基于 Au/SiO_2 信号放大的人免疫球蛋白 G 电化学检测新方法

倪郦丽， 宋靓婧， 马小媛， 吴世嘉， 段 诺， 王周平 *
（江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要：将人免疫球蛋白 G(人 IgG)固定到导电玻璃 ITO 表面，利用抗原抗体有特异性结合制备出一种电化学免疫传感器。在导电玻璃 ITO 表面进行氨基化戊二醛修饰处理后，链接羊抗人 IgG；在二氧化硅微球表面进行氨基戊二醛化，2~5 nm 纳米金通过静电吸附在二氧化硅微球表面，利用 $H2O_2$ 进一步将纳米金还原后粒径变大，链接羊抗人 IgG。基于 Au/SiO_2 信号放大效应，利用人 IgG 对羊抗人 IgG 的特异性结合作用，人 IgG 分别与导电玻璃端和纳米材料端相结合，形成三明治夹心结构，建立了一种检测人 IgG 的电化学免疫新方法。电极表面的氧化还原峰电流值与人 IgG 的浓度在 1~200 ng/mL 内呈良好的线性关系，线性回归方程为 y=−0.532 6x+409.256 7，相关系数 R^2=0.994 8，检测限为 0.6 ng/mL。该电化学免疫传感器实现了对人免疫球蛋白 G 低成本、超灵敏的检测，有望应用于人体血清检测。

关键词：食品检验；二氧化硅；人免疫球蛋白 G；循环伏安法
中图分类号：R 392−33　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2015)01—0047—07

New Method of Electrochemical Immune Detection of Immunoglobulin G

NI Lili， *SONG Liangjing*， *MA Xiaoyuan*， *WU Shijia*， *DUAN Nuo*， *WANG Zhouping**
(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To develop a novel electrochemical immune biosensor based on antigen−antibody reaction with the immunoglobulin G immobilized the surface of the ITO. The side of ITO was immobilized the goat anti−human IgG after the amino−modified and glutaraldehyde modification. The side of SiO_2 also had the same modification of amino and Glutaraldehyde, and then 2~5 nm gold nanoparticles adsorbing the surface of SiO_2 by the use of electrostatic interaction. We immobilized the goat anti−human IgG after the reduction of H_2O_2 with bigger gold nanoparticles. When human IgG respectively combined with the ITO and nanomaterials, it would form the sandwich structure of a new detection of immunoglobulin G based on Au/SiO_2 to amplify signal amplification. The prepared biosensor showed a excellent linearity relationship of Cyclic voltammograms current value and the concentration of immunoglobulin G 1 ~200 ng/mL, the

收稿日期：2014−03−22
基金项目：教育部高等学校自主科研重点项目(JUSRP51309A)；教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET−11−0663)；教育部博士点博导基金(20110093110002)；江苏省科技支撑−社会发展项目(BE2012614)。
* **通信作者**：王周平(1974—)，男，陕西宝鸡人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品安全检测研究。E−mail：wangzp@jiangnan.edu.cn

equation of linear regression is y=−0.532 6x+409.256 7 (R^2=0.994 8),with a detection limit of 0.6 ng/mL. The established method is low cost and ultrasensitive,and can be used to detect immunoglobulin G.

Keywords: food analysis,silicon dioxide,immunoglobulin G,cyclic voltammetry

电化学免疫分析法是将免疫分析与电化学分析技术相结合的一种免疫分析新方法。免疫分析主要是基于用抗体(或抗原)作为选择性化学试剂以分析测定抗原(或抗体)及半抗原。目前最广泛的免疫检测技术有免疫酶联吸附试验(ELISA),免疫荧光技术(IFA),免疫凝集试验(IA)和免疫沉淀(IP),在生物检测领域它们发挥了极其重要的作用[1]。

电化学免疫检测技术是一种微量检测新技术,主要用于生物活性物质如抗原、抗体、激素等的检测。它将免疫反应的特异性和微电子技术结合,使免疫检测具有精度高、速度快、适合于小型化和集成化,显示了广阔的发展前景[2-6]。

