

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102226807 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 26

(21) 申请号 201110075841. 5

*G01N 27/48* (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 28

*B82Y 40/00* (2011. 01)

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学第三附属医院

地址 400038 重庆市渝中区大坪长江支路  
10 号

(72) 发明人 仲召阳 李梦侠 王东 卿毅  
戴楠 关伟

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 逯长明

(51) Int. Cl.

*G01N 33/531* (2006. 01)

*G01N 33/68* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法。该检测方法采用双抗体夹心法,使固载在电极表面的神经元特异性烯醇化酶抗体与样品溶液中的神经元特异性烯醇化酶发生免疫反应,再和 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物结合。基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学活性,测得的循环伏安还原峰峰电流值与神经元特异性烯醇化酶浓度呈正相关,进而检测待测样品中神经元特异性烯醇化酶的浓度。本发明提供的电化学免疫检测方法线性相应范围为 0.25 ~ 500ng/ml,检测下限为 0.08ng/ml,特异性好,灵敏度高,对小细胞肺癌 (SCLC) 的诊断具有重要意义。

1. 一种 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的制备方法,其特征在于,将正硅酸乙酯加入乙醇和双蒸水的混合溶液中,超声处理后,制得含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;将 FeSO<sub>4</sub> 和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 加入到所述含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中,制得 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒;向所述 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒中加入 N-(β-氨基)-氨基丙基三乙氧基硅烷溶液使所述 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒表面氨基化,再加入金纳米颗粒溶液,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法制得的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

3. 一种电化学免疫检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤 1:制备如权利要求 2 所述的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与待检蛋白抗体共耦合物;

步骤 2:将玻碳电极预处理,置待检蛋白抗体溶液中充分结合,封闭以除去非特异性结合位点,制得免疫电极;将所述免疫电极与含有不同浓度待检蛋白的标准品充分结合,除去非特异性结合位点,置于所述 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与待检蛋白抗体共耦合物中充分结合,制得工作电极;在缓冲液中采用线性扫描伏安法进行电化学检测,以工作电极和免疫电极的响应电流值之差和标准品中待检蛋白的浓度绘制标准曲线;

步骤 3:如步骤 2,将所述免疫电极与待检样品混合温育,进行电化学检测,测得待测样品的电化学峰峰电流强度,从所述标准曲线上读取对应的待检蛋白的浓度。

4. 如权利要求 3 所述的电化学免疫检测方法,其特征在于,所述玻碳电极预处理包括将所述玻碳电极抛光成镜面,超声处理后置于氯金酸溶液中,恒电位沉积。

5. 如权利要求 3 所述的电化学免疫检测方法,其特征在于,所述缓冲液为 pH 值为 6~7 的 PBS 缓冲溶液。

6. 如权利要求 3 所述的电化学免疫检测方法,其特征在于,所述线性扫描伏安法扫描范围为 -0.2~0.6V,扫速为 50mV/s。

7. 如权利要求 1 至 6 任一项所述的电化学免疫检测方法,其特征在于,所述待检蛋白为肿瘤标志蛋白。

8. 如权利要求 7 所述的电化学免疫检测方法,其特征在于,所述肿瘤标志蛋白包括胃泌素前体释放肽、神经元特异性烯醇化酶、CYFRA21-1、AFP、APT、CEA、CA242、CA125、CA199、CA153、CA724、CA50、f-PSA、t-PSA、Free β-hCG、SCCA、β 2-MG。

9. 如权利要求 8 所述的电化学免疫检测方法,其特征在于,所述待检蛋白为神经元特异性烯醇化酶。

## 基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及电化学免疫领域,特别涉及一种基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法。

### 背景技术

[0002] 肺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率居全球首位,并呈逐年增多的趋势。小细胞肺癌 (small-cell lung cancer, SCLC) 是恶性程度最高的肺癌,占有肺癌病例的 15 ~ 20%。肿瘤细胞具有分化程度低、倍增时间短、分裂指数高、早期易出现远处转移等特异的生物学行为,对放疗和化疗高度敏感,多数患者病情发展快,短期内死亡,因此,对小细胞肺癌进行早期诊断、制定合理治疗方案及评估疗效尤为重要。目前用于肺癌辅助诊断的主要方法有胸片、CT、以及痰细胞学检查等,而血清肿瘤标志物的检测由于取样简单、易于接受等特点,在肿瘤筛查、诊断、评价治疗疗效等方面具有较大的实用价值。

[0003] 神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) 是参与糖酵解途径的烯醇化酶中的一种,是神经内分泌细胞特有的一种酸性蛋白酶,存在于神经组织和神经内分泌组织中,在脑组织细胞的活性最高,外周神经和神经分泌组织的活性水平居中,最低值见于非神经组织、血清和脊髓液。它被发现在与神经内分泌组织起源有关的肿瘤中,特别是小细胞肺癌 (SCLC) 中有过量的神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 表达,导致血清中 NSE 明显升高,是小细胞肺癌、神经母细胞瘤和恶性黑色素瘤的标志物,再加上血清神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 水平与小细胞肺癌 (SCLC) 的临床分期呈正相关,因此,血清神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 检测对小细胞肺癌 (SCLC) 的监测病情、疗效评价及预测复发具有重要的临床价值。目前,国内外采用酶联免疫方法测定神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 已处于临床应用阶段,但是酶联免疫法灵敏度不高,不易检测出痕量神经元特异性烯醇化酶 (NSE),影响对小细胞肺癌 (SCLC) 检测的准确性。

