

ATP 适体接枝 Fe₃O₄ 纳米粒子的制备及化学发光酶检测应用

严喜鸾¹ 陈 馨¹ 高文菊¹ 魏婷婷¹ 林月敏¹ 艾凡荣^{*2,3}

(¹ 南昌大学资源环境与化工学院, 南昌 330031)

(² 南昌大学机电工程学院, 南昌 330031)

(³ 南昌大学转化医学研究院, 南昌 330031)

摘要: 制备了油酸修饰的 Fe₃O₄ 纳米粒子, 利用盐酸多巴胺对其表面进行氨基化改性, 制得水分散性良好的 Fe₃O₄ 纳米粒子, 用 X 射线衍射、透射电镜、傅里叶变换红外光谱仪、振动样品磁强计和紫外-可见吸收光谱进行表征。随后, 将氨基修饰的三磷酸腺苷(ATP)适体接枝到 Fe₃O₄ 纳米粒子上, 结合荧光素酶化学发光法进行 ATP 的定量检测, 并应用于市售酸奶中乳酸菌 ATP 含量的检测, 其灵敏度高、重现性好。各项实验结果表明所制备的 Fe₃O₄ 纳米粒子是一种分散性好、易分离的载体, 其粒径均一、稳定、磁性强、与适体结合性能好, 拓展了 Fe₃O₄ 纳米粒子在分析检测领域的应用。

关键词: Fe₃O₄; 纳米粒子; 氨基功能化; 适体; 化学发光检测

中图分类号: O614.81+1 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2017)02-0340-07

DOI: 10.11862/CJIC.2017.034

Nanoparticles Grafted by ATP Aptamer: Preparation and Application in Chemiluminescence Enzyme Analysis

YAN Xi-Luan¹ CHEN Xin¹ GAO Wen-Ju¹ WEI Ting-Ting¹ LIN Yue-Min¹ AI Fan-Rong^{*2,3}

(¹ School of Resources, Environmental & Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang, 330031, China)

(² School of Mechanic & Electronic Engineering, Nanchang University, Nanchang, 330031, China)

(³ Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang, Nanchang, 330031, China)

Abstract: Oleic acid-modified Fe₃O₄ nanoparticles was prepared and dopamine hydrochloride was chosen to amino-modify these nanoparticles. The Fe₃O₄ nanoparticles have good water-dispersible, and were characterized by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy, vibrating sample magnetometer and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) spectra. Then, amino-modified adenosine triphosphate (ATP) aptamer was grafted onto Fe₃O₄ nanoparticles, and the amount of ATP was detected with luciferase chemiluminescence method. Meanwhile, the amount of ATP of lactic acid bacteria in commercially yogurt was tested, which had high sensitivity and good reproducibility. The results showed that these functionalized-Fe₃O₄ nanoparticles could act as good dispersion, easy separation carrier, which indicated uniform particle size, good stability, strong magnetism and excellent binding ability with ATP aptamer. The development of Fe₃O₄ nanoparticles largely expanded its application in the field of analysis.

Keywords: Fe₃O₄; nanoparticles; aptamer; ATP; chemiluminescence detection

收稿日期: 2016-08-31。收修改稿日期: 2016-11-21。

国家自然科学基金(No.81102289, 51102131, 31660491)和江西省自然科学基金(No.20132BAB205106, 20142BAB216033)资助项目。

*通信联系人。E-mail: afr3755875@126.com

0 引言

化学发光是在化学反应过程中产生的光辐射现象,通过检测其发光值可以测定反应物、催化剂、增敏剂、抑制剂等物质的含量^[1],化学发光分析法不需外来光源、灵敏度高、检测范围宽、仪器设备简单^[2],在食品、环境和临床检测等方面有良好的应用前景^[3-6]。适体是通过指数级富集的配体进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)获得的寡核苷酸链,能以较高的亲和力与配体结合,含有 20~80 个碱基^[7]。近年来,SELEX 技术发展迅速^[8],适体种类不断增多,应用范围逐渐扩大,不仅可用于血小板衍生因子^[9]、多巴胺^[10]、黄曲霉毒素^[11]等小分子物质的检测,还可用于病毒^[12]和细菌^[13]等活性物质的检测。将适体固定在磁性纳米粒子、金电极、膜材料、碳纳米材料等支持物上^[15-18],可在复杂环境中特异性地识别出目标物,实现物质的分离^[19]。其中磁性纳米粒子中的 Fe_3O_4 纳

