

基于纳米生物技术的三明治结构在蛋白质免疫分析中研究进展

田 丹, 王凯悦, 赵 群, 顾学芳*, 田 澍

南通大学化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2021年8月6日; 录用日期: 2021年8月20日; 发布日期: 2021年9月6日

摘 要

蛋白质组研究在重大疾病机制以及药理控制机制探索上有着重要的意义, 通过对生物样品(细胞、组织或体液等)在生理过程中蛋白质含量的比较分析, 可以解码疾病模式与蛋白质组间的未知关联。近年来基于三明治结构的蛋白质检测技术已成为热门的研究方向。构建操作简便、快速灵敏的新型蛋白质生物传感器对生物医学的基础性研究, 以及疾病的早期/预后临床诊断不但意义重大, 而且切实可行。本文首先简要阐述了三明治免疫分析的基本原理, 随后按不同读出方法, 包括放射、比色、荧光、电化学以及局域表面等离子体共振等方面对其近年来的发展进行了回顾, 主要集中在基于纳米生物技术的三明治结构在蛋白质分析的应用上。

关键词

三明治结构, 蛋白质免疫分析, 纳米生物技术

Research Progress of Nano Biotechnology-Based Sandwich Structure in Protein Immunoassay

Dan Tian, Kaiyue Wang, Qun Zhao, Xuefang Gu*, Shu Tian

School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: Aug. 6th, 2021; accepted: Aug. 20th, 2021; published: Sep. 6th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 田丹, 王凯悦, 赵群, 顾学芳, 田澍. 基于纳米生物技术的三明治结构在蛋白质免疫分析中研究进展[J]. 分析化学进展, 2021, 11(4): 237-245. DOI: 10.12677/aac.2021.114025

Abstract

Proteome research is of great significance in the exploration of major disease mechanisms and pharmacological control mechanisms. Through the comparative analysis of protein content in biological samples (cells, tissues or body fluids, etc.) in physiological processes, the unknown relationship between disease patterns and proteome can be decoded. In recent years, protein detection technology based on sandwich structure has become a hot research direction. The construction of a simple, rapid and sensitive new protein biosensor is not only of great significance, but also practical for the basic research of biomedicine and the early/prognostic clinical diagnosis of diseases. This paper first briefly describes the basic principle of sandwich immunoassay, and then reviews the development in recent years according to different readout methods, including radiation, colorimetry, fluorescence, electrochemistry and local surface plasmon resonance, mainly focusing on the application of sandwich structure based on nano biotechnology in protein analysis.

Keywords

Sandwich Structure, Protein Immunoassay, Nano Biotechnology

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

几十年来, 基于三明治结构的免疫分析一直是生物检测、临床诊断、环境监测领域的主流技术。三明治分析过程无需对目标分子进行特殊标记, 结合多种信号放大机制, 使得该方法具有极高的特异性和检测灵敏度[1]。随着化学、生物技术和纳米技术的进步, 三明治分析方法得到了令人瞩目的发展, 已成功应用于包括病原体、蛋白质、核酸、小分子和离子等一系列目标物的检测。信号读出方法从最初的放射性标记扩展到比色、荧光或电化学等更简便的读出方法。此外, 基本的三明治结构也已被改进成超级三明治检测平台, 进一步实现信号的放大并降低检测限。本文对三明治分析法进行了介绍, 对其近些年来的发展进行了回顾, 主要集中在基于纳米生物技术的三明治结构在蛋白质分析的应用上。

2. 三明治蛋白质免疫分析的基本原理

蛋白质分子不仅参与生物体的构建, 还承担着大部分生物功能。在复杂的生物系统中检测蛋白质分子需要分析方法具有非同寻常的分析特异性和灵敏度。传统的蛋白质免疫分析由分析物、识别分子和信号标记三个基本要素组成。在实际分析过程中, 信号标记物(如放射性同位素、酶、荧光素和氧化还原标记)与识别分子耦合, 当分析物与识别分子结合时, 信号标记物输出对应于分析物浓度或质量的可检测信号, 如放射性、比色、荧光和电化学信号。

