

改进酶联免疫吸附新方法检测甲胎蛋白

漆璐¹,林虹君²,张爱红³,王兴河¹

(1.首都医科大学 附属北京世纪坛医院药物 I 期临床试验研究室,北京 100038;
2.中国人民解放军 32311 部队,北京 102112;3.中国人民解放军陆军防化学院,北京 102205)

摘要:将纳米金(GNP,gold nanoparticle)功能化修饰的一抗(Ab1,first antibody)和氧化石墨烯(GO,graphene oxide)功能化修饰的二抗(Ab2,second antibody)通过原子转移自由基聚合反应(ATRP,atom transfer radical polymerization)应用于酶联免疫吸附(ELISA,enzyme linked immunosorbent assay)方法,提高检测灵敏度.考察了纳米材料的信号逐级放大效果,得出最佳条件为:辅助一抗/一抗(aAb1/Ab1,accessory antibody/Ab1)比值为 3:2,辣根过氧化物酶/二抗(HRP/Ab2,horseradish peroxidase/Ab2)比值为 160:1,在此条件下对甲胎蛋白(AFP,alpha fetoprotein)进行检测.结果表明,改进后的 GNP/ATRP/GO-ELISA(GAG-ELISA)方法灵敏度提高了 729 倍,而成本仅为传统 ELISA 法的 1/20.该研究提出的将多种纳米材料同时应用到传统检测方法中,实现信号逐级放大的思路是可行的,也为其他检测方法的改进提供了借鉴.

关键词:酶联免疫吸附;氧化石墨烯;原子自由基聚合;纳米金

中图分类号:Q533

文献标志码:A

ELISA 方法凭借抗体结合的特异性和酶的高催化等优点,长期以来一直广泛应用于生化分析和微量生物标志物检测等领域^[1].传统 ELISA 虽然广受欢迎,但由于需要大量的待检测物和抗体、耗时较长、步骤烦琐、检测限不够低等不足,其应用已越来越受到限制^[2-3].为了解决这些问题,越来越多的研究者开始改进并优化 ELISA,如引入新的纳米材料、改变生物反应载体^[4]和改善工艺等^[5-8].然而,这些改变仅在一定程度上解决了部分问题,并没有从根本上降低检测限.

本研究在传统 ELISA 方法中同时引入 GO,ATRP,GNP 和双一抗,通过四级信号放大,以达到提高敏感度、降低成本的目的.GNP 作为目前应用最广泛的纳米载体之一,具有粒径可控、易与不同蛋白质结合、不破坏待测物生物活性等优点^[9-10].石墨烯是一种单原子厚度的二维碳,凭借其超高的比表面积和简明的制备步骤,日益引起材料科学和分析研究的高度关注^[11].ATRP 是一种优良的接枝方法,可生成非交联线性聚合物链,广泛应用于 GO,GNP,碳纳米管等多种材料的表面改性^[12-19].

1 实验材料与方法

1.1 仪器与试剂

Milli-Q 型密理博纯水仪($\geq 18\text{ M}\Omega$,美国密理博 MILLIPORE 公司);85-2 数显型恒温搅拌器(国瑞试验仪器厂);Tecnai G220 型透射电镜(FEI 香港有限公司);SORVSL 型 LEGEND MICRO 17 centrifuge (Thermo 公司).

收稿日期:2020-04-17;修回日期:2020-06-20.

基金项目:国家科技重大专项—重大新药创制基金资助项目(2017ZX09304026);北京市科委关键技术平台“靶向性创新药物人体零期研究平台建设”(20180808).

作者简介:漆璐(1982—),女,江西宜春人,首都医科大学助理研究员,研究方向为临床试验,E-mail:865176915@qq.com;林虹君(1981—),男,山东菏泽人,中国人民解放军 32311 部队工程师,研究方向为蛋白质组学、生物新技术新方法,E-mail:13718007858@163.com.