米粒子由于具有超顺磁性、生物相容性好且不影响适体的性能,是一种良好的适体结合的载体^[20-22]。

本文首先采用共沉淀法,制备了油酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子,采用盐酸多巴胺对其表面进行氨基化改性,获得水溶性 Fe_3O_4 纳米粒子。然后以戊二醛为交联剂,将氨基修饰的 ATP 适体连接到氨基化的 Fe_3O_4 纳米粒子上,并通过鸟嘌呤(guanine, G)碱基与苯甲酰甲醛溶液发生瞬时衍生反应产生化学发光^[23],定量检测优化 Fe_3O_4 纳米粒子的量。采用自制 Fe_3O_4 纳米粒子作为载体,先结合 ATP 适体,再加入不同浓度的 ATP,利用荧光素酶进行 ATP 的化学发光检测,结果表明该方法可用于 ATP 的定量检测。同时,由于酸奶中含有大量的乳酸菌,单个活菌体内含有 10^{-18} mol 的 ATP^[24],而每毫升市售酸奶中乳酸菌的量可达 2.65×10^{10} 个以上^[25],故将自制 Fe_3O_4 纳米粒子应用于市售酸奶中乳酸菌 ATP 的化学发光检测,以此验证自制 Fe_3O_4 纳米粒子的实际生物检测应用。实验示意图如图 1 所示。

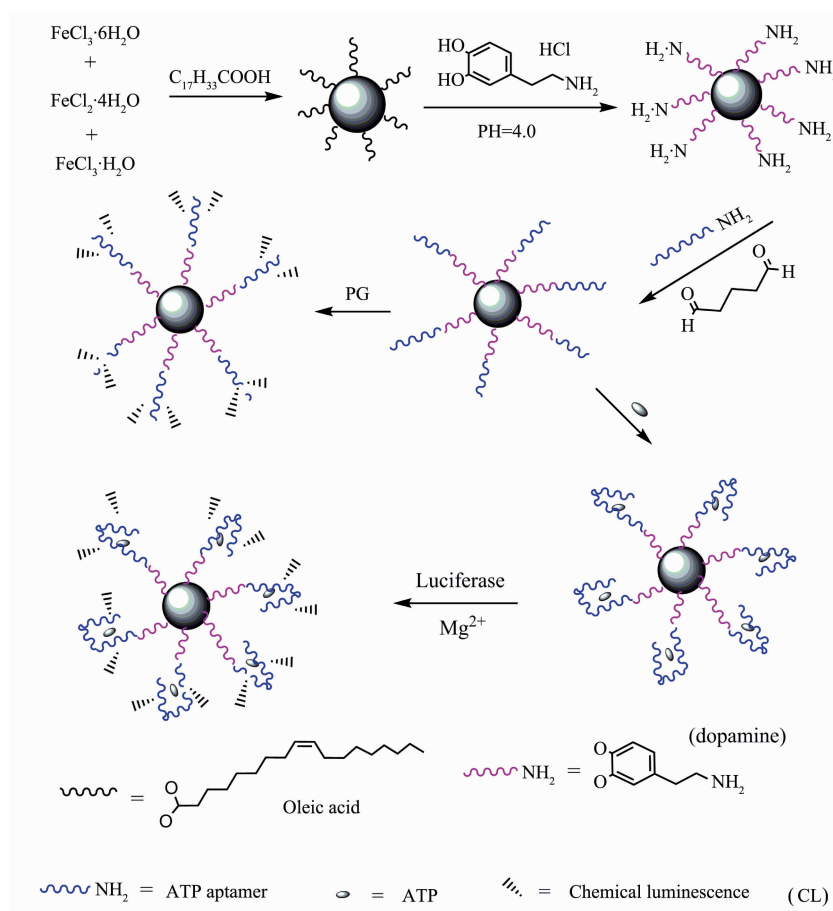


图 1 ATP 适体接枝 Fe_3O_4 纳米粒子的制备及化学发光示意图

Fig.1 Preparation and chemiluminescence schematic presentation of ATP aptamer grafted Fe_3O_4 nanoparticles

