

新型凝集技术快速检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌

杨磊, 赵广英, 窦文超*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江省食品安全重点实验室, 杭州 310012)

摘要: 为探求鸡白痢、鸡伤寒沙门菌快速检测的新型凝集技术, 尝试用3种有机活性染料与抗体分别修饰二氧化硅活性微球制成免疫彩色二氧化硅微球(ICSN), 构建快速检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌新型凝集技术。利用反相微乳法制备彩色二氧化硅纳米微球(CSN), 用扫描电镜表征形貌特征和分散程度, 通过凝集现象表征对鸡白痢、鸡伤寒沙门菌的检测效果。结果表明该新型凝集技术灵敏度好, 其凝集结果醒目、直观、易于肉眼判别, 且耗用抗体不到常规凝集试验的1/500, 对目标菌的检测范围为 $10^2 \sim 10^9$ cfu · mL⁻¹; 重复性和稳定性好, 4 ℃放置28 d后, 凝集效果与放置前无显著差异; 具有较好的特异性和准确性。用ICSN构建的新型凝集技术具有灵敏、经济、稳定、简便、快速、准确等优点, 不仅适用于快速检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌, 还可为其它致病微生物快速检测提供基础模型。

关键词: 有机活性染料; 免疫彩色二氧化硅微球; 新型凝集技术; 快速检测; 鸡白痢沙门菌; 鸡伤寒沙门菌

中图分类号: S852.61; S851.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)12-1994-06

The New Agglutination Test for Rapid Detection of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum*

YANG Lei, ZHAO Guang-ying, DOU Wen-chao*

(Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The aim of this study was to develop a new agglutination test for the rapid detection of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* (*S. pullorum* and *S. gallinarum*). In this study, three kinds of organic reactive dye and antibody were used to modify silica nanoparticles to prepare the immune colored silica nanoparticles (ICSN), ICSN were used to build new agglutination test for rapid detection of *S. pullorum* and *S. gallinarum*. The colored silica nanoparticles (CSN) were synthesized by reverse microemulsion method. The morphology and degree of dispersion of CSN were characterized by SEM. The agglutination test was used to characterize the detection effect of *S. pullorum* and *S. gallinarum*. The results showed that the new agglutination test was very sensitive, the aggregation results were prominently, intuitive and easy to distinguish by naked eye, moreover, consumption of antibody in new agglutination test is only 1/500 of that consumed in traditional test, the linear range for *S. pullorum* and *S. gallinarum* was from 10^2 to 10^9 cfu · mL⁻¹. It was very stable and repeatable, after being stored at 4 ℃ for 28 days, the aggregation effect showed no significant difference; It also showed specificity and accuracy. The new agglutination test was simple, fast, accurate, sensitive and economic. This new agglutination test could not only be used for detecting *S. pullorum* and *S. gallinarum* rapidly, but also provide a basis model for rapid detection of other pathogenic bacterium.

收稿日期: 2013-07-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571623); 研究生科技创新项目(1110XJ151213)

作者简介: 杨磊(1987-), 男, 安徽阜阳人, 硕士生, 主要从事食品质量与安全研究, Email: yangleizgs@163.com

* 通信作者: 窦文超, E-mail: wenchaodou@gmail.com

Key words: organic reactive dyes; immune colored silica nanoparticles; the new agglutination test; rapid detection; *Salmonella pullorum*; *Salmonella gallinarum*