通信作者:王兴河(1962—),男,吉林白城人,中国人民解放军陆军防化学院教授,博士生导师,研究方向为临床药理,E-mail:wangxh@bjsjth.cn.

GST 蛋白质,甲胎蛋白(AFP)样本,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(均购自 abcam 公司);牛血清白蛋白(BSA)、2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)、1-乙基-3-(3-二甲基氨)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(均购自 Sigma-Aldrich 公司);氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,南京市威圣化工贸易有限公司);柠檬酸钠(上海创顺化工有限公司); KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl , Tween 20(均购自北京化学试剂公司);实验用水为二次蒸馏水。

1.2 新方法的建立

以 GST 蛋白为模型, GAG-ELISA 新方法操作流程如下. 首先, GST 蛋白质添加到 96-ELISA 板, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵化 2 h. 其次, 加入 BSA 封闭, 用 PBST 洗涤 3 次, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下过夜. 最后, 洗涤 3 次后, 加入 TMB/ H_2O_2 显色. 5 min 后加入 2.0 mol/L H_2SO_4 终止反应, 分光光度计在 450 nm 下读数.

在一定范围内, 随着 HRP/Ab2 比值的增加, 检测信号也会随着增强. 但是, 当该比值增加到某一界限后, 信号反而会减小. 因此, 只有在最佳 HRP/Ab2 比值时, 才能产生最强的信号响应. 为了使检测信号最强, 将 Ab2 和 HRP 在不同的摩尔比下进行检测试验, 其结果如图 1 所示. 如图 1 所示, 从 a 到 e 检测中, 信号强度逐渐增大, 但从 e 到 h, 信号强度逐渐减弱. 因此选择 e (HRP/Ab2 为 $160:1$) 作为新方法 HRP/Ab2 的最佳比例.

1.3 GNP 和引发剂的制备

本研究制备 GNP 步骤如下: 首先, 所有的玻璃器皿都用王水 ($V_{\text{HCl}}:V_{\text{HNO}_3}=3:1$) 清洗, 用双蒸馏水冲洗, 然后烘干使用. 其次, 将 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液煮沸, 继续搅拌. 然后, 快速加入柠檬酸钠溶液, 搅拌 15 min ^[20-23]. 颜色逐渐由灰色变为蓝色, 然后是紫色, 最后呈酒红色. 最后, 继续煮沸 10 min , 将悬浮液储存在棕色的瓶子里, 用锡纸包裹避光. 等试剂瓶自然冷却至室温 (RT, room temperature), 储存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 备用.

1.4 aAb1-GNP-Ab1 的制备

众所周知, 有一些 Ab1 很难获得, 而且价格昂贵, 而另一些则恰恰相反. 因此, 我们引入了辅助一抗 (aAb1, 价格便宜且易获得). 此操作的目的是为了节约稀缺的 Ab1 和降低成本^[24-28].

aAb1-GNP-Ab1 制备步骤如下: 首先, 将 Ab1 和 aAb1 (这里使用的是 β -Actin-Ab1) 按照预定的比例加入到制备好的 GNP 悬浮液中. 其次, 轻轻地搅拌 2 h, Ab1 和 aAb1 通过相互作用附着在 GNP 表面^[29-30]. 然后, 用 BSA 溶液阻断反应, 30 min 后, $13\ 300\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min. 最后, 在底部得到暗红色沉积物即是 aAb1-GNP-Ab1, 冷却后储存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 备用. 加入 BSA 的目的是尽量减少非特异性吸附、增加稳定性. GNP 和 aAb1-GNP-Ab1 的透射电镜 (TEM) 图像如图 2 所示. 为了进一步证实 GNP 与抗体成功结合, 下面进行了 X 射线光电子能谱 (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) 分析.

从图 3 可以看到, aAb1-GNP-Ab1 的 XPS 谱图在 399.6 eV 处呈现出单一的 N1s 峰 (曲线 a), 而 GNP 的 XPS 谱图中则没有 N1s 峰 (曲线 b). 由此可见, aAb1-GNP-Ab1 中的 N1s 峰正是 GNP 与抗体结合而产生的.

