加入2 mmol/L NaCl溶液老化探针,离心取沉淀洗涤2次后测A₂₆₀。实验重复3次。(2)DNA-B与AuNPs结合时间的优化。选择最佳结合量的AuNPs和DNA-B,200 r/min下分别结合12、16、20、24、28、32、36、40 h,加入2 mmol/L NaCl溶液使探针老化后离心,重悬后取沉淀测A₂₆₀。实验重复3次。

1.2.5 最佳反应条件的选择

选取强阳性(4 ng/mL)的IgE标准品作为优化反应条件的待测物,生物素化抗IgE抗体(Ab-B)用量由传统ELISA优化获得,采用棋盘滴定法对SA、AuNPs@DNA-B复合物用量进行优化。同时将SA-HRP从1:1 000~1:3 000做一系列稀释,在Ab-B、SA和AuNPs@DNA-B复合物最佳工作浓度下对SA-HRP的用量进行优化。实验重复3次。同时设置阴性对照和空白对照。

1.2.6 标准曲线的绘制

将IgE标准品从0~30 ng/mL进行一系列稀释,分别取100 μL加入反应板

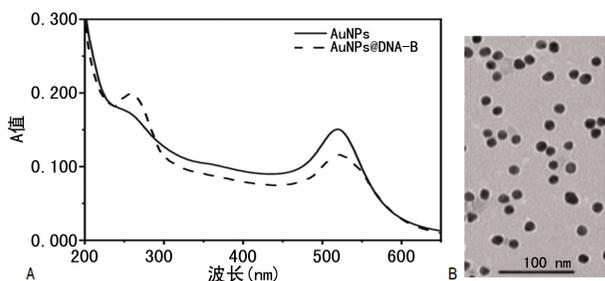
中, 37 °C 孵育 90 min。洗涤后加入 100 μL Ab-B, 37 °C 孵育 60 min, 洗涤, 加入 100 μL 5 μg/mL 的 SA 37 °C 孵育 30 min, 洗涤, 加入 100 μL AuNPs@DNA-B 孵育 30 min, 洗涤后加入 1 : 2 000 SA-HRP 孵育 30 min, 洗涤后分别加入 100 μL 的四甲基联苯胺 (TMB) 和 H₂O₂, 37 °C 孵育 15 min。加入终止液后测定各水平的吸光度变化值 (A₄₅₀ - A₆₃₀), 经直线回归分析, 选择最佳线性范围作为 IgE 定量检测的反应曲线。

1.2.7 方法实用性研究 将 IgE 标准品从 0.1~2.0 ng/mL 用标准血清进行一系列稀释, 采用本实验建立的改良 ELISA 和传统 ELISA 分别检测 IgE 水平, 计算回收率。比较两种方法检测 IgE 时回收率的差异。回收率 (%) = 检测值 / 实际值 × 100 %。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据处理和分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较行 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AuNPs 和 AuNPs@DNA-B 表征 采用紫外-可见分光光度计对制备的 AuNPs、AuNPs@DNA-B 进行扫描, 在波长 200~650 nm, 扣除本底后得到如图 1A 所示的光谱图。由图 1A 可见 AuNPs 和 AuNPs@DNA-B 扫描曲线波峰宽度较小, 波形平滑, 初步证明制备的 AuNPs 颗粒大小一致, 分布均匀。AuNPs 在标记 DNA-B 前, 紫外吸收光谱的最大吸收峰波长在 519 nm 处, 但标记后其最大吸收峰波长变为 522 nm, 出现了轻微的红移, 且在 260 nm 处出现了明显的吸收峰。透射电镜发现 AuNPs 的粒径为 (13 ± 2) nm, 多为球形, 大小基本一致, 分散均匀 (图 1B)。



注: A 为 AuNPs 及 AuNPs@DNA-B 紫外吸收光谱; B 为 AuNPs 透射电镜结果。

图 1 AuNPs 及 AuNPs@DNA-B 表征

2.2 DNA-B 结合 AuNPs 条件的优化

2.2.1 DNA-B 用量的优化 当 AuNPs 的用量一定时, 扣除背景信号后, 由图 2 可知, 随着 DNA-B 用量的增加, A₂₆₀ 逐渐增加, 尤其 DNA-B 用量在 2.4~2.8 μL 时 A₂₆₀ 急剧增加, 而用量在 >2.8~3.4 μL 时 A₂₆₀ 增速明显变缓, 说明随着 DNA-B 用量的增加, 其与 AuNPs 的结合量亦随之增加, 直到达到其最大结合量。鉴于 DNA-B 在 3.0~3.4 μL 时 A₂₆₀ 接近最大值, 且差别不