[0004] 电化学免疫分析法 (Electrochemical Immunoassay, ECIA) 是将免疫技术与电化学检测结合的一种免疫分析新方法,基于抗原和抗体的特异性反应,将一些既易测定又具有高度敏感性的物质标记到特异性抗原或抗体分子上,通过这些标记物的增强放大效应来显示反应系统中抗原或抗体的性质与含量。电化学免疫分析的标记物主要有两类:生物酶及电化学活性物质。用作标记物的电化学活性物质为具有电化学氧化还原性质的金属离子和电活性的有机功能基团。

[0005] 纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围 (1 ~ 100nm) 或由它们作为基本单元构成的材料,这大约相当于 10 ~ 100 个原子紧密排列在一起的尺度。由于纳米材料具有的高比表面积、高活性、特殊物理性质及小尺寸,使得纳米材料从一个惰性体转变为一个活泼的能提供电子和获取电子的物体,将其引入传感器的构建中可明显增强传感器的响应速度、灵敏度、选择性等。因此,提供一种灵敏度高、特异性好的基于复合纳米材料的电化学免疫检测方法用来检测神经元特异性烯醇化酶 (NSE),对小细胞肺癌 (SCLC) 的早期诊断、病情监测、判断预后及其制定合理的治疗方案和评估疗效具有重要意义。

## 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供一种基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法。该方法采用双抗体夹心法,使固载在电极表面的神经元特异性烯醇化酶抗体与样品溶液中的神经元特异性烯醇化酶发生免疫反应,再和 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物结合。基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学活性,测得的循环伏安还原峰电流值与神经元特异性烯醇化酶浓度呈正相关,进而检测检测样品中神经元特异性烯醇化酶的浓度。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0008] 本发明提供了一种 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的制备方法,将正硅酸乙酯加入乙醇和双蒸水的混合溶液中,超声处理后,滴加氨水溶液反应,离心收集沉淀,洗涤至 pH 值呈中性,制得含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;将 FeSO<sub>4</sub> 和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 加入到所述含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中,离心收集沉淀,制得 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒;向所述 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒中加入 N-(β-氨乙基)-氨丙基三乙氧基硅烷溶液使所述 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒表面氨基化,再加入金纳米颗粒溶液,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

[0009] 作为优选,一种 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的制备方法,包含如下步骤:

[0010] 步骤 1:将 2mL 正硅酸乙酯 (TEOS) 加入 10mL 乙醇和 23mL 双蒸水的混合溶液中,超声处理,混匀,滴加 5mL 25% 的氨水溶液,在 30℃ 下持续搅拌 2h,6000rpm 离心 15min,弃上层清液,收集沉淀用乙醇和去离子水分别洗涤至 pH 值呈中性,制得含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;

[0011] 步骤 2:将摩尔比为 1 : 5 的 FeSO<sub>4</sub> 和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 加入到所述含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中,室温下持续搅拌 12h,6000rpm 离心 20min,弃上层清液,收集沉淀用乙醇和去离子水分别洗涤,制得含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;

[0012] 步骤 3:向所述含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中加入 N-(β-氨乙基)-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 溶液,持续搅拌 20 ~ 30min 使 PB-SiO<sub>2</sub> 表面氨基功能化,加入含有金纳米颗粒的溶液(采用柠檬酸钠还原氯金酸法制得),使金纳米颗粒组装到 PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒表面,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

[0013] 纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围(1 ~ 100nm)或由它们作为基本单元构成的材料,这大约相当于 10 ~ 100 个原子紧密排列在一起的尺度。纳米材料所具有的高比表面积、高活性、特殊物理性质及小尺寸等特性使之成为非常有前景的传感器制备材料。由于纳米材料具有的大比表面、高表面,这使得纳米材料从一个惰性体转变为一个活泼的能提供电子和获取电子的物体,将其引入传感器的构建中,可明显增强传感器的响应速度、灵敏度、选择性等。

[0014] 正硅酸乙酯,是一种无色液体,分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Si,分子量为 208.33,在碱性环境下易水解生成 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒。

[0015] 普鲁士蓝 (PB) 化学修饰电极最早出现于 1978 年,具有良好的氧化还原活性和易于制备等优点。研究发现,将 PB 纳米颗粒和其他有机或者无机材料复合,制成的 PB 复合纳米颗粒可有效增强 PB 纳米颗粒的稳定性。其中,采用化学掺杂技术,合成 PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒,具有生物相容性好,稳定性好,利于进一步化学修饰等特点,在生物免疫传感分析

方面具有重要价值。因此,本发明制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒,形成灵敏度高的电活性物质。

[0016] 作为优选,本发明通过 FeSO<sub>4</sub> 和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 合成普鲁士蓝 (PB)。

[0017] 本发明将所述 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒和普鲁士蓝 (PB) 结合,同时结合具有比表面积大、吸附力强、生物亲和性好等优点的金纳米粒子,所述的金纳米颗粒溶液采用柠檬酸钠还原氯金酸发制得。

[0018] N-(β-氨基)-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES),分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si,分子量为 264.44,为偶联剂,可以在材料表面引入氨基。本发明向所述含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中加入 N-(β-氨基)-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 溶液,持续搅拌 20 ~ 30min 使 PB-SiO<sub>2</sub> 表面氨基功能化,以便含有金纳米颗粒的溶液组装到 PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒表面,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