我们知道, aAb1/Ab1 的比值是一个重要的因素, 该值大小影响检测限和成本两个方面, 只有选某一合适的值, 才能使控制成本和信号放大达到最佳平衡. 本研究中 aAb1/Ab1 比例采用的是 $3:2$, 参考相关文献^[31].

1.5 GO 和引发剂的制备

GO 的制备所采用的是改良的 Hummers 方法. 具体步骤如下: 首先, 将 0.5 g 硝酸钠和 0.5 g 石墨粉末加入到 20 mL 预冷的浓硫酸中, 搅拌反应 10 min ; 然后缓慢加入 4 g 高锰酸钾, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h ; 再向反应体系中缓慢加入 40 mL 蒸馏水, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h , 加入 100 mL 蒸馏水终止反应. 其次, 加入 2 mL 质量分数 30% 的 H_2O_2 , 室温反应 2 h , 将产物离心, 并用 1 L 的 HCl (质量分数 5%) 洗涤, 随后用 4 L 蒸馏水洗涤, 离心并再次洗涤. 最后, 将产物于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥 48 h , 此时即得到 GO 粉末, 置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 备用^[32-35].

引发剂的制备步骤如下: 将 0.3 g 的 11-巯基-1-十一烷醇溶于 6 mL 四氢呋喃 (提供反应的液体环境) 中,

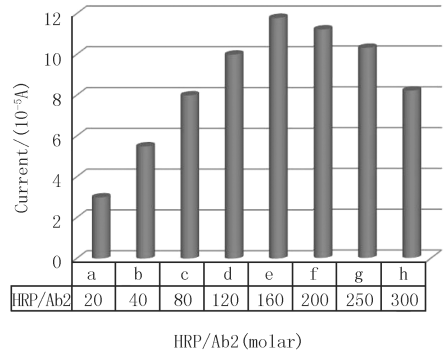


图1 不同HRP/Ab2比例下得到的检测信号

Fig.1 Detection signals at different HRP/Ab2 ratios

再加入 108 μL 吡啶(催化剂),混合后通入氮气除氧,置于冰浴中 30 min,之后缓慢滴加 164 μL 2-溴异丁酰溴,并且持续搅拌 4 h(持续通氮气),最后将反应后的溶液用滤纸过滤,用氮气吹干至略微黏稠,得到所述引发剂,充氮气后密闭于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[36].改进后的 GAG-ELISA 操作流程如图 4 所示.

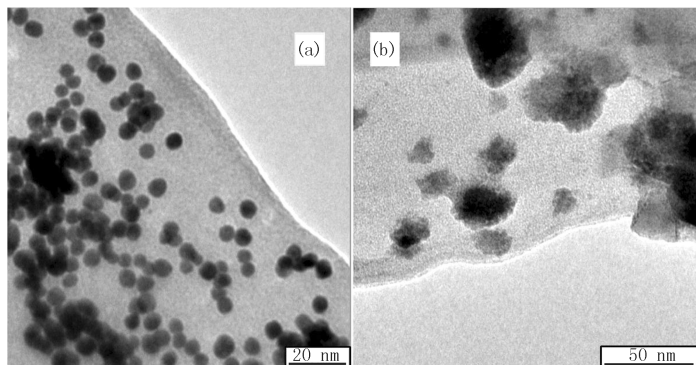


图2 GNP (a)和aAb1-GNP-Ab1 (b)的透射电镜图

Fig. 2 TEMs of GNP (a) and aAb1-GNP-Ab1 (b)