鸡白痢和鸡伤寒分别由鸡白痢沙门菌(*Salmonella pullorum*, *S. pullorum*)和鸡伤寒沙门菌(*Salmonella gallinarum*, *S. gallinarum*)引起。鸡白痢主要侵害 2~3 周龄的雏鸡,引起白色下痢,病死率较高。鸡伤寒沙门菌对雏鸡、成年鸡均可致病,以引起出血、白细胞增多、贫血为特征,病死率高达 100%^[1-4]。鸡白痢、鸡伤寒对养禽业危害巨大,并通过多种途径传染给人,对人类健康造成严重威胁^[5-6]。建立更好的快速检测技术对禽及人相关疾病的及时预防、监测、预警、诊断、流行性病学调查和防疫效果评价都是非常必要的。鸡白痢和鸡伤寒沙门菌同属于 D 血清型,具有共同的 O1、O9 和 O12 抗原,免疫学检测时可被同时检测出来^[7]。目前,对这 2 种菌的检测方法有标准方法和快速检测方法,这些方法各有优点和缺点。凝集试验检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌具有操作简便、快速准确和判断直观等优点,且对检测条件要求低,不需借助特殊仪器设备,适合各类各级检验检疫部门使用。为提高凝集试验检测的灵敏度和准确性,通常选用间接凝集试验。间接凝集试验是以某种微球作为载体,将抗体/抗原修饰到载体表面,然后与相应抗原/抗体感作,根据特异性凝集现象的出现与否判定阴、阳性结果^[8-9]。载体的性能对凝集试验有重要影响,常用的载体有绵羊红细胞和聚苯乙烯乳胶微球等,绵羊红细胞与抗体的结合能力较好,且具有较鲜艳的红色,易于反应结果判断,但红细胞的稳定性较差,处理并标记好的红细胞也较脆弱易溶血,且易污染,难较长时间保存。聚苯乙烯乳胶微球^[10]经济、易得,虽比红细胞稳定性强,但也较易溶胀,且与蛋白的结合能力及凝集性能较差,用其做间接凝集试验的载体也不太理想。寻找更加理想的载体是有效改进间接凝集试验的最关键因素。近年来,二氧化硅活性微球(silica nanoparticles, SN)因其具有稳定、耐储存、不溶胀、生物相容性好和经济易得等优良性能,在分析检测领域备受关注^[11-13],但用二氧化硅微球作为载体,其本身无色,凝集结果不够显著和直观,会影响其敏感性和准确性的判定,如果在保证二氧化硅微球已有优良性能的前提下,使其带有稳定而鲜艳的颜色,可有效克服上述不足使其成为理想的载体。有机活性染料(organic reactive dyes, ORD)色彩丰

富,生物相容性好,在光照、高温、强酸、强碱等恶劣的条件下稳定、不褪色,且自身具有活性基团可以和氨基、羟基以及羧基发生化学作用等优点。如能将有机活性染料和二氧化硅微球的特性和优点相结合,克服其不足,就可制成理想的凝集试验载体,以构建新型凝集技术。

本研究尝试用有机活性染料和二氧化硅微球,通过选择、改进和优化制备条件,研制成粒径大小可控、不溶胀、稳定耐储、不自凝、表面光滑、形状规则、生物相容性好、色彩鲜明、色泽稳定、并能制成多种颜色的彩色二氧化硅微球(colored silica nanoparticles, CSN),对 CSN 羧基活化后再修饰上鸡白痢、鸡伤寒沙门菌抗体,制成免疫彩色二氧化硅微球(immune colored silica nanoparticles, ICSN),用其作为载体,欲构建一种更加直观、灵敏、经济、准确、稳定、简便的新型凝集技术。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

场发射扫描电镜 SU-70(日本日立公司);Nano 2S 激光粒度电位仪(英国马尔文仪器有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);低温高速离心机(北京五洲东方科技发展有限公司);隔水式恒温培养箱(上海森信试验仪器有限公司);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

鸡白痢、鸡伤寒沙门菌(*Salmonella pullorum* & *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* & *S. gallinarum*, 79-1、79-7)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*, ATCC 8739)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus Subtilis*, *B. Subtilis*, ATCC 6633)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*, *S. flexneri*, ATCC 7064)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*, *E. Sakazakii*, ATCC 29544)(研究前均用国标法进行验证);鸡白痢抗体(上海友科生物科技有限公司);正硅酸乙酯(teraethyl orthosilicate, TEOS, 无锡市展望化工试剂有限公司);3-[2-(2-氨基乙基氨基)乙基氨基]丙基-三甲氧基硅烷(3-[2-(2-Aminoethylamino) ethylamino] propyl-Trimethoxysilane, APTE, 天津希恩思生化科技有限公司);N,N-二甲基甲酰胺