[0019] 本发明还提供了上述制备方法制得的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

[0020] 本发明提供了一种电化学免疫检测方法,包括如下步骤:

[0021] 步骤 1:所述 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与待检蛋白抗体共耦合物的制备:将所述 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒加入到待检蛋白抗体溶液中,混匀后反应 8 ~ 12h,加入封闭液温育,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与待检蛋白抗体共耦合物;

[0022] 步骤 2:将玻碳电极抛光成镜面,超声处理,置于氯金酸溶液中,恒电位沉积,用二次水冲洗,置待检蛋白抗体溶液中浸泡吸附,封闭液温育,制得免疫电极;将所述免疫电极与含有不同浓度待检蛋白的标准品混合温育,用 PBS 冲洗,置于所述 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与待检蛋白抗体共耦合物中温育,制得工作电极;以所述工作电极,铂丝电极作为对电极,饱和甘汞电极作为参比电极的三电极体系,在缓冲液中采用线性扫描伏安法进行电化学检测,以工作电极和免疫电极的响应电流值之差和标准品中待检蛋白的浓度绘制标准曲线;

[0023] 步骤 3:如步骤 2,将所述免疫电极与待检样品混合温育,进行电化学检测,测得待测样品的电化学峰峰电流强度,从标准曲线上读取对应的待检蛋白的浓度。

[0024] 为了除去非特异性结合位点,本发明采用封闭液牛血清白蛋白。

[0025] 为了保证充分结合,本发明选用温育的温度为 20 ~ 40℃。

[0026] 为了保证充分结合,本发明选用温育的时间为 40 ~ 120min。

[0027] 作为优选,所述缓冲液为 0.1mol/L PBS(pH = 6 ~ 7) 缓冲溶液。

[0028] 作为优选,所述线性扫描伏安法扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V,扫速为 50mV/s。

[0029] 作为优选,本发明所述待检蛋白为肿瘤标志蛋白。

[0030] 肿瘤标志物 (Tumor Marker):由肿瘤组织自身产生,可反映肿瘤存在和生长的一类生化物质,它们或不存在于正常成人组织而仅见于胚胎组织,或在肿瘤组织中的含量大大超过在正常组织里的含量,它们的存在或量变可以提示肿瘤的性质,借以了解肿瘤的组织发生、细胞分化、细胞功能,以帮助肿瘤的诊断、分类、预后判断以及治疗指导。主要有胚胎抗原、糖类抗原、天然自身抗原、细胞角蛋白、肿瘤相关的酶、激素以及某些癌基因等。肿瘤标志蛋白是由肿瘤组织自身产生,可反映肿瘤存在和生长的蛋白类物质。

[0031] 电化学免疫分析法 (Electrochemical Immunoassay, ECIA) 是将免疫技术与电化学检测结合的一种免疫分析新方法,基于抗原和抗体的特异性反应,将一些既易测定又具

有高度敏感性的物质标记到特异性抗原或抗体分子上,通过这些标记物的增强放大效应来显示反应系统中抗原或抗体的性质与含量,兼有发光分析的高灵敏度和抗原抗体反应的高度特异性。因此,本发明提供的电化学检测方法可以通过抗原抗体的特异性反应,用来检测肿瘤标志蛋白。

[0032] 优选地,所述肿瘤标志蛋白包括胃泌素前体释放肽、神经元特异性烯醇化酶、CYFRA21-1、AFP、APT、CEA、CA242、CA125、CA199、CA153、CA724、CA50、f-PSA、t-PSA、Free  $\beta$ -hCG、SCCA、 $\beta$  2-MG。

[0033] 肿瘤标志蛋白按照肿瘤组织产生不同,包括分化抗原;胚胎抗原(AFP, CEA);同工酶(NSE);激素(HCG);组织特异性抗原(PSA, free PSA);粘蛋白、糖蛋白、糖脂(CA125);电化学发光仪上常可检验一下标志物:AFP、CEA、CA199、CA724、CA125、CA153、NSE、Cyfra21-1、PSA、free PSA。

[0034] AFP、APT:主要相关肿瘤:肝细胞癌和生殖细胞癌;其它相关肿瘤:胚胎细胞癌、卵巢畸胎瘤、胃癌、胆道癌、胰腺癌等。

[0035] CEA:主要相关肿瘤:广谱的肿瘤标志物;其它相关肿瘤:常见于肺癌、大肠癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、甲状腺髓样癌等。

[0036] CA242:主要相关肿瘤:胰腺癌、胃、结肠癌;其它相关肿瘤:肝癌、食管癌、肺癌。

[0037] CA125:主要相关肿瘤:卵巢癌;其它相关肿瘤:肺癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、胃肠道恶性肿瘤、子宫癌。

[0038] CA199:主要相关肿瘤:胰腺癌、胆管癌、结直肠癌;其它相关肿瘤:肝癌、胆囊癌、胆管癌等。

[0039] CA153:主要相关肿瘤:乳腺癌的首选标志物;其它相关肿瘤:肺癌、卵巢癌、肺腺癌、结直肠癌等均可增高。

[0040] CA724:主要相关肿瘤:胃癌的最佳肿瘤标志物之一;其它相关肿瘤:对其他胃肠道癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌等也有不同检出率。