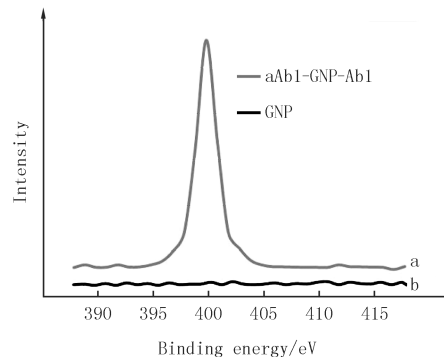
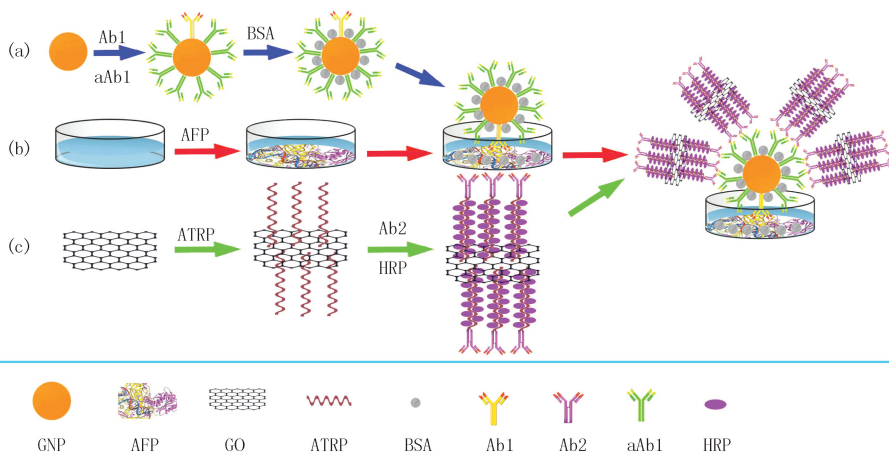


图3 aAb1-GNP-Ab1 (a)和GNP (b)的X射线光电子能谱图

Fig. 3 XPS of aAb1-GNP-Ab1 (a) and GNP (b)



首先,GNP与两种抗体Ab1和aAb1按预定比例结合,增加了一抗与抗原的结合比例,此为第一次信号放大.其次,GO的引入为后续提供了大量的活性位点,此为第二次信号放大.再次,ATRP聚合物链上有大量活性枝杈,这使得活性位点再次增加,此为第3次信号放大.最后,高比例的HRP/Ab2进一步放大了检测信号,此为第4次信号放大.

图4 GAG-ELISA新方法4次信号放大原理图

Fig. 4 Schematic diagram of four times signal amplification of the new GAG-ELISA method

2 结果与讨论

2.1 GO 的 ATRP 修饰

首先,用甲醇洗涤 3 次后,将葡萄糖和引发剂加入到 GO 溶液中,置于旋转仪上过夜.其次,将混合液用甲醇轻轻洗涤 3 次,然后加入混合物(2 mol/L GMA,0.02 mol/L CuCl₂,0.03 mol/L N,N,N',N',N''五甲基二亚乙基三胺、0.001 mol/L CuCl₂ 的环己醇溶液、0.03 mol/L 葡萄糖),室温下轻摇 24 h.最后,即得到 GO-ATRP,储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用^[37-38].

2.2 GO-ATRP 与 Ab₂,HRP 的结合

具体步骤如下:

(a)环氧基开环反应.首先,在水中制备质量分数 50%的异丙醇溶液,然后用该溶液制备质量分数 60%的乙二胺.其次,将 GO-ATRP 置于上述乙二胺溶液中(80 $^{\circ}\text{C}$)反应 4 h,使氨基暴露.

(b)醛基的反应.首先,配制 PBS 溶液(67.84 g 的磷酸氢二钠和 1.65 g 的磷酸二氢钠,溶于 2 L 的去离子水中).其次,配置戊二醛溶液(质量分数 40%戊二醛溶解在新制备的 PBS 溶液中).最后,将暴露氨基的 GO-