近年来,纳米材料的出现在科学研究领域给人们以新的视野。纳米材料的结构决定了其产生的特殊效应,这是常规材料无法具有的性能[7]。随着人们对其研究愈来愈深入,人们已成功制备出各种纳米材料,纳米材料具有良好的导电性和宏观隧道效应,既能作为导线连接在生物分子与电极之间,又能起到加快异相界面电子传递速率的作用,增加了氧化还原物质在电极表面反应的可逆性,是优良的电极或电极修饰材料[8-9]。二氧化硅纳米材料由于其具有比表面积大、表面活性中心多、良好的单分散性、生物兼容性以及易功能化的特性被广泛应用到各个领域[10-11]。纳米金因为其吸附能力强,具有良好的稳定性和催化性能和导电性,而且能为蛋白质提供一个与本体环境相似的微环境,也有助于蛋白质与电极表面之间的直接电子转移而被广泛应用[12-14]。此外,纳米金在分析检测方面有着广泛的应用,如李井泉等[15]利用纳米金标记黄曲霉毒素 B_1 检测 AFB_1。

免疫球蛋白 G 是主要存在于人体血浆中含量最高的抗感染抗体,约占总免疫蛋白的 70%~75%,其含量的高低往往作为慢性感染、慢性肝病、免疫性疾病等疾病的参考值,所以对其含量检测意义重大。现有对人免疫球蛋白 G 检测方法有压电免疫传感器技术、酶免疫法和荧光免疫法等[16]。

作者通过构建电化学免疫传感器用于检测人免疫球蛋白 G(人 IgG),利用抗体-抗原的特异性结合反应,使得导电玻璃 ITO 表面链接羊抗人 IgG,羊抗人 IgG 标记 SiO_2/GNPs 纳米复合颗粒,利用人 IgG 对羊抗人 IgG 的特异性结合作用,人 IgG 分别与导电玻璃端和纳米材料端相结合,形成三明治夹心结构,基于 Au/SiO_2 信号放大效应,实现对人 IgG 的电化学检测。通过紫外分光光度计(UV-1800)、傅里叶红外光谱(FT-IR)、透射电子显微镜(TEM)、以及电化学方法表征从而实现对人 IgG 的免疫分析,建立了一种检测限低,灵敏度高的检测新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羊抗人 IgG(AB-0011)、人 IgG(AG-0011):购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;氯金酸($HAuCl_4$)、导电玻璃 ITO:购自深圳华南湘城科技有限公司;人血清:江南大学校医院提供;氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、碳酸钠(Na_2CO_3)、铁氰化钾($K_3[Fe(CN)_6]$)、硼氢化钠($NaBH_4$)、亚铁氰化钾($K_4Fe(CN)_6\cdot 3H_2O$)、碳酸钾(K_2CO_3)、双氧水(H_2O_2)、浓氨水、正硅酸四乙酯(TEOS)、戊二醛、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、无水乙醇、丙酮、氨丙基三乙氧基硅烷(APTES):均购自国药化学试剂,所用试剂均为分析纯,实验所用水为超纯水。

紫外分光光度计(UV-1800),JEM-2100HR 透射电子显微镜:日本 JEOL 公司产品;三电极体系:导电玻璃 ITO 工作电极、铂丝对电极、银/氯化银参比电极;CHI660D 电化学工作站:上海辰华仪器有限公司产品;HH-4 数显恒温水浴锅:常州荣冠实验分析仪器厂产品;DF-101S 型集热式磁力加热搅拌器:河南巩义市予华仪器厂产品;Direct-Q3 超纯水制备仪:美国 Millipore 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 ITO 导电玻璃的修饰 ITO 导电玻璃经洗涤剂、超纯水、丙酮、无水乙醇各超声 15 min,氮气吹

干后放于体积分数 1% APTES 的无水乙醇中，37 ℃反应 12 h，用无水乙醇超声洗涤 5 次，置于 120 ℃烘箱中放置 3 h。

将氨基化处理的 ITO 浸入 pH7.4 的缓冲溶液中常温放置 20 min，氮气吹干。再将 ITO 放于体积分数 5%的戊二醛的 PBS 溶液中常温反应 2 h，用 PBS、超纯水洗涤后氮气吹干，再将 ITO 放于质量浓度为 400 ng/mL 的羊抗人 IgG 溶液中，37 ℃摇床反应 1 h 后用超纯水洗涤 3 次，氮气吹干。