[0041] CA50:主要相关肿瘤:胰腺和结、直肠癌的标志物;其它相关肿瘤:胃癌、胆囊癌、肝癌、肺癌、乳腺癌。

[0042] NSE、胃泌素前体释放肽:主要相关肿瘤:小细胞肺癌;其它相关肿瘤:肺腺癌、大细胞肺癌。

[0043] CYFRA21-1:主要相关肿瘤:肺鳞癌、宫颈癌、食管癌;其它相关肿瘤:膀胱癌、鼻咽癌、卵巢癌、胃肠道癌。

[0044] f-PSA:主要相关肿瘤:前列腺癌;其它相关肿瘤:某些妇科肿瘤和乳腺癌。

[0045] t-PSA:主要相关肿瘤:前列腺癌;其它相关肿瘤:某些妇科肿瘤、多囊卵巢综合征、乳腺癌。

[0046] Free  $\beta$ -hCG:主要相关肿瘤:妇科肿瘤和非精原性睾丸癌;其它相关肿瘤:乳腺癌、精原性睾丸癌、肺癌、肝癌等。

[0047] SCCA:主要相关肿瘤:宫颈鳞癌;其它相关肿瘤:肺鳞癌、头颈部鳞癌、食管癌以及外阴部鳞状细胞癌等。

[0048]  $\beta$  2-MG:主要相关肿瘤:恶性肿瘤辅助性标志物,慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤肉瘤、多发性骨髓瘤等尤为明显。其它相关肿瘤:肺癌、乳腺癌、胃肠道癌及子宫颈癌中也可

见升高。

[0049] 优选地,所述待检蛋白为神经元特异性烯醇化酶。

[0050] 作为优选,本发明提供了一种电化学免疫检测方法,包括如下步骤:

[0051] 步骤 1:所述 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物的制备:取 80 ~ 120 μL 的神经元特异性烯醇化酶抗体,缓慢加入到 80 ~ 120 μL mol/L 的含有所述 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的溶液中,充分混匀后在 4℃ 下持续搅拌 8 ~ 12h,加入 50 μL 0.25% 的牛血清白蛋白溶液以封闭多层结构的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒上的非特异性结合位点,并在 25℃ 下温育反应 1 ~ 2h,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物,所得产物保存于 4℃;

[0052] 步骤 2:将玻碳电极 (Φ = 4mm) 抛光成镜面,超声清洗干净,晾干,置于 1% 的氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>) 溶液中,在 -0.2V 下恒电位沉积 30 ~ 50s,用二次水冲洗干净,晾干,清洗后将电沉积了纳米金的修饰电极置于神经元特异性烯醇化酶抗体溶液中,于 4℃ 浸泡吸附 8h,取出水洗,置于 0.25% BSA 溶液中,37℃ 温育 1h,取出水洗,制得免疫电极;将所述免疫电极分别与 80 ~ 120 μL 神经元特异性烯醇化酶标准溶液,于 37℃ 反应 30min,用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品,置于 80 ~ 120 μL Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与检测抗体共耦合物溶液中,在 37℃ 下反应 30min,用 PBS 溶液洗涤,以除去非特异性吸附的共耦合物制得工作电极。采用三电极体系,所述工作电极,铂丝电极作为对电极,饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极,在 0.1mol/L PBS (pH = 6 ~ 7) 缓冲溶液中,进行电位扫描速度为 50mV/s,扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V 的循环伏安电化学检测,以工作电极和免疫电极的响应电流值之差和标准品中待检蛋白的浓度绘制标准曲线;

[0053] 步骤 3:如步骤 2,将所述免疫电极与待检样品混合温育,进行电化学检测,测得待测样品的电化学峰峰电流强度,从标准曲线上读取对应的待检蛋白的浓度。

[0054] 本发明公开了一种基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法。该检测方法采用双抗体夹心法,使固载在电极表面的神经元特异性烯醇化酶抗体与样品溶液中的神经元特异性烯醇化酶发生免疫反应,再和 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物结合。基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学活性,测得的循环伏安还原峰峰电流值与神经元特异性烯醇化酶浓度呈正相关,进而检测检测样品中神经元特异性烯醇化酶的浓度。本发明提供的电化学免疫检测方法线性响应范围为 0.25 ~ 500ng/mL,检测下限为 0.08ng/mL,特异性好,灵敏度高,对小细胞肺癌 (SCLC) 的诊断具有重要意义。

#### 附图说明

[0055] 图 1 示实施例 4 中基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法制得的神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准曲线,横坐标为神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准品的浓度,单位为 ng/mL;纵坐标为检测得到峰电流均值,单位为 μA。

[0056] 图 2 示实施例 5 中基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法制得的神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准曲线,横坐标为神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准品的浓度,单位为 ng/mL;纵坐标为检测得到峰电流均值,单位为 μA。

[0057] 图 3 示实施例 6 中基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法制得的神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准曲线,横坐标为神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准品的

浓度,单位为 ng/mL ;纵坐标为检测得到峰电流均值,单位为  $\mu\text{A}$ 。

### 具体实施方式

[0058] 本发明公开了一种基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0059] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0060] 本发明中, N-( $\beta$ -氨基乙基)-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES)、FeSO<sub>4</sub>、K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>、正硅酸乙酯 (TEOS)、氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>)、神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、神经元特异性烯醇化酶抗体 (anti-NSE) 均购自美国 Sigma 公司;人体血清样品均来自第三军医大学第三附属医院肿瘤中心,检测组(患者血清)216 名,其中男 108 名,女 108 名;对照组(正常人血清)100 名,其中男 50 名,女 50 名。