1 实验部分

1.1 实验试剂

ATP 荧光素酶检测试剂盒购于 Thermo Fisher Scientific 公司(USA); 苯扎氯铵购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 盐酸多巴胺购于上海麦克林生化科技股份有限公司; 三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、苯甲酰甲醛、5-腺苷三磷酸二钠盐(ATP)、胞苷-5-三磷酸二钠盐(CTP)、鸟苷-5-三磷酸二钠盐(GTP)、尿苷-5-三磷酸三钠盐(UTP)均购于上海爱紫特生物科技有限公司; ATP 适体(核酸序列为 5-AgAgAACCTgggggAgTATTgCggAggAAgTTTTTT-3-NH₂)由上海生工生物工程有限公司合成; 市售酸奶购于江西阳光乳业股份有限公司; 其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。所有的药品都是分析纯。

吡啶清洗液(pH 6.0, 吡啶-盐酸); BA 杂交液(pH 8.0, 20 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷与 0.5 mol·L⁻¹ 氯化钠); WB 洗涤液(pH 8.0, 7 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷, 0.17 mol·L⁻¹ 氯化钠, 0.05%吐温 20); AA 适体反应液(pH 8.3, 20 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷, 300 mmol·L⁻¹ 氯化钠, 5 mmol·L⁻¹ 氯化镁); 四丁基氢氧化铵-磷酸缓冲液(pH 8.5, 四丁基氢氧化铵-磷酸)。

1.2 实验仪器

集热式恒温磁力搅拌器(DF-101S, 河南巩义市予华仪器设备有限公司); 分析天平(BSA124S, 赛多利斯科学仪器有限公司); 磁性分离器(CS15000, 美国 Invitroge 公司); 移液器(德国 Eppendorf 公司 10~1 000 μL); BPCL 微弱发光仪(BPCL-1-TGC, 中国科学院生物物理研究所); 恒温振荡仪(HZ-9211KB, 太仓市科教器材厂); 超声仪(SB-80, 宁波新芝生物科技有限公司); 超纯水机(UPHW-111-90T, 四川优普超纯科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Fe₃O₄ 纳米粒子的制备

称取 0.860 g FeCl₂·4H₂O 和 2.350 g FeCl₃·6H₂O, 分别用 20 mL 超纯水超声溶解, 加入 250 mL 三口烧瓶中, 置于恒温油浴锅中, 室温搅拌 2~3 min; 迅速加入 3.75 mL NH₃·H₂O, 搅拌均匀, 缓慢地滴加 0.3 mL 油酸, 升温至 80 °C 反应 1 h。反应完成后, 冷却至室温, 加入 30 mL 氯仿, 然后加入 100 mL NaCl 溶液(1 mol·L⁻¹), 静置分层, 弃上层溶液。用

30 mL 乙醇洗涤, 磁铁收集 Fe₃O₄ 粒子并分散于氯仿溶液中, 制得油酸改性的 Fe₃O₄ 纳米粒子, 备用。

1.3.2 氨基化改性

取 1 mL 油酸改性的 Fe₃O₄ 纳米粒子, 加入 15 mg 盐酸多巴胺溶液中(先用 20 mL 超纯水溶解, 随后加入 100 μL 浓度为 1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液调 pH=4.0), 振荡 5 min; 磁性分离去掉废液, 乙醇超声分散, 离心 15 min(转速为 12 000 r·min⁻¹), 弃上清液, 加入 10.0 mL 超纯水超声分散, 制得氨基化改性的 Fe₃O₄ 纳米粒子, 4 °C 保存。

1.3.3 与 ATP 适体的连接

取不同量氨基改性的 Fe₃O₄ 纳米粒子(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 μmol), 吡啶缓冲液清洗 3 次, 磁性分离, 加入 200 μL 戊二醛溶液, 室温振荡(转速为 170 r·min⁻¹, 下同)3 h。分别加入 10 pmol ATP 适体, 室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次, 磁性分离, 用 10 μL 四丁基磷酸盐缓冲液将 Fe₃O₄ 纳米粒子转移至一端开口的圆柱形玻璃瓶, 置于 BPCL 微弱发光仪中, 加入 90 μL 苯甲酰甲醛溶液测量发光值, 取自最高信号值起之后的 10 s 的积分值作为信号值。