1.2.2 抗体标记的 SiO_2/GNPs 的制备

1）二氧化硅的制备　参照 Stober[17]溶胶–凝胶法方法，在 20 mL 无水乙醇和 10 mL 超纯水中，加入 5 mL 氨水，混匀加入 1.5 mL TEOS 和 5 mL 无水乙醇，待磁力搅拌器温度升至 30 ℃后，恒温磁力搅拌器搅拌 12 h 后，加入 400 μL 的 APTES，继续搅拌 2 h，离心洗涤加入体积分数 25%的戊二醛溶液，常温条件下磁力搅拌 2 h，7 200 r/min 离心 10 min，重复以上操作 3~4 次重新分散于 PBS 中。

2）纳米金的制备　将预冷的 200 mL 超纯水置于磁力搅拌器上，加入体积分数 1%的 $HAuCl_4$ 3 mL、0.2 mol/L 的 K_2CO_3 溶液 1 mL，搅拌均匀后迅速加入 9 mL 的 0.5 mg/mL $NaBH_4$。待溶液由最初的浅黄色变成酒红色，继续搅拌 10 min，得到 2~5 nm 粒径的纳米金。

3）SiO_2/GNPs 的制备　取上述制备的戊二醛化的 SiO_2 2 mL 超声分散于 20 mL 的超纯水中，逐滴加入到纳米金溶液中，持续搅拌 1 h，离心清洗后超声分散得到 SiO_2/GNPs。稀释 SiO_2/GNPs 溶液使得紫外吸收值 2.5，得到满足浓度的 SiO_2/GNPs 溶液。

称取 25 mg K_2CO_3 溶于 100 mL 超纯水中，磁力搅拌 10 min，加入体积分数 1%的 HAuCl4 溶液 1.5 mL，持续搅拌 20 min，得到 Au/K_2CO_3 生长溶液置于 4 ℃冰箱保存备用。在 20 mL 的 SiO_2/GNPs 溶液中，加入 240 mL 的 Au/K_2CO_3 与 4 mL 0.132 mol/L 的 H_2O_2 水溶液，常温条件下磁力搅拌 20 min 后，3 000 r/min 离心 30 min，重复以上操作 3~4 次后超声得到大粒径的 SiO_2/GNPs 纳米复合颗粒，加入 0.02 mg/mL 浓度的羊抗人 IgG 2 mL，37 ℃摇床中反应 1 h，3 000 r/min 转速离心 30 min，重复 3 次后超声分散于超纯水中，稀释 SiO_2/GNPs/羊抗人 IgG 溶液使得紫外吸收值 2，得到满足浓度的 SiO_2/GNPs/羊抗人 IgG 溶液，置于 4 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 电化学检测　配制铁钾电解液：准确称取 KCl：7.45 g、$K_3[Fe(CN)_6]$：0.329 g、$K_4[Fe(CN)_6]$：0.422 g，定容至 100 mL。

链接羊抗人 IgG 的 ITO 与不同浓度的人 IgG，37°C 摇床反应 1 h 后用超纯水充分洗涤 3 次，以除去非特异性吸附的人 IgG，再加入 0.1 mL SiO_2/GNPs/羊抗人 IgG 溶液，37 ℃特异性结合反应 1 h 后，再用超纯水充分清洗除去非特异性吸附的纳米复合颗粒，形成三明治型免疫复合结构。将三电极系统（以 ITO 三明治型免疫复合物为工作电极，以银/氯化银为参比电极，以铂丝为对电极）置于上述所制电解液中，起始电压设定为–0.2 V，扫描速率为 100 mV/s，开机预热后 30 min 后，用循环伏安法和阻抗频谱法对 ITO 链接的免疫复合材料进行检测。

2 结果与讨论

2.1 实验原理设计图

图 1 所示为基于 Au/SiO_2 信号放大的人免疫球蛋白 G 电化学免疫传感检测原理图。导电玻璃经过氨基化以及戊二醛修饰后成功链接羊抗人 IgG；参考 Stober[17]溶胶–凝胶法制备的二氧化硅微球同样经过氨基化戊二醛修饰后，将预先制备的 2~5 nm 纳米金通过静电吸附作用均匀的吸附在二氧化硅微球表面，H_2O_2 将 2~5 nm 的纳米金还原后，纳米金的粒径变大以增大电化学信号，通过戊二醛链接作用成功修饰羊抗人 IgG。利用抗原抗体的特异性结合作用，将修饰了羊抗人 IgG 的导电玻璃、人 IgG、羊抗人 IgG 修饰的纳米材料三者形成三明治夹心结构，用电化学方法进行表征，成功建立了检测人 IgG 的电化学免疫传感器。