ATRP 加入到戊二醛溶液中,在 RT 下孵育 12 h,即在 GO-ATRP 表面修饰上醛基。

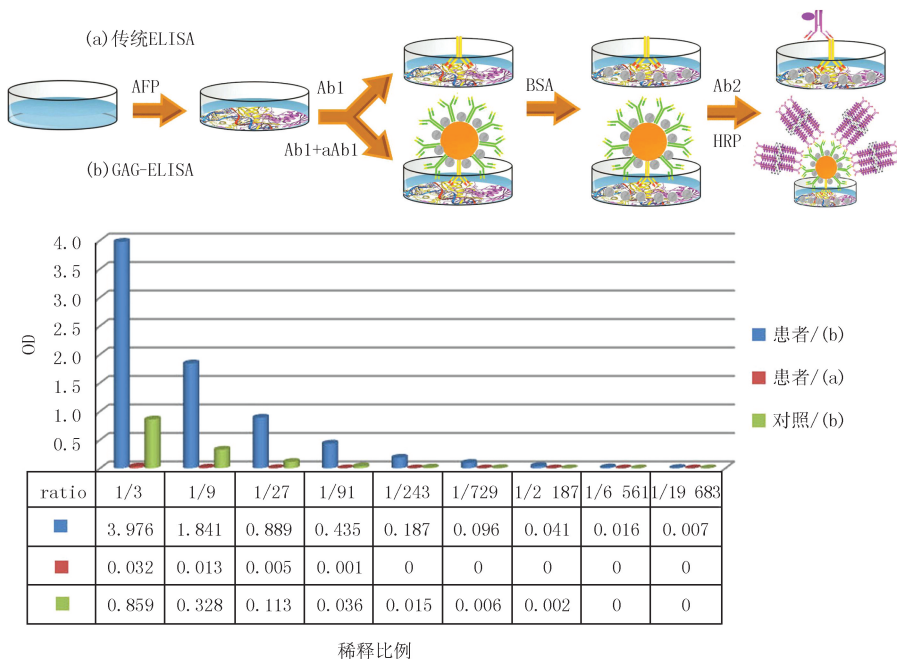
(c) Ab2 与 HRP 的结合.首先,用 PBS 溶液配制终浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Ab2 和 HRP 溶液($\text{pH}=8.0$),并加入氰基硼氢化钠使其终浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,将步骤 b 中获得的表面修饰有醛基的 GO-ATRP 置于该反应液中,在 4°C 过夜.然后,用 Tris-HCl 洗涤 3 次,即得到 GO-ATRP-(Ab2+HRP)共轭产物。

(d) 聚合物侧链剩余醛基的封闭.向 PBS 溶液中加入 1% 氨基乙醇,将新制备的 GO-ATRP-(Ab2+HRP)放入其中, 4°C 下反应 6 h.然后,用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液清洗 3 次后,置于 4°C 保存。

2.3 新方法性能考察

为了检验 GAG-ELISA 方法的性能,我们验证了它在 AFP 检测中的应用^[39].AFP 是一种重要的血浆蛋白质,主要来源于肝脏、卵黄囊和胎儿的胃肠道.成人血清中 AFP 浓度增高很可能是恶性肿瘤的症状,临床上也以此作为原发性肝癌诊断的一项指标.因此,灵敏、准确地检测出该指标至关重要。

为了验证新方法的性能,我们将新方法和传统方法进行了对比,AFP 和对照样品的实验结果如图 5 所示。



新方法和传统方法操作流程对比,将患者AFP血清和对照组(正常人血清)按初始的1/3、1/9、1/27、1/91、1/243、1/729、1/2 187、1/6 561、1/19 683进行稀释.患者样本分别采用GAG-ELISA法和传统ELISA法检测,对照组采用GAG-ELISA法检测.结果表明,传统的ELISA法在稀释到初始浓度的1/27时已不能有效地应用.而GAG-ELISA方法在待测物浓度达到初始浓度的1/6561时仍然有效.因此,GAG-ELISA法在复杂混合物中检测目标抗原是可行的,且灵敏度为传统方法的729倍。

图5 传统ELISA与GAG-ELISA操作流程与结果对比图

Fig.5 Operation flow and results comparison between traditional ELISA and GAG-ELISA