(N,N-Dimethylformamide, DM, 上海申翔化学试剂有限公司); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸 (1-(3-Dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimide-hydrochloride, DEHE, Aladdin chemistry co. ltd); Triton X-100 (AMRESCO SOLON, OHIO44139); 正己醇(成都市科龙化工仪器厂); 环己烷(成都市科龙化工试剂厂); 硅烷偶联剂 KH-550(南京道宁化工有限公司)、甲醛(成都市科龙化工试剂厂)、高纯氮(杭州今工特种气体有限公司)、其它试剂均为分析纯, 试验用水均为双蒸水。

1.2 抗原制备

制取一定浓度的鸡白痢、鸡伤寒沙门菌, 用 0.4% 甲醛溶液灭活^[14], 取灭活菌液倒平板进行灭活检测, 确定灭活后稀释成试验所需浓度备用。

1.3 CSN 的制备

采用油包水的反相微乳液法合成 CSN^[15]。Triton X-100、正己醇、环己烷分别作为表面活性剂、助表面活性剂和有机溶剂, 具体如下: 将 8 mL 环己烷、2 mL 正己醇和 2 g Triton X-100 混合振荡至澄清, 加入 400 μL 超纯水作为分散相, 形成透明且稳定的油包水微乳液, 再将 100 μL 的 TEOS 加入到微乳液反应体系中作为反应前体, 搅拌反应 30 min 后在反应液中加入 100 μL 氨水作为催化剂以促进 TEOS 更快的通过水解缩合反应形成微球。为了使合成出的微球显色, 在反应过程中分别加入有机活性染料活性大红 3G、活性橙黄 X-GN、活性蓝绿(活性翠兰 KN-G 与活性嫩黄 4GLN 按 1:1 调配) 各 150 μL ; 为消除二氧化硅纳米微球之间的

团聚, 加入 20 μL 硅烷偶联剂 KH-550 在微球表面引入氨基, 增大表面电位以促进微球之间的分散度, 形成单分散彩色微球。连续反应 48 h 后用丙酮破乳、离心并收集颗粒, 把得到的 CSN 分散在 5 mL 超纯水中备用。

1.4 CSN 的表征

采用场发射扫描电镜 SU-70 和 Nano 2S 激光粒度电位仪对各参数下制备的二氧化硅纳米微球的粒径和形貌进行表征。

1.5 ICSN 的制备

CSN 的活化: 将合成好的 CSN 用超纯水清洗 3 次, 分散到 20 mL 水中超声 10 min 使微球均匀分散, 分别加入 1.4 mL 冰乙酸和 0.2 mL 的 APTE 搅拌均匀后持续振荡反应 1 h。将反应后的微球用水清洗 3 次, 分散到 10 mL 琥珀酸酐和 DMF 的混合溶液中在通氮气条件下持续振荡反应 5 h, 离心、清洗后的微球在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

ICSN 的制备(制备及凝集试验原理见图 1): 配制 pH6.8 浓度为 0.1 mol \cdot L⁻¹ 的吗啉乙磺酸缓冲液(MES), 在 5 mL MES 缓冲液中分别加入 500 mg 的 N-羟基丁二酰亚胺和 500 mg 的 DEHE, 用于微球表面基团的活化。离心得到的活化微球分散到 pH7.3 浓度 0.1 mol \cdot L⁻¹ PBS 中。取 10 mL 分散好的活化微球与 10 μL 鸡白痢凝集抗体, 孵育 4 h, 用 PBS 清洗、离心后得到 ICSN, 分散到 5 mL PBS 中, 相当于将原来凝集用抗体稀释到 500 倍以上的浓度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