2.2 ITO 表面修饰以及表征

利用循环伏安法对导电玻璃 ITO 每步修饰做了表征。从图 2 可以看出，空白导电玻璃 ITO 由于没有链接任何物质，空白导电玻璃 ITO 导电性最强，电流强度最大，随着依次在导电玻璃 ITO 表面修饰上氨基、戊二醛、羊抗人 IgG、人 IgG 后，使 ITO 表面阻值逐渐增大，导电性能减弱，相应的峰电流值不断减下（如图 2 中曲线 a、曲线 b、曲线 d、曲线 e、曲线 f），也同时证明了导电玻璃 ITO 表面修饰成功。最后，当链接了人 IgG 的导电玻璃与 SiO_2/GNPs/羊抗人 IgG 反应链接后，电流强度有明显增大趋势（图 2 中曲线 c 所示），这是由于 SiO_2 表面静电吸附

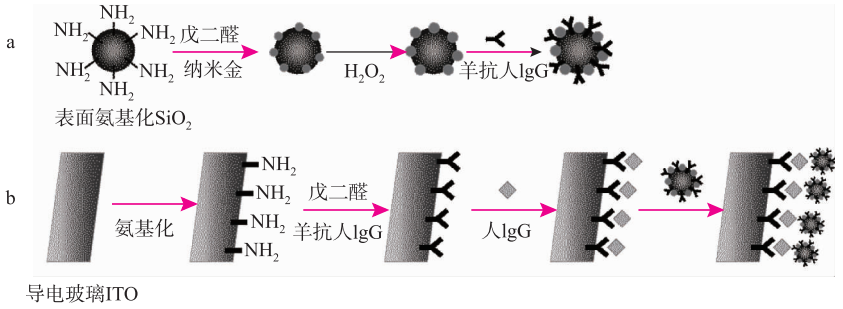
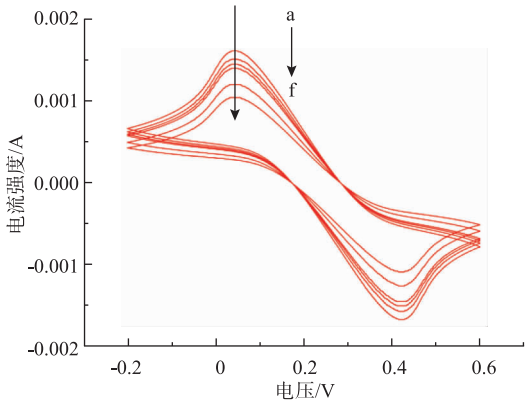


图 1　基于 ITO 及 Au/SiO_2 的“三明治夹心”结构检测人免疫球蛋白

Fig. 1　Schematics of “sandwich” structure based on ITO and Au/SiO_2 for immunoglobulin G detection

的纳米金具有导电性,促进电子的传递,从而能达到信号放大的作用。



a：空白 ITO;b:ITO/氨基化;c:ITO/氨基化/戊二醛化/羊抗人 IgG/人 IgG/羊抗人 IgG/Au/SiO_2;d:ITO/氨基化/戊二醛化;e:ITO/氨基化/戊二醛化/羊抗人 IgG;f:ITO/氨基化/戊二醛化/羊抗人 IgG/人 IgG

图 2　ITO 自组装电化学免疫传感器的循环伏安曲线表征图

Fig. 2　CV curves of characterizating the self-assembled of ITO electrochemical immunosensor biosensor

2.3　SiO_2 纳米材料表面修饰表征

图 3 是 SiO_2 的透射电子显微镜图,可以看出在乙醇相中分散性良好,粒径大小约为 80 nm,相对比较均一。图 4 是氨基化的 SiO_2 红外表征图,SiO_2 纳米颗粒的非对称 Si-O-Si 伸缩振动峰显示在最强的吸收峰 1 099 cm^{-1} 处,3 433 cm^{-1} 是强吸收峰为 N-H 的伸缩振动吸收峰,1 633 cm^{-1} 处的振动吸收峰为一级胺的 N-H 剪式振动吸收峰,红外图谱表明在 SiO_2 纳米材料表面已经成功修饰上氨基。