1.3.4 ATP 的化学发光检测

取 1.0 μmol 氨基改性的 Fe₃O₄ 纳米粒子, 吡啶缓冲液清洗 3 次, 磁性分离, 加入 200 μL 戊二醛溶液, 室温振荡 3 h。加入 10 pmol ATP 适体, 室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次, 加入 200 μL 2%的 BSA 溶液, 室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次, 将 Fe₃O₄ 纳米粒子加入 100 μL ATP(浓度为 2、4、6、8、10、12 μmol·L⁻¹)溶液中, 室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次, 磁性分离, 用 10 μL 超纯水将 Fe₃O₄ 纳米粒子转移至一端开口的圆柱形玻璃瓶, 置于 BPCL 微弱发光仪中, 加入 90 μL 荧光素酶缓冲液测量发光值, 取自最高信号值起之后的 10 s 的积分值作为信号值。

1.3.5 化学发光法检测 ATP 的特异性及干扰性实验

取 1.0 μmol 氨基改性的 Fe₃O₄ 纳米粒子, 吡啶缓冲液清洗 3 次, 磁性分离, 加入 200 μL 戊二醛溶液, 室温振荡 3 h。加入 10 pmol ATP 适体, 室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次, 加入 200 μL 2%的 BSA 溶液, 室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次, 加入 100 μL 浓度均为 10 μmol·L⁻¹ 的 ATP 溶液, GTP 溶液, CTP 溶液, UTP 溶液, ATP 和 GTP 混合液, ATP 和 CTP 混合液, ATP 和 UTP 混合液, ATP、GTP、CTP 和 UTP 混合液中, 空白为 AA 缓冲液, 室温振荡

1 h。WB 清洗液洗涤 3 次,磁性分离,用 10 μL 超纯水将 Fe_3O_4 纳米粒子转移至一端开口的圆柱形玻璃瓶,置于 BPCL 微弱发光仪中,加入 90 μL 荧光素酶缓冲液测量发光值。

1.3.6 酸奶中乳酸菌 ATP 含量的检测

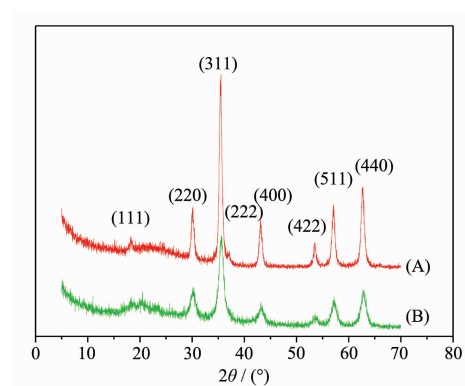
乳酸菌 ATP 的提取^[24]:分别取 100、300、600 μL 酸奶用超纯水稀释至 1 mL,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,去上清液,加 1% 苯扎氯铵溶液 1 mL 悬浮沉淀,常温反应 3 min,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 得上清液备用。

取 1.0 μmol 氨基改性的 Fe_3O_4 纳米粒子,吡啶缓冲液清洗 3 次,磁性分离,加入 200 μL 戊二醛溶液,室温振荡 3 h。加入 10 pmol ATP 适体,室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次,加入 200 μL 2% 的 BSA 溶液,室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次,磁性分离,加入 100 μL 乳酸菌 ATP 提取物中,室温振荡 1 h。WB 清洗液洗涤 3 次,磁性分离,用 10 μL 超纯水将 Fe_3O_4 纳米粒子转移至一端开口的圆柱形玻璃瓶,置于 BPCL 微弱发光仪中,加入 90 μL 荧光素酶缓冲液测量发光值,取自最高信号值起之后的 10 s 的积分值作为信号值。

2 结果与讨论

2.1 多巴胺改性 Fe_3O_4 纳米粒子的表征

图 2 为制备得到的磁性粒子的 X 射线衍射图,粒子物相为反尖晶石结构的 Fe_3O_4 ,峰形窄且尖锐,说明结晶完整。图 a 和 b 分别为盐酸多巴胺溶液改性,氨基修饰前后的 Fe_3O_4 纳米粒子的 X 射线衍射图。从图中可以明显的看到氨基修饰前后衍射峰基本没有变化,表明在改性中 Fe_3O_4 的晶体结构没有改变,但由亲油性变成亲水性。从图上得到改性前后