基于抗原-抗体之间的特异性识别而实现的免疫分析法可分为竞争性和非竞争性两大类。在竞争性免疫测定中, 如图 1(a)所示, 样品中未标记的待分析物(通常是天然抗原, Ag)与预先标记的抗原(Ag*)竞争抗体表面有限的识别位点。尽管这些基于抗原的检测取得很好的效果且曾被认为是临床诊断的支柱,

但标记相关抗原并保持其生物活性通常复杂、繁琐且昂贵。图 1(b)所示为常用的双位点非竞争性免疫检测：测试样品中的分析物首先与一抗(Ab1)结合，然后信号分子标记的二抗(Ab2)与分析物结合，形成具有三明治结构的免疫复合物。此时，待测组分的浓度与免疫复合物中 Ab2 上标记物所产生的信号强度成正比。例如，Tian 等以金银岛膜为基底固定捕获抗体，以金银双金属纳米颗粒为探针固定 atto610 标记的二抗，通过构建抗体-抗原-抗体三明治结构实现对 IgG 的检测[2]。由于在这类分析方法中，待测蛋白质夹在两种高度特异性的抗体试剂之间，状如三明治，习惯上将这种分析方法称为三明治分析法。三明治分析最重要的过程是将待测物夹在识别分子 1 和带有信号标记物的识别分子 2 之间。随着生物技术的发展，三明治分析的识别分子扩展到诸如寡核苷酸序列和适配体，并被广泛应用于特异性和选择性识别蛋白质、DNA、小分子和离子。同时，随着抗体表面修饰技术的进步，三明治分析的信号读出方法得到极大扩展，两者相辅相成，促进了该方法的不断发展。

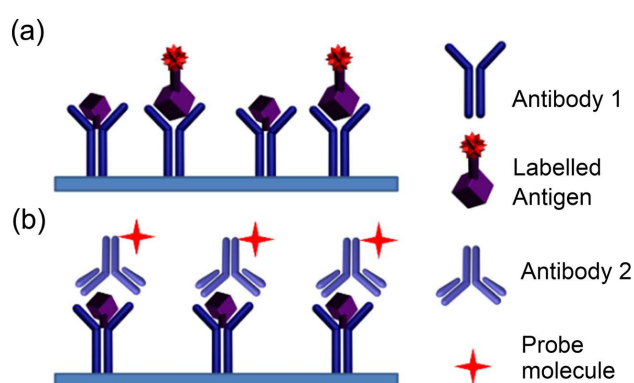


Figure 1. Scheme of competitive (a) and noncompetitive (b) immunoassays
图 1. 竞争(a)与非竞争(b)免疫分析示意图

3. 三明治分析应用于蛋白质分析

蛋白质是生命体的基本功能材料，特定蛋白质标志物可作为健康和生理学相关的评估指标，例如疾病诊断、药物滥用、怀孕、和流行病学研究[3]。为满足基础研究和临床诊断对痕量目标分析物定性定量分析的需要，大量基于信号标记和读出技术的三明治免疫测定方法，如放射免疫测定(RIA)、比色测定(CMA)、荧光免疫测定(FLIA)、电化学测定(ELCA)、巨磁阻测定(GMRA)和局域等离子体共振测定(LSPR)得以建立并快速发展[4]。将检测限降低到飞摩尔水平并将分析时间减少到 10 分钟以内是三明治蛋白质免疫分析的主要发展趋势。