2.4　H_2O_2 还原前后的 Au/SiO_2 表征

图 5(a)是纳米金颗粒已经通过静电吸附作用成功吸附在 SiO_2 纳米材料表面，形成 Au/SiO_2 纳米复合材料。Au/SiO_2 通过 H_2O_2 的还原性作用将包覆在 SiO_2 表面的纳米金颗粒增大。图 5（b）显示经 H_2O_2 还原后,SiO_2 纳米材料外包覆的纳米金颗粒有明显增大趋势。

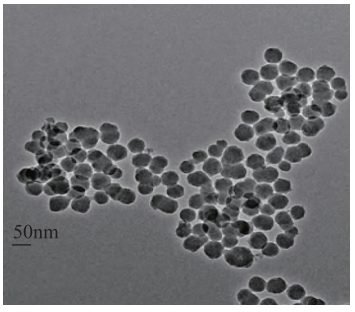


图 3　氨基化 SiO_2 纳米材料的 TEM 图

Fig. 3　TEM image of SiO_2 NPs

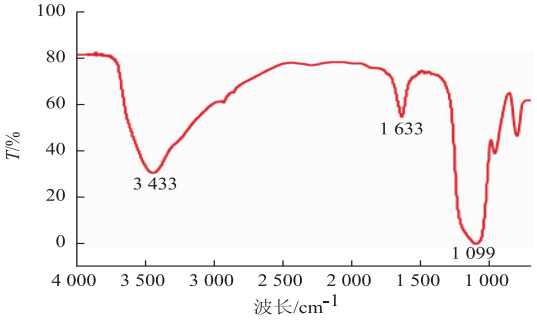
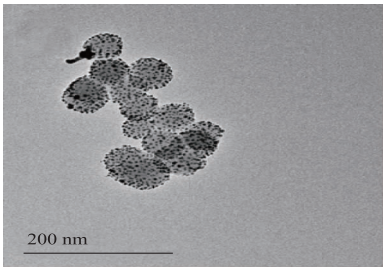
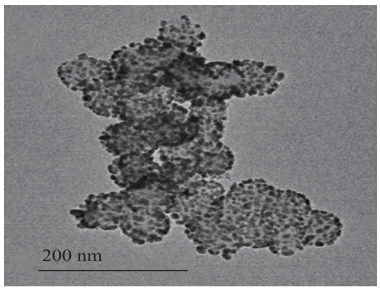


图 4　氨基化 SiO_2 纳米材料的红外图谱

Fig. 4　IR spectra of amine-functionalized SiO_2 NPs



(a)



(b)

图 5　Au/SiO_2 纳米复合材料(a)与 H_2O_2 还原后 Au/SiO_2 纳米复合材料(b)的 TEM 图

Fig. 5　TEM image of Au/SiO_2 NPs (a) and Au/SiO_2 reducted by H_2O_2(b)

图 5 是 Au/SiO_2 复合材料经 H_2O_2 还原前后紫外可见吸收对比图。未经 H_2O_2 还原的 Au/SiO_2 纳米复合材料在 520 nm 处有明显紫外吸收峰，经 H_2O_2 还原作用后，纳米金颗粒粒径增大，在 570 nm 处有明显紫外吸收峰，吸收峰明显红移，这是因为纳米金的粒径大小与紫外可见吸收峰有一定关系，随着纳米金粒径变大，纳米金的最大紫外吸收波长就会发生红移。因为 SiO_2 微球表面的纳米金粒径增大使得纳米金量增多，紫外可见吸收峰强度增强。证明 H_2O_2 成功还原 Au/SiO_2，可应用于后续实验。

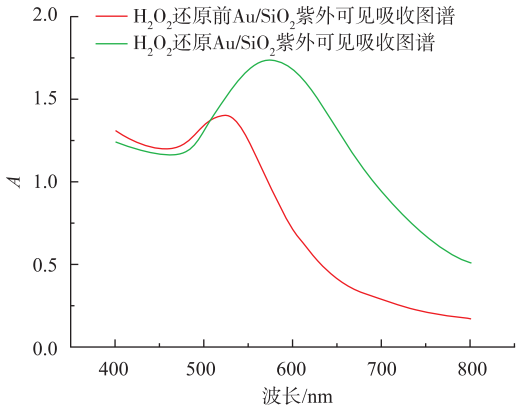


图 6　H_2O_2 还原前 Au/SiO_2 与 H_2O_2 还原后 Au/SiO_2 紫外可见吸收对比图谱

Fig. 6　UV –visible absorption spectrum of Au/SiO_2 reducted by H_2O_2 compared with Au/SiO_2