(A) Before amino-modification; (B) After amino-modification

图 2 Fe_3O_4 纳米粒子 XRD 图

Fig.2 XRD patterns of the Fe_3O_4 nanoparticles

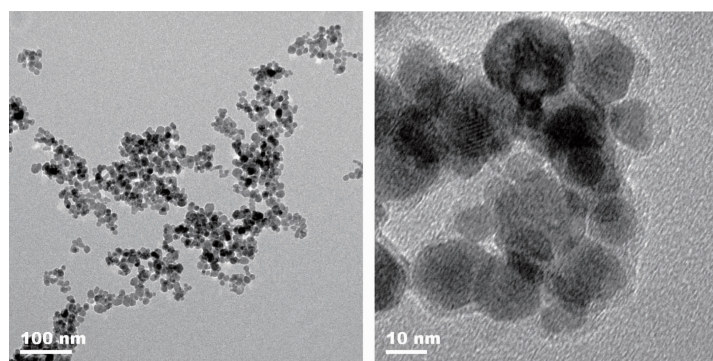
的磁性微粒的衍射峰都出现在 $2\theta = 30.430^\circ$, 35.800° , 43.480° , 57.350° , 62.920° 处,与 Fe_3O_4 的立方晶面对应。图中 $20\sim 30$ 之间有 1 个微弱的弥散峰,应该是由 Fe_3O_4 粒子表面存在的油酸及多巴胺所致。根据 Scherrer 公式:

$$D = \frac{K\lambda}{B\cos\theta}$$

其中 K 为 Scherrer 常数,取 0.89, λ 为 X 射线波长, β 为半高宽, θ 为布拉格角,取晶面计算得 $D = 12 \text{ nm}$ 。

图 3 为改性后的 Fe_3O_4 粒子的透射电镜图照片,显示粒子分散性较好,为规则球形,粒径约为 12 nm,与 XRD 结果基本一致,其值小于 Fe_3O_4 的超顺磁性临界尺寸 15 nm,具有超顺磁性。由 Fe_3O_4 粒子高倍透射电镜图(图 3(B))所示,在 Fe_3O_4 纳米粒子表面有一层明显的多巴胺保护层,多巴胺上的氨基可用于后续适体的接枝。

图 4(A)中(a)、(b)分别为多巴胺改性前油酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子(OA- Fe_3O_4)和多巴胺改性后 Fe_3O_4