对比结果表明,GAG-ELISA 的检测灵敏度是传统 ELISA 方法的 729 倍.这也正是引入 GO,ATRP 和 GNP 产生信号逐级放大的结果。

值得一提的是,降低成本是 GAG-ELISA 的另一个显著改进.首先,一部分 aAb1(比 Ab1 便宜)替换了 Ab1,成本第一次降低.其次,更多的 Ab2 被 HRP 取代,由于 HRP 的价格低于 Ab2,成本进一步降低.以 AFP 为例,新方法总成本仅为传统 ELISA 方法的 1/20,成本的大幅节约主要是抗体的贡献。

为了评价 GAG-ELISA 新方法的重复性和稳定性,进行了相应的实验研究.在优化条件下,实验组和对照组连续检测 6 次.结果表明,该方法具有良好的稳定性和重复性。

3 结 论

本实验在传统 ELISA 方法中同时引入 GO,ATRP,GNP,双一抗和大量 HRP,建立了一种超灵敏的 GAG-ELISA 方法.通过对各中间体制备条件的考察,得到最佳反应条件,并在此条件下对实际样本中 AFP

进行了检测.通过 4 次信号放大,新方法灵敏度提高了 729 倍,成本降低至原水平的 1/20.因此,该方法能够拓宽传统 LIESA 在复杂混合物中痕量生物标志物的超灵敏检测,也为多种纳米材料在传统方法中的应用提供了思路.

作者贡献声明:林虹君与漆璐对本文有同等贡献.