[0061] 实施例 1 制备 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒

[0062] 将 2mL 正硅酸乙酯 (TEOS) 加入 10mL 乙醇和 23mL 双蒸水的混合溶液中,超声处理,混匀,滴加 5mL 25% 的氨水溶液,在 30℃ 下持续搅拌 2h,6000rpm 离心 15min,弃上层清液,收集沉淀用乙醇和去离子水分别洗涤至 pH 值呈中性,制得含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;将摩尔比为 1 : 5 的 FeSO<sub>4</sub> 和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 加入到所述含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中,室温下持续搅拌 12h,6000rpm 离心 20min,弃上层清液,收集沉淀用乙醇和去离子水分别洗涤,制得含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;向所述含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中加入 N-( $\beta$ -氨基乙基)-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 溶液,持续搅拌 20min 使 PB-SiO<sub>2</sub> 表面氨基功能化,加入含有金纳米颗粒的溶液(采用柠檬酸钠还原氯金酸法制得),使金纳米颗粒组装到 PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒表面,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

[0063] 实施例 2 制备 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒

[0064] 将 2mL 正硅酸乙酯 (TEOS) 加入 10mL 乙醇和 23mL 双蒸水的混合溶液中,超声处理,混匀,滴加 5mL 25% 的氨水溶液,在 30℃ 下持续搅拌 2h,6000rpm 离心 15min,弃上层清液,收集沉淀用乙醇和去离子水分别洗涤至 pH 值呈中性,制得含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;将摩尔比为 1 : 5 的 FeSO<sub>4</sub> 和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 加入到所述含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中,室温下持续搅拌 12h,6000rpm 离心 20min,弃上层清液,收集沉淀用乙醇和去离子水分别洗涤,制得含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;向所述含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中加入 N-( $\beta$ -氨基乙基)-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 溶液,持续搅拌 30min 使 PB-SiO<sub>2</sub> 表面氨基功能化,加入含有金纳米颗粒的溶液(采用柠檬酸钠还原氯金酸法制得),使金纳米颗粒组装到 PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒表面,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

[0065] 实施例 3 制备 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒

[0066] 将 2mL 正硅酸乙酯 (TEOS) 加入 10mL 乙醇和 23mL 双蒸水的混合溶液中,超声处理,混匀,滴加 5mL 25% 的氨水溶液,在 30℃ 下持续搅拌 2h,6000rpm 离心 15min,弃上层清液,收集沉淀用乙醇和去离子水分别洗涤至 pH 值呈中性,制得含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液;将摩尔比为 1 : 5 的 FeSO<sub>4</sub> 和 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 加入到所述含有 SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中,室温下持续搅

拌 12h, 6000rpm 离心 20min, 弃上层清液, 收集沉淀用乙醇和去离子水分别洗涤, 制得含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液; 向所述含有 PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒的溶液中加入 N-(β-氨基乙基)-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 溶液, 持续搅拌 25min 使 PB-SiO<sub>2</sub> 表面氨基功能化, 加入含有金纳米颗粒的溶液 (采用柠檬酸钠还原氯金酸法制得), 使金纳米颗粒组装到 PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒表面, 制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒。

[0067] 实施例 4 基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法检测神经元特异性烯醇化酶 (NSE)

[0068] Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物的制备: 取 80 μL 的神经元特异性烯醇化酶抗体, 缓慢加入到 100 μL mol/L 的含有实施例 1 制备的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的溶液中, 充分混匀后在 4℃ 下持续搅拌 8h, 加入 50 μL 0.25% 的牛血清白蛋白溶液以封闭多层结构的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒上的非特异性结合位点, 并在 25℃ 下温育反应 1h, 制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物, 所得产物保存于 4℃;

[0069] 免疫电极的制备: 将玻碳电极 (Φ = 4mm) 抛光成镜面, 超声清洗干净, 晾干, 置于 1% 的氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>) 溶液中, 在 -0.2V 下恒电位沉积 30s, 用二次水冲洗干净, 晾干, 清洗后将电沉积了纳米金的修饰电极置于神经元特异性烯醇化酶抗体溶液中, 于 4℃ 浸泡吸附 8h, 取出水洗, 置于 0.25% BSA 溶液中, 37℃ 温育 1h, 取出水洗, 制得免疫电极;

[0070] 工作电极的制备: 将免疫电极分别与 80 μL 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 10, 50, 100, 500ng/mL 的神经元特异性烯醇化酶标准溶液, 于 37℃ 反应 30min, 用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品, 置于 80 μL Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与检测抗体共耦合物溶液中, 在 37℃ 下反应 30min, 用 PBS 溶液洗涤, 以除去非特异性吸附的共耦合物。

[0071] 电化学检测: 采用三电极体系, 所述工作电极, 铂丝电极作为对电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极, 在 0.1mol/L PBS (pH = 6.86) 缓冲溶液中, 进行电位扫描速度为 50mV/s, 扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V 的循环伏安电化学检测。进行三次循环伏安扫描, 记录下三次扫描得到的还原峰电流值。测得的循环伏安还原峰峰电流值随神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的浓度增加而增强, 电流变化与神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 成正比。以神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准溶液的浓度为横坐标, 将三次循环伏安扫描得到的以工作电极和免疫电极的还原峰电流值之差求平均值作纵坐标, 制作标准曲线, 如图 1, 标准曲线方程为  $I = 5.262 \text{Log}C_{\text{NSE}} + 2.138$ 。