(A) Low magnification; (B) High magnification

图 3 氨基改性后 Fe_3O_4 纳米粒子透射电镜照片

Fig.3 TEM images of the amino-modified Fe_3O_4 nanoparticles

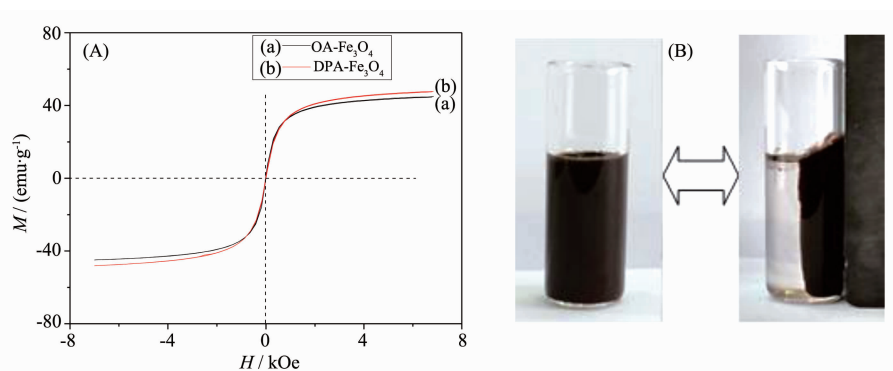


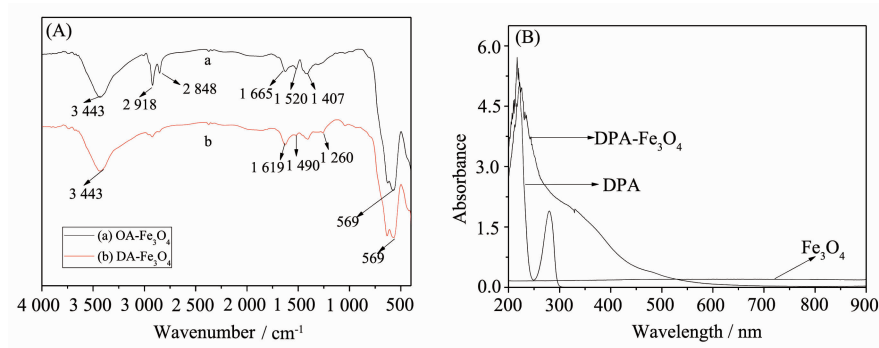
图 4 (A) Fe_3O_4 纳米粒子氨基改性前后磁滞回线; (B) 氨基改性前 Fe_3O_4 纳米粒子的磁响应
Fig.4 (A) Hysteresis loop of Fe_3O_4 nanoparticles before and after amino modification; (B) Magnetic responsiveness of Fe_3O_4 nanoparticles

纳米粒子($\text{DPA-Fe}_3\text{O}_4$)在室温下的磁滞回线。由图中可知,样品均具有良好的超顺磁性;油酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子经多巴胺改性后,饱和磁化强度(M_s)略有下降,这是由于改性后多巴胺取代油酸连接到 Fe_3O_4 磁性粒子上,因此在测试样品质量相同的情况下,磁性部分的减少导致 M_s 的降低。图 4(B)为改性前的 Fe_3O_4 纳米粒子在磁铁的作用下被吸附的图像,在磁铁的作用下,10 s 内粒子就被吸附靠近磁铁,表明 Fe_3O_4 纳米粒子的磁性良好。

图 5(A)为多巴胺改性前后的 Fe_3O_4 粒子红外光谱分析图,改性前后均保留了 569 cm^{-1} 处 Fe-O 键的吸收峰;同时 $3\,443\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰变强,是改性后表面修饰的氨基所发生的伸缩振动和表面-OH 的特征吸收峰叠加而导致。改性前 $\text{OA-Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子,

$2\,918$ 和 $2\,848\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰对应油酸中的 CH_2 链, $1\,665$ 和 $1\,520\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰对应油酸中羧基的延伸链,表明油酸可通过化学键连接到纳米粒子表面;氨基改性后 $\text{DPA-Fe}_3\text{O}_4$ 纳米粒子的羧基和亚甲基的特征吸收峰都消失,且 $1\,619\text{ cm}^{-1}$ 处 N-H 延伸链、 $1\,490\text{ cm}^{-1}$ 处苯环 C-C 振动键和 $1\,260\text{ cm}^{-1}$ 处苯酚的 C-O 键的吸收峰出现,表明氨基改性成功。

图 5(B)为氨基改性前后的 Fe_3O_4 纳米粒子紫外可见光谱图,盐酸多巴胺 (DPA) 标准液在 220 和 280 nm 处有吸收峰,盐酸多巴胺改性的 Fe_3O_4 纳米粒子($\text{DPA-Fe}_3\text{O}_4$)在 220 nm 处出现吸收峰,而未改性的 Fe_3O_4 纳米粒子无吸收峰出现,说明多巴胺成功连接在 Fe_3O_4 上。



(A) FTIR spectrum; (B) UV-Vis absorption spectra

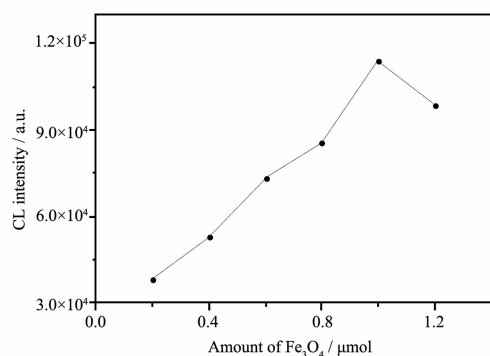
图 5 氨基改性前后 Fe_3O_4 纳米粒子表征

Fig.5 Characterization of Fe_3O_4 nanoparticles before and after amino-modification