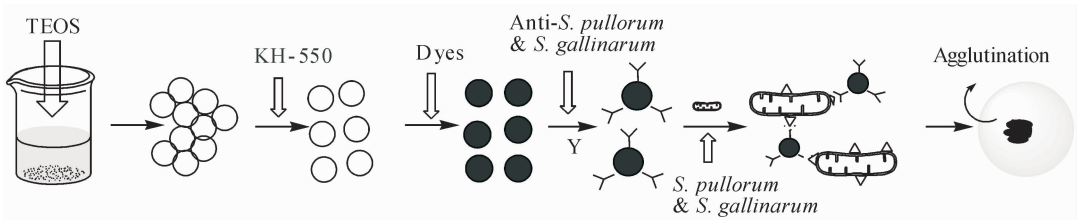


图 1 ICSN 的制备及凝集试验原理

Fig. 1 Preparation of the ICSN and principle of the agglutination test

1.6 3 种不同颜色 ICSN 凝集试验

将 3 种不同颜色的 ICSN 各 20 μL 分别与等量的待测样品滴加在洁净的凹圆载玻片上, 用枪头搅匀, 再轻轻摇晃使其充分反应, 在 1~3 min 内观察凝集现象, 同时设阴性对照, 所有凝集反应均在室温(22 $^{\circ}\text{C}$ 左右)下进行。

1.7 ICSN 的特异性

将标记鸡白痢抗体的 ICSN 分别与浓度相同的鸡白痢沙门菌、鸡伤寒沙门菌、大肠埃希菌、阪崎肠杆菌、福氏志贺菌、枯草芽孢杆菌同时做凝集试验, 用生理盐水做阴性对照, 观察凝集现象。

1.8 稳定性

将制备好的 ICSN 在 4 ℃ 条件下放置 28 d 后,观察与鸡白痢、鸡伤寒沙门菌的凝集效果,测其储存稳定性。

1.9 ICSN 的敏感性

用红色 ICSN 分别与浓度为 $10^2 \sim 10^9$ cfu · mL⁻¹ 的鸡白痢、鸡伤寒沙门菌进行凝集反应,观察凝集效果,评价其敏感性。

1.10 最适凝集浓度比例选择试验

将 ICSN 按一定比例稀释并与浓度范围为 $10^1 \sim 10^9$ cfu · mL⁻¹ 的鸡白痢、鸡伤寒沙门菌在室温条件下做方阵凝集试验,观察凝集现象,以确定最适凝集浓度。

1.11 准确性验证试验

分别取鸡蛋、鸡肉、鸡肝、鸡肠、鸡心和脾 6 种样品,每种 5 份,每份重复做 2 次,共计 30 份样品 60 次,分别用新型凝集试验法和国标法进行对照检测。

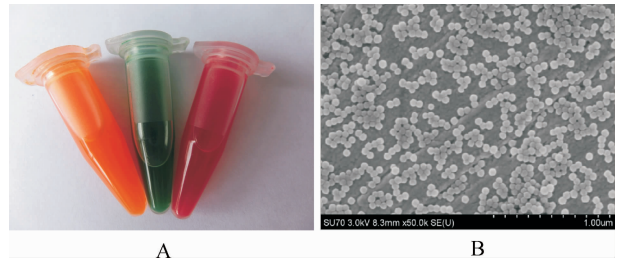
2 结 果

2.1 CSN 的制备

用油包水的反相微乳液合成法,氨水作催化剂,硅烷偶联剂 KH-550 作分散剂,3 种有机活性染料染色,正硅酸乙酯通过水解-合成,分别得到单分散的大红、橙黄和蓝绿 3 种颜色的 CSN,如图 2(A)所示。图 2(B)所示为合成的 CSN 的扫描电镜图,由图可知,这些彩色微球的形状规整、大小均一、表面光滑且具有较好的分散性。