[0072] 基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法检测人血清样品中神经元特异性烯醇化酶 (NSE):

[0073] 人体血清样品均来自第三军医大学第三附属医院肿瘤中心, 检测组 (患者血清) 216 名, 其中男 108 名, 女 108 名; 对照组 (正常人血清) 100 名, 其中男 50 名, 女 50 名。

[0074] 将免疫电极分别与 80 μL 血清样品溶液, 于 37℃ 反应 30min, 反应完成后用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品, 再置于 80 μL Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与检测抗体共耦合物溶液中, 在 37℃ 下反应 30min。用 PBS 溶液洗 3 次, 以除去非特异性吸附的共耦合物, 制得所述工作电极。电化学检测采用三电极体系, 工作电极, 铂丝电极作为对电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极。在 0.1mol/L PBS (pH = 6.86) 缓冲溶液中进行, 采用电位扫描速度为 50mV/s, 扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V 的循环伏安电化学对免疫电极进行三次循环伏安扫描, 并

记录下三次扫描得到的还原峰电流值,并与标准曲线比较,得到对应的神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的浓度。

[0075] 实施例 5 基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法检测神经元特异性烯醇化酶 (NSE)

[0076] Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物的制备:取 100 μL 的神经元特异性烯醇化酶抗体,缓慢加入到 80 μL mol/L 的含有实施例 2 制备的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的溶液中,充分混匀后在 4℃ 下持续搅拌 10h,加入 50 μL 0.25% 的牛血清白蛋白溶液以封闭多层结构的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒上的非特异性结合位点,并在 25℃ 下温育反应 1.5h,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物,所得产物保存于 4℃;

[0077] 免疫电极的制备:将玻碳电极 (Φ = 4mm) 抛光成镜面,超声清洗干净,晾干,置于 1% 的氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>) 溶液中,在 -0.2V 下恒电位沉积 40s,用二次水冲洗干净,晾干,清洗后将电沉积了纳米金的修饰电极置于神经元特异性烯醇化酶抗体溶液中,于 4℃ 浸泡吸附 8h,取出水洗,置于 0.25% BSA 溶液中,37℃ 温育 1h,取出水洗,制得免疫电极;

[0078] 工作电极的制备:将免疫电极分别与 100 μL 神经元特异性烯醇化酶标准溶液,于 37℃ 反应 30min,用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品,置于 100 μL Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与检测抗体共耦合物溶液中,在 37℃ 下反应 30min,用 PBS 溶液洗涤,以除去非特异性吸附的共耦合物。

[0079] 电化学检测:采用三电极体系,所述工作电极,铂丝电极作为对电极,饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极,在 0.1mol/L PBS (pH = 6.0) 缓冲溶液中,进行电位扫描速度为 50mV/s,扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V 的循环伏安电化学检测。进行三次循环伏安扫描,记录下三次扫描得到的还原峰电流值。测得的循环伏安还原峰峰电流值随神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的浓度增加而增强,电流变化与神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 成正比。以神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准溶液的浓度为横坐标,将三次循环伏安扫描得到的以工作电极和免疫电极的还原峰电流值之差求平均值作纵坐标,制作标准曲线,如图 2,标准曲线方程为  $I = 5.902 \text{Log}C_{\text{NSE}} + 2.16$ 。

[0080] 基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法检测人血清样品中神经元特异性烯醇化酶 (NSE):

[0081] 人体血清样品均来自第三军医大学第三附属医院肿瘤中心,检测组 (患者血清) 216 名,其中男 108 名,女 108 名;对照组 (正常人血清) 100 名,其中男 50 名,女 50 名。

[0082] 将免疫电极分别与 100 μL 血清样品溶液,于 37℃ 反应 30min,反应完成后用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品,再置于 100 μL Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与检测抗体共耦合物溶液中,在 37℃ 下反应 30min。用 PBS 溶液洗 3 次,以除去非特异性吸附的共耦合物,制得所述工作电极。电化学检测采用三电极体系,工作电极,铂丝电极作为对电极,饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极。在 0.1mol/L PBS (pH = 6.86) 缓冲溶液中进行,采用电位扫描速度为 50mV/s,扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V 的循环伏安电化学对免疫电极进行三次循环伏安扫描,并记录下三次扫描得到的还原峰电流值,并与标准曲线比较,得到对应的神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的浓度。

[0083] 实施例 6 基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法检测神经元特异

性烯醇化酶 (NSE)

[0084] Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物的制备:取 120 μL 的神经元特异性烯醇化酶抗体,缓慢加入到 120 μL mol/L 的含有实施例 3 制备的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的溶液中,充分混匀后在 4℃ 下持续搅拌 12h,加入 50 μL 0.25% 的牛血清白蛋白溶液以封闭多层结构的 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 纳米颗粒上的非特异性结合位点,并在 25℃ 下温育反应 2h,制得 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共耦合物,所得产物保存于 4℃;

[0085] 免疫电极的制备:将玻碳电极 (Φ = 4mm) 抛光成镜面,超声清洗干净,晾干,置于 1% 的氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>) 溶液中,在 -0.2V 下恒电位沉积 50s,用二次水冲洗干净,晾干,清洗后将电沉积了纳米金的修饰电极置于神经元特异性烯醇化酶抗体溶液中,于 4℃ 浸泡吸附 8h,取出水洗,置于 0.25% BSA 溶液中,37℃ 温育 1h,取出水洗,制得免疫电极;