2.2 改性后 Fe_3O_4 纳米粒子接枝 ATP 适体

ATP 适体上含有 G 碱基,与苯甲酰甲醛溶液反应后产生瞬时发光,可由微弱发光仪检测到。适体量

增大,化学发光值也随之增大。通过固定加入 ATP 适体量(10 pmol),改变加入的 Fe_3O_4 纳米粒子的量,来优化实验中 Fe_3O_4 纳米粒子量。实验结果如图 6



Each data point was the mean of three measurements

图 6 加入不同量 Fe_3O_4 纳米粒子的发光值

Fig.6 Changes of chemiluminescence intensity with different amounts of Fe_3O_4 nanoparticle

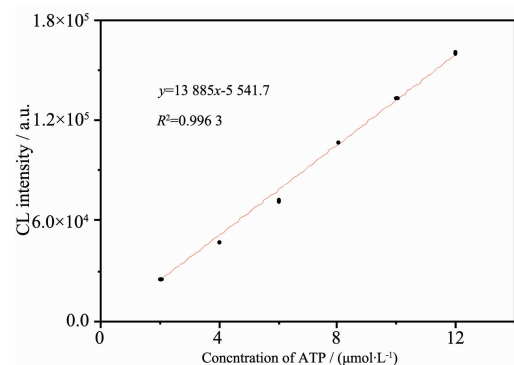
所示,随着 Fe_3O_4 粒子量的增大,ATP 适体连接到纳米级 Fe_3O_4 粒子上,化学发光值先升高后下降,由于过量的 Fe_3O_4 纳米粒子会导致发光的减弱,故加入 $1 \mu\text{mol}$ 的 Fe_3O_4 纳米粒子较为适宜。

2.3 ATP 的定量检测

ATP 适体包裹 ATP 分子形成稳定卷曲的三维结构附着在 Fe_3O_4 纳米粒子上,ATP 与荧光素酶反应产生化学发光,通过检测不同浓度($2, 4, 6, 8, 10, 12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 ATP 的发光值,绘制了 ATP 量与化学发光值关系。如图 7 所示, $R^2=0.9963$,在该范围内线性良好,可用于 ATP 的定量检测,信噪比为 3:1,检测限为 $0.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图 8 为化学发光法检测 ATP 的干扰性实验考察结果。溶液为 CTP、GTP、UTP 时,化学发光值低,表明实验特异性好;溶液为 ATP 和 CTP、GTP、UTP 的混合物时,对化学发光值影响不大,表明该实验方法可靠。

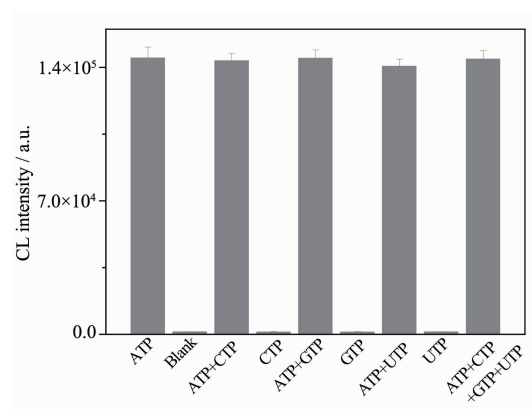
我们还进行了酸奶中乳酸菌 ATP 的检测。先提取出酸奶中乳酸菌的 ATP,再利用 Fe_3O_4 纳米粒子进行实验,特异性捕获 ATP,化学发光法检测其发光



Each data point was the mean of three measurements

图 7 化学发光检测 ATP 工作曲线图

Fig.7 Curve of chemiluminescence detection for ATP



Each data point was the mean of three measurements

图 8 不同溶液中 ATP 发光值的测定

Fig.8 Comparison of ATP chemiluminescence intensity in different solutions

值。由表 1 可知随着酸奶量的增大,所含乳酸菌的量增多,则提取的 ATP 含量高,化学发光值增大,实验重复性好。根据图 7 的化学发光检测 ATP 工作曲线计算,每毫升酸奶的乳酸菌中所含 ATP 的量为 $3.98 \times 10^{-8} \text{ mol}$,说明制备的 Fe_3O_4 纳米粒子可作为载体应用于分析检测领域。