参 考 文 献

- [1] DONG H B,ZOU F,HU X J, et al.Analyte induced AuNPs aggregation enhanced surface plasmon resonance for sensitive detection of paraquat[J].Biosensors and Bioelectronics,2018,117:605-612.
- [2] BAO Y P,WEI T F,LEFEBVRE P A, et al.Detection of Protein Analytes via Nanoparticle-Based Bio Bar Code Technology[J].Anal Chem,2006,78:2055-2059.
- [3] ZENG Y,BAO J,ZHAO Y N, et al.A sensitive label-free electrochemical immunosensor for detection of cytokeratin 19 fragment antigen 21-1 based on 3D graphene with gold nanoparticle modified electrode[J].Talanta,2018,178:122-128.
- [4] WANG Y,ALOCILJA E C.Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens[J].Journal of Biological Engineering,2015,9(16):1-7.
- [5] LIU L,ZHANG A H,WANG X H.A Sensitive and Simple Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Polymer as Carrier[J].Biol Pharm Bull,2020,43:757-761.
- [6] GAO W L,WANG W T,YAO S H, et al.Highly sensitive detection of multiple tumor markers for lung cancer using gold nanoparticle probes and microarrays[J].Analytica Chimica Acta,2017,958:77-84.
- [7] WU S W,YU Y A,LIU B H, et al.Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Rapid Gold Nanoparticle Immunochromatographic Strip for Detecting Citrinin in Monascus Fermented Food[J].Toxins,2018,10:354-367.
- [8] HE B S,YAN X H.Modifications of Au Nanoparticle-Functionalized Graphene for Sensitive Detection of Sulfanilamide[J].Sensors,2018,18:846-858.
- [9] DIXIT C K,VASHIST S K,O'NEILL F T, et al.Development of a High Sensitivity Rapid Sandwich ELISA Procedure and Its Comparison with the Conventional Approach[J].Anal Chem,2010,82:7049-7052.
- [10] HUANG L,WANG D B,SINGH N, et al.A dual-signal amplification platform for sensitive fluorescence biosensing of leukemia-derived exosomes[J].Nanoscale,2018,10:20289-20295.
- [11] CAO Y,GRIFFITH B,BHOMKAR P, et al.Functionalized gold nanoparticle-enhanced competitive assay for sensitive small-molecule metabolite detection using surface plasmon resonance[J].Analyst,2018,143:289-296.
- [12] CHENG C M,MARTINEZ A W,GONG J L, et al.Paper-Based ELISA[J].Angew Chem,2010,122:4881-4884.
- [13] QI L,ZHANG A H,WANG Y, et al.Atom transfer radical polymer-modified paper for improvement in protein fixation in paper-based ELISA[J].BMC Chemistry,2019,13:110-116.
- [14] LIU L,ZHANG A H,WANG X H.Ultrasensitive Paper-based ELISA by Introducing Atom Transfer Radical Polymer-modified Graphene Oxide Sheets and Gold Nanoparticles[J].Chem Lett,2019,48:779-782.
- [15] PAGÁN M,SUAZO D,TORO N D, et al.A comparative study of different protein immobilization methods for the construction of an efficient nano-structured lactate oxidase-SWCNT-biosensor[J].Biosensors and Bioelectronics,2015,64:138-146.
- [16] MARTA G C,ENCINAR J R,COSTA-FERNANDEZ J M, et al.Highly sensitive nanoparticle-based immunoassays with elemental detection; Application to Prostate-Specific Antigen quantification[J].Biosensors and Bioelectronics,2016,85:128-134.
- [17] SEO S H,LEE Y R,JEON J H, et al.Highly sensitive detection of a bio-threat pathogen by gold nanoparticle-based oligonucleotide-linked immunosorbent assay[J].Biosensors and Bioelectronics,2015,64:69-73.
- [18] XU H F,DAI H,CHEN G N.Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin protein entrapped in graphene and chitosan composite film[J].Talanta,2010,81:334-338.
- [19] HUANG L H,HOU K Y,JIA X, et al.Preparation of novel silver nanoplates/graphene composite and their application in vanillin electrochemical detection[J].Materials Science and Engineering C,2014,38:39-45.
- [20] PHAM X H,HAHM E,KIM T H, et al.Enzyme-catalyzed Ag Growth on Au Nanoparticle-assembled Structure for Highly Sensitive Colorimetric Immunoassay[J].Scientific Reports,2018,8:6290-6297.
- [21] WU Y F,SHI H Y,YUAN L, et al.A novel electrochemiluminescence immunosensor via polymerization-assisted amplification[J].Chem Commun,2010,46:7763-7765.
- [22] CHONG R,RHO J E R,YOON H J, et al.1,1-Oxalyldiimidazole chemiluminescent enzyme immunoassay capable of simultaneously sensing multiple markers[J].Biosensors and Bioelectronics,2012,32:19-23.
- [23] SIA S K,LINDER V,PARVIZ B A, et al.An Integrated Approach to a Portable and LowCost Immunoassay for Resource-Poor Settings [J].Angew Chem,2004,116:504-508.
- [24] JAFARI M T,REZAEI B,BAHRAMI H.Zirconium dioxide-reduced graphene oxide nanocomposite-coated stir-bar sorptive extraction