[0086] 工作电极的制备:将免疫电极分别与 120 μL 神经元特异性烯醇化酶标准溶液,于 37℃ 反应 30min,用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品,置于 120 μL Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与检测抗体共耦合物溶液中,在 37℃ 下反应 30min,用 PBS 溶液洗涤,以除去非特异性吸附的共耦合物。

[0087] 电化学检测:采用三电极体系,所述工作电极,铂丝电极作为对电极,饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极,在 0.1mol/L PBS (pH = 7.0) 缓冲溶液中,进行电位扫描速度为 50mV/s,扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V 的循环伏安电化学检测。进行三次循环伏安扫描,记录下三次扫描得到的还原峰电流值。测得的循环伏安还原峰峰电流值随神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的浓度增加而增强,电流变化与神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 成正比。以神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 标准溶液的浓度为横坐标,将三次循环伏安扫描得到的以工作电极和免疫电极的还原峰电流值之差求平均值作纵坐标,制作标准曲线,如图 3,标准曲线方程为  $I = 5.79 \log C_{NSE} + 2.06$ 。

[0088] 基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法检测人血清样品中神经元特异性烯醇化酶 (NSE):

[0089] 人体血清样品均来自第三军医大学第三附属医院肿瘤中心,检测组 (患者血清) 216 名,其中男 108 名,女 108 名;对照组 (正常人血清) 100 名,其中男 50 名,女 50 名。

[0090] 将免疫电极分别与 120 μL 血清样品溶液,于 37℃ 反应 30min,反应完成后用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品,再置于 120 μL Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒与检测抗体共耦合物溶液中,在 37℃ 下反应 30min。用 PBS 溶液洗 3 次,以除去非特异性吸附的共耦合物,制得所述工作电极。电化学检测采用三电极体系,工作电极,铂丝电极作为对电极,饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极。在 0.1mol/L PBS (pH = 6.86) 缓冲溶液中进行,采用电位扫描速度为 50mV/s,扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V 的循环伏安电化学对免疫电极进行三次循环伏安扫描,并记录下三次扫描得到的还原峰电流值,并与标准曲线比较,得到对应的神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的浓度。

[0091] 实施例 7 基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法与 ELISA 检测方法的比较

[0092] 人体血清样品均来自第三军医大学第三附属医院肿瘤中心,检测组 (患者血清) 216 名,其中男 108 名,女 108 名;对照组 (正常人血清) 100 名,其中男 50 名,女 50 名。

[0093] ELISA 检测神经元特异性烯醇化酶 (NSE) :ELISA 试剂盒购自上海锐谷生物科技有限公司

[0094] 与实施例 4 至 6 中基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法的检测结果比较,血清样品为检测组患者血清,共 216 个样本,其中男性患者 108 名,女性患者 108 名,平均分为 18 组,每组血清样本 6 个,男性女性血清样本各 3 个,结果见表 1。

[0095] 表 1 电化学免疫检测方法与 ELISA 检测方法的结果

[0096]

血清样品编号	ELISA (ng/mL)	电化学免疫 (ng/mL)
1	0.78	1.56
2	1.56	3.35
3	3.8	5.98
4	7.5	10.47
5	9.7	19.3
6	18.6	17.9
7	25.7	29.6
8	39.9	32.8
9	45.7	49.7
10	60.4	51.2
11	78.5	89.4
12	105.3	92.3
13	164.2	134.2
14	200.5	238.5
15	290.7	344.7
16	364.7	336.1
17	387.6	400.5
18	461.4	413.7

[0097]

[0098] 电化学免疫检测方法与 ELISA 检测方法对比试验结果表明,两种检测方法的相关性良好,线性方程为  $y = 0.972x + 3.700$ , 相关系数为  $R = 0.9879$ ,  $P < 0.01$ , 两种方法呈显著正相关。

[0099] 电化学免疫检测方法:线性响应范围为 0.25-500ng/mL, 检测下限:0.08ng/mL; ELISA 检测方法:检测范围:1ng/mL-30ng/mL, 最低检测限:0.48ng/mL。因此,本发明提供的基于 Au-PB-SiO<sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法与 ELISA 检测方法相比,灵敏度高,特异性和准确性好,对小细胞肺癌的诊断具有重要意义。