2.2 ICSN 的凝集试验

如图 3A、B、C 所示,①在 3 色 ICSN 中分别加入鸡白痢、鸡伤寒沙门菌后都出现了明显的凝集现象,液滴变得澄清,说明 ICSN 具有很好的免疫特性;②同时说明 3 种不同颜色的 ICSN 都具有同样好的凝集效果,且不同颜色的有机活性染料对 ICSN



A. CSN 实物图; B. CSN 扫描电镜图

A. The physical image of CSN; B. The SEM image of CSN

图 2 用有机活性染料制得的 3 种颜色的 CSN

Fig. 2 Three kinds of CSN synthesized with organic reactive dyes

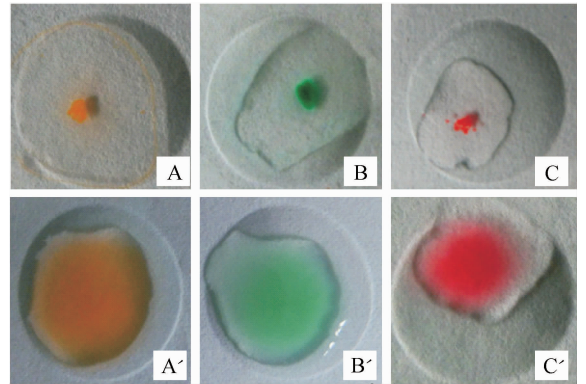


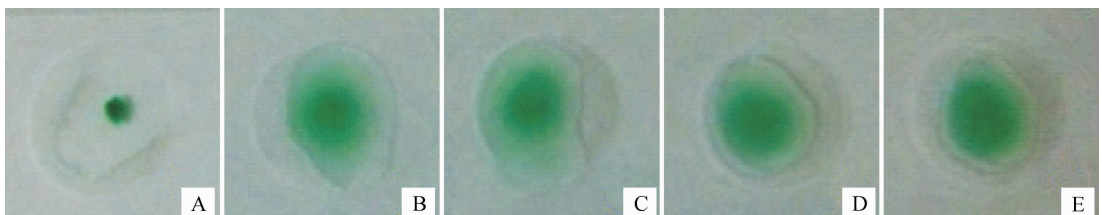
图 3 3 种颜色的 ICSN 与鸡白痢鸡伤寒沙门菌凝集反应

Fig. 3 The agglutination test between three kinds of ICSN and *S. pullorum* & *S. gallinarum* respectively

与抗原的凝集反应过程均无可见影响,染料只是起显色醒目效果;③如图 3A'、B'、C' 所示在 ICSN 中加入生理盐水,可观察到微球均匀分散在液滴中,无任何凝集块出现,修饰上抗体的 ICSN 既不和生理盐水发生反应,且本身也无自凝现象。

2.3 ICSN 的特异性

由图 4 可见,标记有抗鸡白痢抗体的 ICSN 只能和鸡白痢、鸡伤寒沙门菌发生凝集反应,和大肠埃希菌、阪崎肠杆菌、福氏志贺菌、枯草芽孢杆菌均不



A. 鸡白痢、鸡伤寒沙门菌; B. 阪崎肠杆菌; C. 大肠埃希菌; D. 福氏志贺菌; E. 枯草芽孢杆菌
A. *S. pullorum* & *S. gallinarum*; B. *E. Sakazakii*; C. *E. coli*; D. *S. flexneri*; E. *B. Subtilis*

图 4 ICSN 与不同致病菌的凝集试验

Fig. 4 The agglutination test between ICSN and different pathogenic bacteria

发生凝集,说明 ICSN 具有好的特异性。

2.4 稳定性试验

3 种颜色的 ICSN 分别 4 °C 放置 28 d 后,凝集效果与放置前没有显著差异,说明 ICSN 的稳定性好。

2.5 ICSN 敏感性测定

ICSN 原液与不同浓度菌液的凝集结果如图 5 所示,当菌液浓度分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,出现粗大凝集块,液体澄清,凝集现象清晰、醒目,凝集结果判定为++++;当菌液浓度为 10^6 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时判定为+++;当菌液浓度为 10^5 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时判定为++;当菌液浓度为 $10^2 \sim 10^4$