表 1 不同量酸奶中乳酸菌 ATP 化学发光值的测定

Table 1 ATP chemiluminescence determination of lactic acid bacteria in different volumes of yogurt

Volume of yoghourt / μL		CL Intensity / a.u.		Mean	RSD
100	49 259	49 477	50 221	49 652.33	1.0%
300	149 011	150 547	151 010	150 189.33	0.7%
600	300 346	312 547	301 671	304 854.67	2.2%

3 结 论

(1) 采用共沉淀法制备了油酸修饰的纳米 Fe_3O_4

粒子,并用盐酸多巴胺对粒子进行氨基化改性。

(2) 成功地将 ATP 适体连接到氨基改性的 Fe_3O_4 纳米粒子上,磁性分离出 Fe_3O_4 纳米粒子,用

化学发光法优化了 Fe_3O_4 纳米粒子的量。

(3) 氨基改性的 Fe_3O_4 纳米粒子, 先结合 ATP 适体, 再用于 ATP 的定量检测, 线性好, 检测范围广。

(4) 氨基改性的 Fe_3O_4 纳米粒子分散性好、稳定性好, 可作为一种良好的载体应用于生物分离及分析检测等领域。

参考文献:

- [1] Lara F J, García-Campaña A M, Aaron J. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, **679**(1/2):17-30
- [2] Lara F J, García-Campaña A M, Velasco A I. *Electrophoresis*, **2010**, **31**:19982027
- [3] Lara F J, Airado-Rodríguez D, Moreno-González D, et al. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, **913**:22-40
- [4] Iranifam M. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2014**, **59**:156-183
- [5] Ocaña-González J A, Ramos-Payán M, Fernández-Torres R, et al. *Talanta*, **2014**, **122**:214-222
- [6] Calokerinos A. *Anal. Lett.*, **2011**, **44**(1/2/3):176-215
- [7] Famulok M, Mayer G. *Chem. Biol.*, **2014**, **21**(9):1055-1058
- [8] Wu Y X, Kwon Y J. *Methods*, **2016**, **106**:21-28
- [9] Zhu D, Yang R X, Tang Y, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, **85**:429-436
- [10] Zhu L, Xu G, Song Q, et al. *Sens. Actuators, B*, **2016**, **231**:506-512
- [11] Sharma A, Catanante G, Hayat A, et al. *Talanta*, **2016**, **158**:35-41
- [12] Nguyen V, Seo H B, Kim B C, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, **86**:293-300
- [13] Kim Y S, Chung J, Song M Y, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, **54**:195-198
- [14] Qi Y, Xiu F, Zheng M, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, **83**:243-249
- [15] Iranifam M. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2013**, **51**:51-70
- [16] Hai H, Yang F, Li J. *Microchim. Acta*, **2014**, **181**(9/10):893-901
- [17] Ji X B, Yao C G, Wan Y, et al. *Chin. J. Chem.*, **2016**, **34**:331-336
- [18] Zhu L, Xu G, Song Q, et al. *Sens. Actuators, B*, **2016**, **231**:506-512
- [19] LI Hong (李红), JI Liang-Nian (计亮年), LI Wei-Shan (李伟善), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.* (无机化学学报), **2003**, **19**(3): 225-232
- [20] Tombácz E, Turcu R, Socoliuc V, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, **468**(3):442-453
- [21] Mohammadi A, Barikani M, Lakouraj M M. *Mater. Sci. Eng. C*, **2016**, **66**:106-118
- [22] XIAO Wang-Chuan (肖旺钊), WANG Ye-Min (王叶敏), WANG Ren-Zhang (王仁章), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.* (无机化学学报), **2014**, **30**(11):2559-2563
- [23] Kai M, Ohkura Y, Yonekura S, et al. *Anal. Chim. Acta*, **1994**, **287**(1):75-81
- [24] Hattori N, Sakakibara T, Kajiyama N, et al. *Anal. Biochem.*, **2003**, **319**(2):287-295
- [25] HUANG Jun-Hong (黄君红), PENG Li-Zhen (彭丽珍), WANG Ai-Lan (王爱兰). *Chinese J. Microecology* (中国微生态学杂志), **2001**, **13**(6):324-325