[0100] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

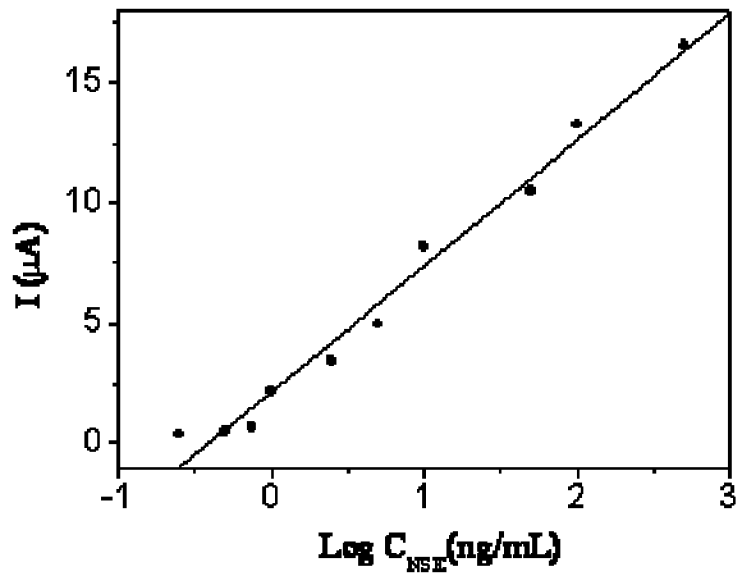


图 1

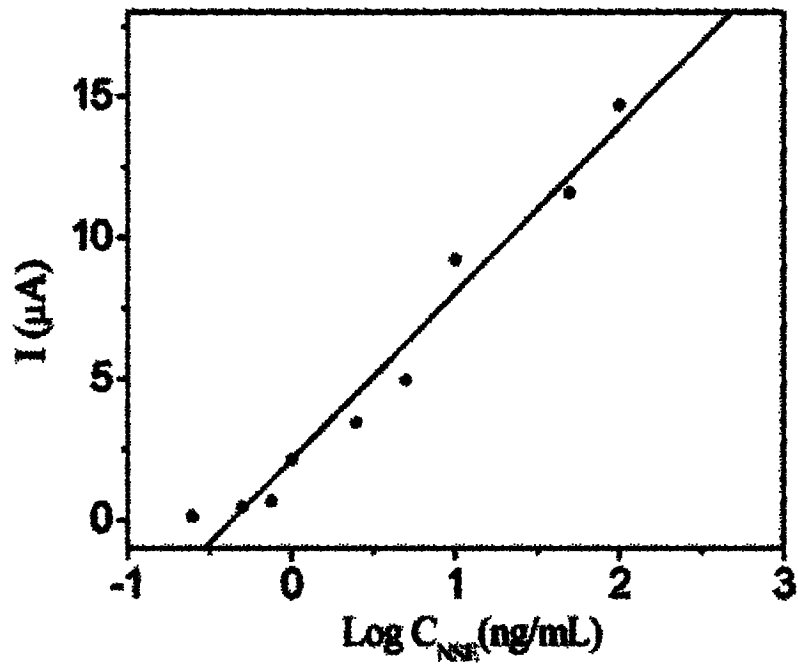


图 2

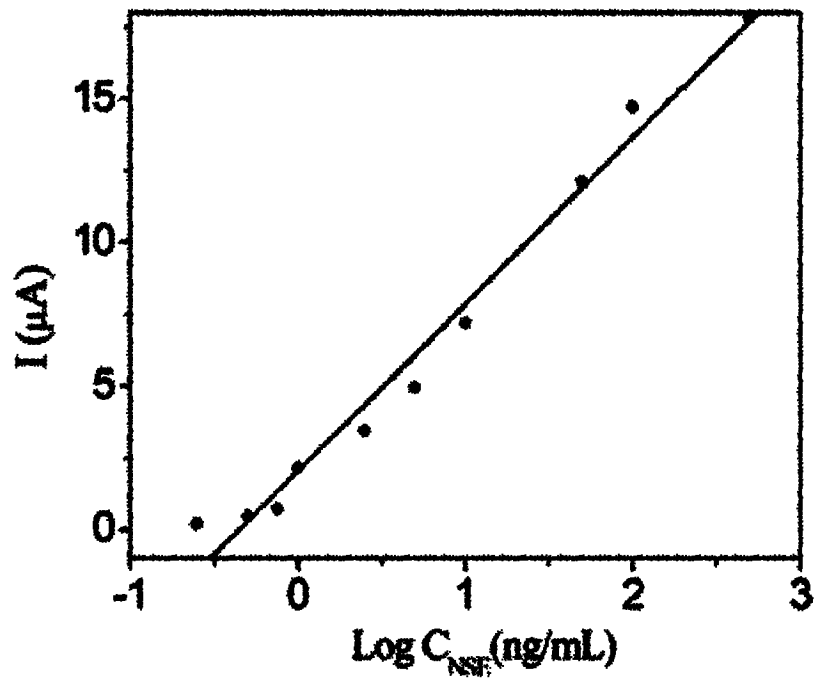


图 3

专利名称(译)	基于Au-PB-SiO <sub>2</sub> 复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102226807A</a>	公开(公告)日	2011-10-26
申请号	CN201110075841.5	申请日	2011-03-28
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第三附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第三附属医院		
[标]发明人	仲召阳 李梦侠 王东 卿毅 戴楠 关伟		
发明人	仲召阳 李梦侠 王东 卿毅 戴楠 关伟		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N27/48 B82Y40/00		
其他公开文献	CN102226807B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于Au-PB-SiO<sub>2</sub>复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法。该检测方法采用双抗体夹心法，使固载在电极表面的神经元特异性烯醇化酶抗体与样品溶液中的神经元特异性烯醇化酶发生免疫反应，再和Au-PB-SiO<sub>2</sub>复合纳米颗粒与神经元特异性烯醇化酶抗体共轭物结合。基于Au-PB-SiO<sub>2</sub>复合纳米颗粒的电化学活性，测得的循环伏安还原峰峰电流值与神经元特异性烯醇化酶浓度呈正相关，进而检测待测样品中神经元特异性烯醇化酶的浓度。本发明提供的电化学免疫检测方法线性相应范围为0.25 ~ 500ng/ml，检测下限为0.08ng/ml，特异性好，灵敏度高，对小细胞肺癌(SCLC)的诊断具有重要意义。