2.5　反应条件优化

考察人 IgG 与 ITO/羊抗人 IgG 特异性结合的免疫反应时间对循环伏安电流的影响。如图 7 表明，当人 IgG 溶液加入到链接了羊抗人 IgG 的导电玻璃中后，结合时间从 20 min 延长到 80 min，随着孵育时间延长，人 IgG 与羊抗人 IgG 结合量越多，整体阻值不断变大，循环伏安电流强度逐渐减小，当时间大于 60 min 后，循环伏安电流值降到最小，时间继续延长响应电流趋于平稳，说明当孵育时间为 60 min 时，人 IgG 与导电玻璃 ITO 表面羊抗人 IgG 之间的特异性结合基本完成。因此孵化时间选为 60 min。

图 8 为检测孵育温度 20~45 ℃的响应电流信号，发现随着温度的不断升高，人 IgG 与羊抗人 IgG 特异性结合越充分，阻值增大进而使得循环伏安电流值不断减小，当温度超过了 37 ℃以后信号有小幅上升，这是由于在 37 ℃条件下，ITO/羊抗人 IgG 与人 IgG 结合效果量达到最大值，导电玻璃链接物质达到最大使得阻值最大，因而循环伏安电流值最小，选择 37 ℃为最佳孵育温度。

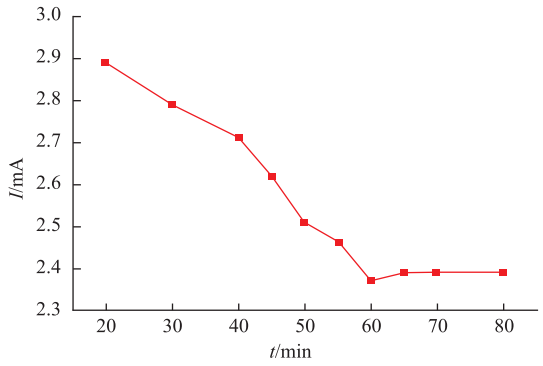


图 7　ITO 表面羊抗人 IgG 与人 IgG 不同孵育时间的循环伏安电流强度

Fig. 7　Cyclic voltammograms current value of different incubation time of the reaction of second antibody and antibody on the ITO

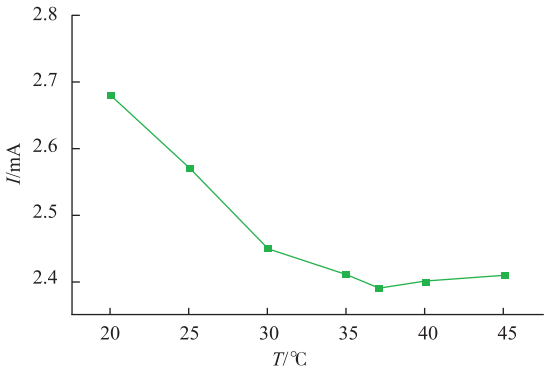
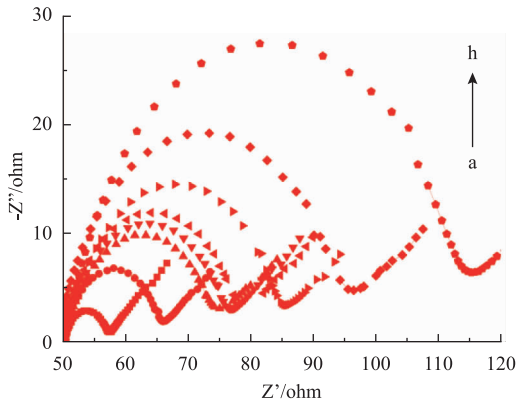