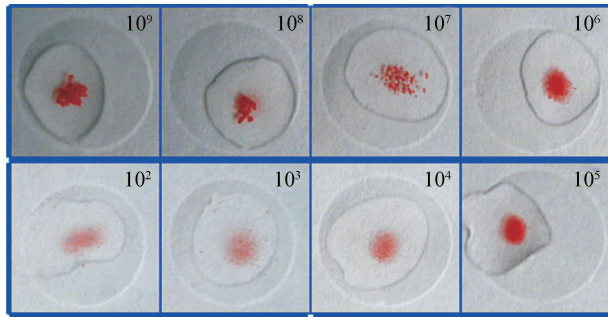


图 5 ICSN 与不同浓度抗原的凝集试验

Fig. 5 The agglutination test between ICSN and antigen with different concentration

$\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时判定为+。由此可见,ICSN 具有较好的灵敏度,对鸡白痢、鸡伤寒沙门菌的检测范围为 $10^2 \sim 10^9$ $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 最适凝集浓度比例选择试验

不同浓度 ICSN 与不同浓度菌液在室温条件下的方阵凝集试验结果如表 1 所示,菌液浓度在 $10^7 \sim 10^9$ $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间与 ICSN 原液(含抗体的量不足常规凝集抗体的 1/500)反应时凝集效果最好,为++++,与 5 倍稀释的 ICSN 凝集效果也比较好的,说明菌液浓度在 $10^7 \sim 10^9$ $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间与 ICSN 建立的新型凝集方法消耗抗体的量不足常规凝集反应的 1/500,大大节约了抗体的用量,敏感性显著增强,且更加经济。

2.7 ICSN 的准确性验证试验

用新型凝集试验与国标法对 30 份实际样品共计进行 60 次对照检测,2 种方法的检测结果仅有 1 份样品的 2 次检测均为阳性,其余 29 份样品的 58 次检测均为阴性;对其中的 15 份阴性样品进行国标法的 2 种方法的对照检测,检测结果如表 2 所示,2 种方法的一致性为 100%,说明用 ICSN 构建的新型凝集试验法准确性好,可用于对实际样品中 *S. pullorum* 和 *S. gallinarum* 的快速筛检。

表 1 抗原抗体最适浓度选择

Table 1 Select the optimum concentrations of antigen and-antibody

ICSN 的稀释倍数* Dilution of ICSN [*]	抗原浓度/($\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration of antigen									阴性对照 Negative control
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	
1	++++	++++	++++	+++	++	+	+	+	-	-
5	++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
10	+	++	++	+	+	-	-	-	-	-
20	-	+	+	++	++	+	-	-	-	-
40	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* ICSN 原液浓度,相当于稀释了 500 倍的凝集抗体含量

表 2 新型凝集试验法与国标法对样品检测结果的比较($n=30$)

Table 2 Comparison of detection result of samples between new agglutination test and methods of national standard ($n=30$)

样品 Sample	国标法 National standard method	新型凝集试验法 New agglutination test	符合率/% Rate of conformity
阳性 Positive	15	15	100
阴性 Negative	15	15	100
合计 Sum	30	30	100