大, 因此本研究选用 3.0 μL 100 μmol/L DNA-B 结合 200 μL AuNPs 作为二者后续实验的用量。

2.2.2 DNA-B 与 AuNPs 结合时间的优化 在 AuNPs 和 DNA-B 最佳结合条件下, 去除背景信号后, 发现随着时间的延长, A₂₆₀ 先迅速增加后增速变缓, 说明 DNA-B 与 AuNPs 的结合达到一定时间后再增加结合时间并不能增加结合效率。由图 3 可知, 32~40 h 时 A₂₆₀ 增速缓慢, 说明此时间段基本达到二者的最大结合量, 因此选用 36 h 作为最佳结合时间。

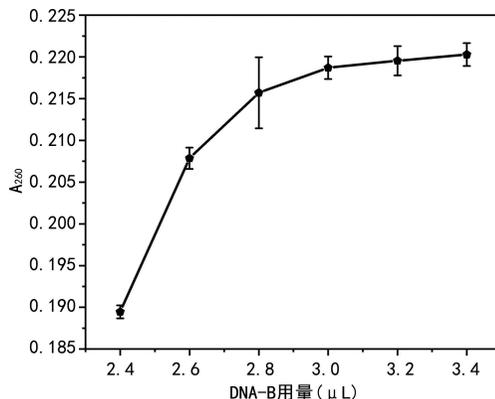


图 2 结合 AuNPs 的 DNA-B 用量优化

2.3 改良 ELISA 最佳反应条件的选择

2.3.1 SA 和 AuNPs@DNA-B 用量优化 当 IgE 用量固定时, 发现随着 SA 水平和 AuNPs@DNA-B 用量的增加, A₄₅₀ 逐渐增加, 但当 SA 水平为 5 μg/mL、AuNPs@DNA-B 用量为 100 μL 时, A₄₅₀ 接近最大值, 见图 4。综合实验结果, SA 选择 5 μg/mL 作为最佳工作水平, AuNPs@DNA-B 用量选择 100 μL。

2.3.2 SA-HRP 用量优化 在最优条件下, SA-HRP 稀释度为 1 : 500~1 : 3 000 时 A₄₅₀ 下降缓慢, 但超过 1 : 3 000 则出现了明显下降, 说明稀释度过高导致 SA-HRP 的用量不足, 因此本研究选用 1 : 2 000 作为 SA-HRP 的最终稀释度。

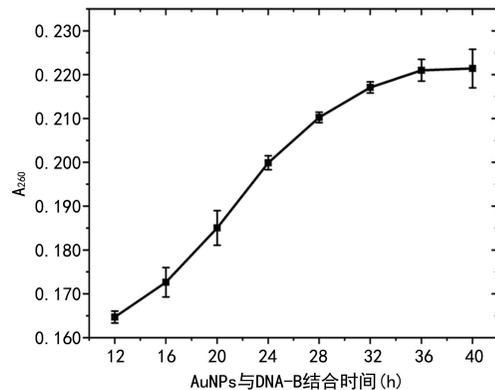


图 3 AuNPs 与 DNA-B 结合时间优化

2.4 精密度验证 取健康人血清及 IgE 阳性患者血清各 10 份在相同条件下重复检测 10 次, 批间变异系数均 < 6.1 %, 取其中 1 份 IgE 阳性血清重复测定 10 次, 批内变异系数 < 2.0 %。

2.5 标准曲线的绘制 将 IgE 标准品进行一系列稀释后,用改良 ELISA 检测各水平的 A 值,经直线回归分析(图 5),得回归方程: $Y=0.139\ 84X+0.530\ 22$, $R^2=0.983\ 32$,发现 IgE 水平在 0~30 ng/mL 内线性关系良好,其检测限为 0.012 ng/mL。