- coupled with ion mobility spectrometry for determining ethion[J].*Talanta*,2018,182:285-291.
- [25] FANG S,ZHANG B,REN K W,et al.Development of a Sensitive Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ic-ELISA) Based on the Monoclonal Antibody for the Detection of the Imidaclothiz Residue[J].*J Agric Food Chem*,2011,59:1594-1597.
- [26] ERHAN Z,EDEN M N,SABRI A,et al.Graphene-based hybrid for enantioselective sensing applications[J].*Biosensors and Bioelectronics*,2017,87:410-416.
- [27] CHEN X F,GUO Z Z,TANG Y G,et al.A highly sensitive gold nanoparticle-based electrochemical aptasensor for theophylline detection [J].*Analytica Chimica Acta*,2018,999:54-59.
- [28] XUE Y,ZHAO H,WU Z J,et al.The comparison of different gold nanoparticles/graphene nanosheets hybrid nanocomposites in electrochemical performance and the construction of a sensitive uric acid electrochemical sensor with novel hybrid nanocomposites[J].*Biosensors and Bioelectronics*,2011,29:102-108.
- [29] XU R,JIANG Y D,XIA L,et al.A sensitive photoelectrochemical biosensor for AFP detection based on ZnO inverse opal electrodes with signal amplification of CdS-QDs[J].*Biosensors and Bioelectronics*,2015,74:411-417.
- [30] YI Y H,ZHU G B,SUN H,et al.Nitrogen-doped hollow carbon spheres wrapped with grapheme nanostructure for highly sensitive electrochemical sensing of parachlorophenol[J].*Biosensors and Bioelectronics*,2016,86:62-67.
- [31] LIN H J,LIU Y F U,HUO J R,et al.Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Strategy Using Graphene Oxide Sheets and Gold Nanoparticles Functionalized with Different Antibody Types[J].*Anal Chem*,2013,85:6228-6232.
- [32] GU H,YU Y Y,LIU X Q,et al.Layer-by-layer self-assembly of functionalized graphene nanoplates for glucose sensing in vivo integrated with on-line microdialysis system[J].*Biosensors and Bioelectronics*,2012,32:118-126.
- [33] AMBROSI A,AIRO F,MERKOC A.Enhanced Gold Nanoparticle Based ELISA for a Breast Cancer Biomarker[J].*Anal Chem*,2010,82:1151-1156.
- [34] SHEN J F,HU Y Z,SHI M,et al.One Step Synthesis of Graphene Oxide-Magnetic Nanoparticle Composite[J].*J Phys Chem C*,2010,114:1498-1503.
- [35] HU Y W,HUA S C,LI F H,et al.Green-synthesized gold nanoparticles decorated graphene sheets for label-free electrochemical impedance DNA hybridization biosensing[J].*Biosensors and Bioelectronics*,2011,26:4355-4361.
- [36] CHEN F,HOU S K,LI Q S,et al.Development of Atom Transfer Radical Polymer-Modified Gold Nanoparticle-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)[J].*Anal Chem*,2014,86:10021-10024.
- [37] TANG J,TANG D P,SU B L,et al.Enzyme-free electrochemical immunoassay with catalytic reduction of p-nitrophenol and recycling of p-aminophenol using gold nanoparticles-coated carbon nanotubes as nanocatalysts[J].*Biosensors and Bioelectronics*,2011,26:3219-3226.
- [38] CAO J T,YANG J J,ZHAO L Z,et al.Graphene oxide@gold nanorods-based multiple-assisted electrochemiluminescence signal amplification strategy for sensitive detection of prostate specific antigen[J].*Biosensors and Bioelectronics*,2018,99:92-98.
- [39] JIN J,ZHANG X Y,SHI J L,et al.Application of AFP whole blood one-step rapid detection kit in screening for HCC in Qidong[J].*Am J Cancer Res*,2017,7(6):1384-1388.

Detection of alpha fetoprotein by improved enzyme-linked immunosorbent assay

Qi Lu¹, Lin Hongjun², Zhang Aihong³, Wang Xinghe¹

(1.Phase I Clinical Trial Center, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China;

2.Unit 32311 of PLA, Beijing 102112, China; 3.Institute of Chemical Defense of PLA, Beijing 102205, China)

Abstract: In this paper, Gold nano particle(GNP) functionalized first antibody(Ab1) and graphene oxide(GO) functionalized second antibody(Ab2) were applied to enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) by atom transfer radical polymerization(ATRP) to improve the detection sensitivity. The results show that the ratio of aAb1/Ab1 and HRP/Ab2 is 3 : 2 and 160 : 1 respectively. Under these conditions, AFP was detected. The results showed that the sensitivity of the improved GNP/ATRP/GO-ELISA(GAG-ELISA) was increased by 729 times, and the cost was only one twentieth of that of the traditional ELISA. In this research, the idea of applying a variety of nano materials to the traditional detection method at the same time to realize the step-by-step signal amplification is feasible, and also provides a reference for other detection methods.

Keywords: enzyme linked immunosorbent assay; graphene oxide; atom transfer radical polymerization; nano gold

[责任编辑 王凤产 杨浦]