由表 2 可以看出,利用制备的 ICSN 通过新型凝集试验对实际样品进行检测,其结果与国标法一致。

3 讨 论

本文用二氧化硅活性微球与有机活性染料通过共价结合制成了不溶胀、色彩鲜艳且稳定、生物相容性好的新型 CSN,并修饰上鸡白痢抗体制成 ICSN,用其研发出一种快速检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌的新型凝集技术。该技术反应结果醒目,易于肉眼直接观察,且所用抗体量仅为常规凝集试验的 1/500 以下,显著提高了灵敏度;特异性强,稳定性好,准确、经济和简便。该技术不仅可用于快速检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌,也可成为快速检测其它致病微生物等抗原物质新型凝集反应研究的基础模型,既有科学创新性,又在兽医学、医学、食品安全、环境等领域有良好的应用前景。

4 结 论

用二氧化硅活性微球与有机活性染料通过共价结合制成彩色二氧化硅微球,并修饰上鸡白痢抗体制成免疫彩色二氧化硅微球,用其研发出一种快速检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌的新型凝集技术。免疫彩色二氧化硅微球构建的新型凝集技术具有灵敏、经济、稳定、简便、快速、准确等优点,适用于快速检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌。

参考文献:

- [1] DUNKLEY K D, CALLAWAY T R, CHALOVA V I, et al. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract[J]. *Anaerobe*, 2009, 15(1-2): 26-35.
- [2] 刘佩红, 王 建, 卢 军, 等. 动物源性食品中沙门氏菌快速检测技术的应用研究[J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(2): 33-34.
- [3] 查 华, 石火英, 吉贞颖, 等. 华东地区禽源沙门菌的分布及血清型分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(2): 329-332.
- [4] LI J, SMITH N H, NELSON K, et al. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae[J]. *J Med Microbiol*, 1993, 38(2): 129-139.
- [5] BETANCOR L, PEREIRA M, MARTINEZ A, et

- al. Prevalence of *Salmonella enterica* in poultry and eggs in uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* serovar enteritidis[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(7): 2413-2423.
- [6] LI Q C, XU Y H, JIAO X N. Identification of *Salmonella pullorum* genomic sequences using suppression subtractive hybridization[J]. *Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(9): 898-903.
- [7] BARROW P A, FREITAS NETO O C. Pullorum disease and fowl typhoid- new thoughts on old disease: a review[J]. *Avian Pathol*, 2011, 40(1): 1-13.
- [8] POLPANICH D, TANGBORIBOONRAT P, ELA-ISSARI A, et al. Detection of malaria infection via latex agglutination assay[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(12): 4690-4695.
- [9] SILVEIRA-GOMES F, SARMENTO D N, PINTO T M, et al. Development and evaluation of a latex agglutination test for the serodiagnosis of paracoccidiodomycosis[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(4): 604-608.
- [10] ZHANG Y H, CHEN H, ZOU Q C. Anionic surfactant for silica-coated polystyrene composite microspheres prepared with miniemulsion polymerization[J]. *Colloid Polym Sci*, 2009, 287(10): 1221-1227.
- [11] COSTA C A R, LEITE C A P, GALEMBECK F. Size dependence of Stöber silica nanoparticle microchemistry[J]. *Phys Chem B*, 2003, 107(20): 4747-4755.
- [12] PATWARDHAN S V, EMAMI F S, BERRY R J, et al. Chemistry of aqueous silica nanoparticle surfaces and the mechanism of selective peptide adsorption[J]. *Am Chem Soc*, 2012, 134(14): 6244-6256.
- [13] SUN X X, ZHAO Y N, LIN V S Y, et al. Luciferase and luciferin co-immobilized mesoporous silica nanoparticle materials for intracellular biocatalysis[J]. *Am Chem Soc*, 2011, 133(46): 18554-18557.
- [14] 闵丽根, 袁 若, 柴雅琴, 等. 基于纳米金与碳纳米管-纳米铂-壳聚糖纳米复合物固定癌胚抗原免疫传感器的研究[J]. *化学学报*, 2008, 66(14): 1676-1680.
- [15] HE X X, WANG K M, TAN W H, et al. Photo-stable luminescent nanoparticles as biological lable for cell recognition of system lupus erythematosus[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2002, 2(3): 317-320.