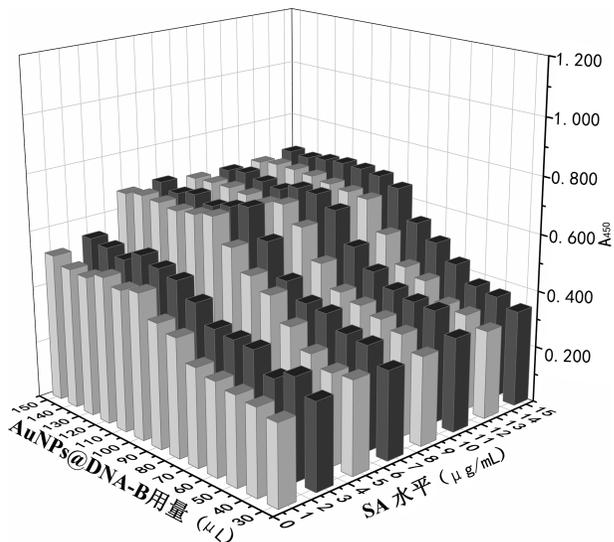


图 4 SA 和 AuNPs@DNA-B 用量优化

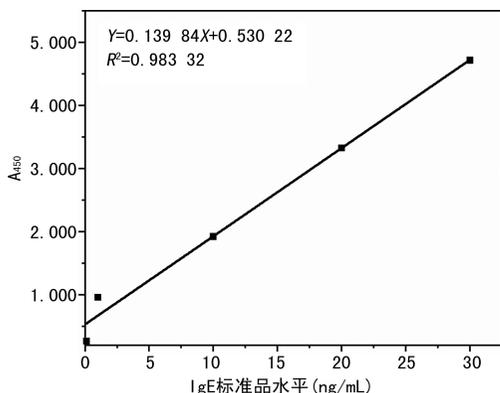


图 5 改良 ELISA 检测 IgE 标准曲线

2.6 方法实用性研究 取 IgE 标准品用标准血清稀释后,采用改良 ELISA 和传统 ELISA 分别检测不同水平 IgE 标准品,计算回收率,发现改良 ELISA 回收率为 $(99.956 \pm 0.168)\% \sim (104.733 \pm 3.376)\%$,传统 ELISA 为 $(99.100 \pm 0.529) \sim (100.044 \pm 0.276)\%$,略低于改良 ELISA,但二者差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 改良和传统 ELISA 测定 IgE 的回收率

方法	IgE 实际水平 (ng/mL)	IgE 测定水平 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)	回收率 (%)
改良 ELISA	1.000	1.019 \pm 0.019	101.867 \pm 1.888
	1.500	1.499 \pm 0.003	99.956 \pm 0.168
	2.000	2.095 \pm 0.068	104.733 \pm 3.376
传统 ELISA	1.000	0.991 \pm 0.005	99.100 \pm 0.529
	1.500	1.501 \pm 0.004	100.044 \pm 0.276
	2.000	2.020 \pm 0.060	99.350 \pm 3.005

3 讨 论

随着纳米技术的发展,纳米材料在生物医学领域的应用备受关注^[11]。纳米颗粒因具有较大的比表面积、量子尺寸效应以及与生物材料的高度相容性逐渐成为生物医学领域的研究热点^[12-13]。AuNPs(1~100 nm)是微小的金颗粒,又称胶体金^[14-15]。其具有高电子密度、介电特性和一定的催化作用,低毒且能与多种生物大分子结合,在医学治疗和检测领域应用广泛^[16-17]。本研究将生物素化的 DNA 探针通过金-硫键结合于制备好的(13 \pm 2)nm 的 AuNPs 上用于解决传统 ELISA 放大效果不佳的问题,构建了基于 AuNPs 的 IgE 检测改良 ELISA。即在 ELISA 检测 IgE 的基础上将生物素化抗体与链霉亲和素结合,洗涤后链霉亲和素后再与 AuNPs@DNA-B 探针结合。由于每个 AuNPs@DNA-B 可与多个 SA-HRP 分子结合,加入 TMB 后使检测信号进一步放大。DNA 探针长度的选择参考文献^[18-19],20 nm 以下的 AuNPs 负载 DNA 探针的长度多在 15~70 nt,由于本研究所用的 AuNPs 粒径较小,DNA 探针的长度选择了 20 nt(另含 6 个 CH₂ 基团)。

紫外-可见分光光度计对制备的 AuNPs 进行扫描,发现其最大吸收峰波长在 519 nm 处,峰宽度较小,波形平滑,说明制备的 AuNPs 大小一致,分散性好;透射电镜发现 AuNPs 粒径为(13 \pm 2)nm,呈球形。标记 DNA-B 后最大吸收峰波长出现了约 3 nm 的红移,且在 260 nm 处出现了吸收峰,说明 DNA-B 成功连接在了 AuNPs 上。未标记核酸的 AuNPs 与标记核酸的 AuNPs 光谱曲线形态基本一致,峰形变化不大,表明 DNA-B 标记后的 AuNPs 仍保持良好的稳定性。对 DNA-B 的用量及与 AuNPs 的结合时间优化发现:200 μ L 的 AuNPs 结合 3.0~3.4 μ L 100 μ mol/L 的 DNA-B 时 A_{260} 接近最大值,因此本研究选用 3.0 μ L 100 μ mol/L DNA-B 作为 200 μ L AuNPs 的最佳结合量;二者结合时间在 32~40 h 时 A_{260} 接近峰值,本实验选择 36 h 作为二者的结合时间。通过对改良 ELISA 的最佳反应条件优化,发现当 SA 水平达 5 μ g/mL、AuNPs@DNA-B 用量达 100 μ L 以上时, A_{450} 接近最大值,因此选择 5 μ g/mL 的 SA 作为最佳工作水平,AuNPs@DNA-B 用量选择 100 μ L;同时在 SA 和 AuNPs@DNA-B 最佳用量条件下对 SA-HRP 用量进行了优化,发现 SA-HRP 稀释度超过 1:3 000 时 A_{450} 迅速下降,说明稀释度过高导致 SA-HRP 的结合容量不足,因此本研究选用 1:2 000 作为 SA-HRP 的最终稀释度。将 IgE 标准品进行一系列稀释,用本实验构建的改良 ELISA 检测各水平的 A_{450} ,发现 IgE 水平在 0~30 ng/mL 时, A_{450} 与 IgE 呈现良好的线性关系,回归方程: $Y=$