图 8　不同孵育温度条件下循环伏安电流值

Fig. 8　Cyclic voltammograms current value of different incubation temperature

2.6 人免疫球蛋白 G 的检测

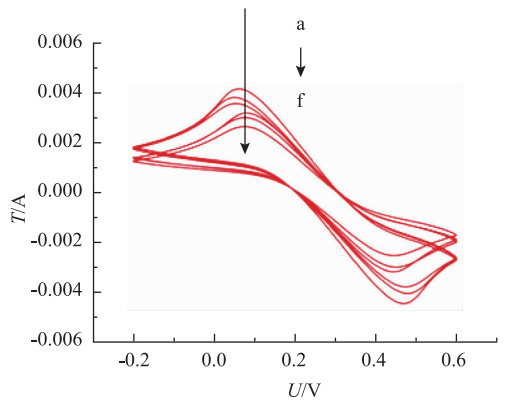
将人 IgG 稀释，分别选取人 IgG 质量浓度为空白、0.01、0.1、1、10、100、150、200、250、350 ng/mL。如图 9 中所示，随着在电化学免疫传感器中人 IgG 质量浓度的不断增大，阻抗图中的半径逐渐增大即阻抗不断增大，相应的在图 10 中显示为氧化还原峰电流值不断减小，这是因为随着免疫传感器中人 IgG 质量浓度不断增多，导电玻璃 ITO 表面链接的复合物质也会不断增多，因而导致了免疫传感器中氧化还原峰电流值不断减小。图 11 表明，氧化还原峰电流值与人 IgG 质量浓度在 1~200 ng/mL 范围内呈良好的线性关系，线性回归方程为 y=−0.532 6x+409.256 7，相关系数 R^2=0.994 8，检测限为 0.6 ng/mL。



a：空白；b：1 ng/mL；c：10 ng/mL；d：100 ng/mL；e：150 ng/mL；f：200 ng/mL；g：250 ng/mL；h：350 ng/mL

图 9　1~350 ng/mL 人 IgG 的阻抗频谱图

Fig. 9　Impedance spectrum of 1~350 ng/mL of immunoglobulin G



a：1 ng/mL；b：10 ng/mL；c：100 ng/mL；d：150 ng/mL；e：200 ng/mL；f：350 ng/mL

图 10　1~350 ng/mL 人 IgG 的 CV 图

Fig. 10　CV curves of 1~350 ng/mL of immunoglobulin G

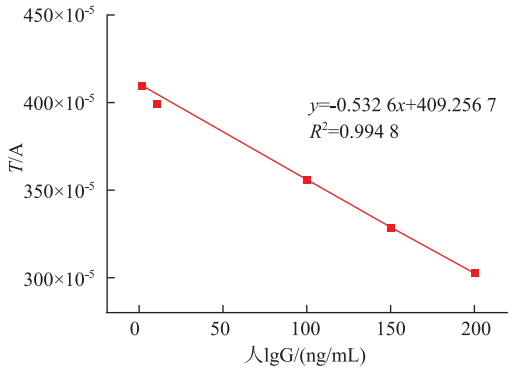


图 11　检测人 IgG 标准曲线

Fig. 11　Correlation of detection immunoglobulin G

2.7 实际血样中人 IgG 的检测

正常人血清中人免疫球蛋白 G 含量在 8~14 g/L，取正常人血清用 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲溶液稀释至检测限线性范围内后，用以上制备的免疫传感器测得 5 个样品中人 IgG 质量浓度分别为 9.2、10、7.9、8.3、9.1 g/L，向每个人血清样品中加入人 IgG 标准品 9 g/L，测得回收率分别为 96.2%、98.8%、101.6%，、97.7%、94.5%(表 1)。结果表明，该实验方法可用于实际样品的检测。

表 1　人血清中的 IgG 浓度检测结果

Table 1　Results of IgG decetion in human serum

血清编号	IgG 质量浓度/(g/L)	IgG 加入量/(g/L)	IgG 测得量/(g/L)	回收率/%
1	9.2	9	17.5	96.2
2	10	9	19.3	101.6
3	7.9	9	16.7	98.8
4	8.3	9	16.9	97.7
5	9.1	9	17.1	94.5

3 结　语

作者构建了一种简单灵敏的电化学免疫传感器，采用三明治夹心型模式检测人免疫球蛋白 G。此传感器利用 ITO 低成本，低阻值，结合金纳米粒子良好的导电性得以信号放大的优点，极大的提高了灵敏度。此电化学免疫传感器稳定性好，可有效改善电极表面的生物相容性和电子传递速率，可实现对人体血清中免疫球蛋白 G 的检测。

参考文献：

[1] 林颖，叶茂，韩双燕，等. 免疫检测技术的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2007，26(4)：118-120.
LIN Ying，YE Mao，HAN Shuangyan，et al. The progress on the research immunoassay [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2007，26(4)：118-120.(in Chinese)

[2] Su liu，Qing bin，Xiuming Zhang，et al. Electrochemical immunosensor based on mesoporous nanocomposites and HRP-functionalized nanoparticles bioconjugates for sensitivity enhanceddetection of diethylstilbestrol [J]. **Sensors and Actuators B**，2012，166-167：562-568.

[3] Lise Barthelmebs，Akhtar Hayat，Ambrosius Wis Limiadi，et al. Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection using superparamagnetic nanoparticles[J]. **Sensors and Actuators B**，2011，156(6)：932-937.

[4] WANG Yixian，PING Jianfeng，et al. Impedimetric immuno sensor based on gold nanoparticles modified graphenepaper for label-free detection of Escherichiacoli O157：H7[J]. **Biosensors and Bioelectronics**，2013，49：492-498.

[5] FANG Yishan，WANG Haiying. Electrochemical immunoassay for procalcitonin antigen detection based on signal amplification strategy of multiplenanocomposites[J]. **Biosensors and Bioelectronics**，2014，51：310-316.

[6] CHENG Chaonan，PENG Yuan. Rapid detection of Listeria monocytogenes in milk by self-assembled electrochemical immunosensor[J]. **Sensors and Actuators B**，2014，190：900-906.

[7] 朱世东，徐自强. 纳米材料国内外研究进展-纳米材料的应用与制备方法[J]. 热处理技术与装备，2010，31(4)：1-7.
ZHU Shidong，XU Ziqiang，BAI Zhenqian，et al. Research of the nano-materials at home and abroad-the applications and preparation of the nano-material[J]. **Heat Treatment Technology and Equipmen**，2010，31(4)：1-7.(in Chinese)

[8] 包孟如，朱桂茹，汪锰，等. 单分散球形纳米二氧化硅制备方法的研究进展[J]. 材料导报，2011，25：135-138.
BAO Mengru，ZHU Guiru，WANG Meng，et al. Progress on Preparation of Mono-dispersed Spherical Nano-silica [J]. **Journal of Materials**，2011，25：135-138.(in Chinese)

[9] 康永，柴秀娟. 纳米材料的性能及研究进展康[J]. 西部皮革，2010，32(15)：33-39.
KANG Yong，CHAI Xiujuan. The research progress of nanometer materials and their properties [J]. **West Leather**，2010，32(15)：33-39.(in Chinese)

[10] WU Yafeng，XU Peng，KAN Yuejun，et al. Highly specific and ultrasensitive graphene-enhanced electrochemical detection of low-abundance tumor cells using[J]. **Anal Chem**，2013，85：3166-3173.

[11] KI DO KIM，HEE TAIK KIM. Formation of silica nanoparticles by hydrolysis of TEOS using a mixed semi-batch/batch method [J]. **Sol-Gel Science and Technology**，2002，25：183-189.

[12] BAI Yu，YANG Hua，YANG Weiwei，et al. Gold nanoparticles-mesoporous silica composite used as an enzyme immobilization matrix for amperometric glucose biosensor construction[J]. **Sensors and Actuators B**，2007，124：179-186.

[13] HUANG Jiadong，LIN Qing，et al. Electrochemical immunosensor based on polyaniline/poly (acrylic acid) and Au-hybrid graphene nanocomposite for sensitivity enhanced detection of salbutamol[J]. **Food Research International**，2011，44：92-97.

[14] 李井泉，毛秀军，王周平，等. 纳米金标记黄曲霉毒素 B1 新型检测方法[J]. 食品与生物技术学报，2009，28(5)：676-681.
LI Jingquan，MAO Xiujun，WANG Zhoupin，et al. Nanogold labeling based novel detection method for aflatoxin B1 [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2009，28(5)：676-681.(in Chinese)

[16] 云雯，王晓英，董平，等. 基于电化学聚合固定抗体的电化学发光免疫分析法检测人免疫球蛋白 [J]. 分析化学研究报告，2009，37(1)：8-12.
YU Wen，WANG Xiaoying，DONG Ping，et al. Electrogenerated chemilum inescence immunoassay for human IgG with electrochemical polymerization based immobilization method[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**，2009，37(1)：8-12.(in Chinese)

[17] Stober W，Fink A，Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range [J]. **J Colloid Interf Sci**，1968，26(1)：62.