0.139 84X+0.530 22, $R^2 = 0.983 32$, 其检测限为 0.012 ng/mL, 较传统 ELISA 的检测限 (0.24 ng/mL) 高约 19 倍。该平台检测的批内变异系数 < 2.0%, 批间变异系数 < 6.1%, 通过比较两种方法对不同水平 IgE 标准品的回收率, 发现改良 ELISA 回收率稍高于传统 ELISA, 但二者差别不大。另外, 本方法与其他常用方法相比, 其灵敏度远高于传统的免疫印迹法, 与化学发光法相近, 但低于放射免疫法和荧光免疫法^[20]。而放射免疫法除易造成放射性污染外, 其与荧光免疫法均需要昂贵的仪器和试剂, 难以在基层开展。

综上所述, 笔者通过 AuNPs@DNA-B 探针借助生物素-亲和素间的高亲和作用, 构建了改良的 ELISA 检测平台, 大大提高了检测灵敏度, 有较好的应用前景, 为抗原/抗体的高灵敏检测提供了参考。

参考文献

[1] ITO E, IHA K, YOSHIMURA T, et al. Early diagnosis with ultrasensitive ELISA[J]. *Adv Clin Chem*, 2021, 101: 121-133.

[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] IHA K, INADA M, KAWADA N, et al. Ultrasensitive ELISA developed for diagnosis[J]. *Diagnostics(Basel)*, 2019, 9(3): 78.

[4] GAMA R S, LEITE L A, COLOMBO L T, et al. Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2020, 53: e20200197.

[5] 张雪, 陈艳焦, 程觅, 等. 血清蛋白生物标志物免疫学测定技术研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(36): 24-28.

[6] VERNET R, CHARRIER E, GROGG J, et al. A Quantitative ELISA protocol for detection of specific human IgG against the SARS-CoV-2 spike protein[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(7): 770.

[7] SCHUBERT S M, ARENDT L M, ZHOU W, et al. Ultra-sensitive protein detection via single molecule arrays towards early stage cancer monitoring[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11034.

[8] LEE K X, SHAMELI K, YEW Y P, et al. Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 275-300.

[9] SARFRAZ N, KHAN I. Plasmonic gold nanoparticles (AuNPs): properties, synthesis and their advanced energy, environmental and biomedical applications[J]. *Chem Asian J*, 2021, 16(7): 720-742.

[10] FRENS G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in mono-disperse gold suspensions[J]. *Nature*, 1973, 241(105): 20-22.

[11] WANG Y, ZHANG X, WAN K, et al. Supramolecular peptide nano-assemblies for cancer diagnosis and therapy: from molecular design to material synthesis and function-specific applications[J]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 253.

[12] WATANABE S, HAGIHARA K, TSUKAGOSHI K, et al. Microbead-based ligase detection reaction assay using a molecular beacon probe for the detection of low-abundance point mutations[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(1): 900-906.

[13] 陈祥亭, 李忠. 金纳米材料的合成方法进展[J]. *山东化工*, 2021, 50(16): 100.

[14] SIMON J, UDAYAN S, BINDIYA E S, et al. Optical characterization and tunable antibacterial properties of gold nanoparticles with common proteins[J]. *Anal Biochem*, 2021, 612: 113975.

[15] SINGH P, PANDIT S, MOKKAPATI V R S S, et al. Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1979.

[16] TABATABAEI M S, ISLAM R, AHMED M. Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immunoprecipitation assays: a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 25(43): 250-266.

[17] HE Z, YIN H, CHANG C C, et al. Interfacing DNA with gold nanoparticles for heavy metal detection[J]. *Biosensors (Basel)*, 2020, 10(11): 167.

[18] YIN Y, CHEN G, GONG L, et al. DNAzyme-powered three-dimensional dna walker nanoprobe for detection amyloid β -peptide oligomer in living cells and in vivo[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(13): 9247-9256.

[19] YANG X J, CUI M R, LI X L, et al. A self-powered 3D DNA walker with programmability and signal-amplification for illuminating microRNA in living cells [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56(14): 2135-2138.

[20] MÄRKI I, REBEAUD F. Nanotechnologies for in vitro IgE testing[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2017, 17(7): 50.

(收稿日期: 2021-09-16 修回日期: 2022-01-08)