3.1. 三明治放射免疫分析

1959 年，Yalow 和 Berson 首次将放射性同位素标记抗原(Ag*)用作为免疫测定中的信号标志物，实现了对血浆中的胰岛素的测量，这是 RIA 应用于生物医学研究和实践历史上的一个里程碑。Miles 和 Hales 于 1968 年建立并发展了三明治放射免疫分析法[5]。样品与附着在固相(如塑料珠或塑料试管壁)上的特定抗体一起孵育，去除未结合的样品组分后添加放射性标记抗体。第二抗体可与抗原分子的不同部位结合形成免疫复合物，形成抗体-抗原-抗体的“三明治”结构，放射性标记抗体的信号与抗原浓度成正比。与其他免疫分析方法相比，三明治放射免疫分析法的主要优点是灵敏度更高、信号检测更容易，以及完成测试更快速。然而，使用有害放射性核素需要专门的设备和具有授权许可证的操作员，在常规实验室研究中，放射免疫分析已基本被基于酶的比色免疫分析所取代。

3.2. 三明治比色免疫分析

1971年 Engvall 和 Perlman 在三明治放射性免疫分析的基本原理上开创性地建立了一种酶驱动比色分析方法,也就是广为人知的酶联免疫吸附分析(ELISA) [6]。目标物首先与捕获抗体结合,随后添加第二种酶标记抗体以形成三明治免疫复合物。引入标记酶的底物后,出现可见颜色,用于对目标抗原的定量分析。三明治比色法不仅可以提高灵敏度,还可以提高特异性。

3.2.1. 基于传统酶的三明治比色分析

与放射免疫分析法相比,比色分析法提供了更简便快捷、更环保的读出方式。多酶纳米载体技术的发展提高了三明治比色分析的灵敏度,并将分析时间缩短到几分钟,使其更接近医学评估所需的高准确度。碱性磷酸酶(ALP)和辣根过氧化物酶(HRP)是三明治比色免疫分析法中最常用的酶。ALP 是一种水解酶,在 pH 8~10 左右的碱性环境中最有效,可使如磷酸苯酯、磷酸对氨基苯酯、磷酸对硝基苯酯(PNPP)等磷酸单酯脱磷酸。去磷酸化导致试剂变色,进而提供指示目标蛋白存在和浓度的光学信号。HRP 是一种氧化酶,可催化多种有机和无机物质的氧化。HRP 最常用的底物是 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、邻苯二胺(OPD)和 2,2'-叠氮基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (ABTS)。这些三明治比色法的检测限可低至 5 pg/mL。然而,该方法中酶-抗体标记比例为 1:1,这限制了检测限的进一步降低。

3.2.2. 基于仿生纳米材料的比色分析

最新的研究证明,一些纳米材料,如 Pt、Au/Pt 纳米颗粒、Fe₃O₄ 磁性纳米粒子(MNP)、FeS 纳米片、氧化石墨烯、单壁碳纳米管、氧化铜纳米颗粒与 HRP 结合会表现出新的性能[7] [8] [9] [10]。例如, Ma 等报道了一种新颖的免疫分析技术,以 Fe₃O₄@TiO₂@Ag 核壳结构作为免疫探针,金纳米线/聚二甲基硅烷薄层作为支持基底,完成了对前列腺特异抗原(PSA)以及甲胎蛋白(AFP)的定量检测,对 PSA 和 AFP 的最低检测限分别为 0.49 pg/mL 及 0.72 pg/mL [8]。Pt 纳米点包覆的 Au 纳米棒(Au@Pt)表现出类似氧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶的反应活性,可催化氧气和过氧化氢还原以及过氧化氢歧化分解产生氧气。在此基础上, Au@Pt 纳米结构用于检测小鼠白细胞介素 2 (IL-2),检测限低至 1 pg/mL [11]。这些基于仿生纳米结构(酶模拟物)的比色分析不仅可应用于蛋白质的分析,在许多其他生物分子的检测中都有潜在的应用前景。

3.3. 三明治荧光免疫分析

1940 年代初期, Coons 首次提出荧光免疫测定的概念:在三明治免疫测定中以荧光发色团替代酶引入荧光信号,以实现目标蛋白的定性定量分析。常用的荧光团包括荧光有机染料、荧光纳米颗粒和荧光共轭聚合物。荧光免疫分析因其高灵敏度而被广泛用于基础研究和临床诊断。

3.3.1. 荧光有机染料

异硫氰酸荧光素(FITC)、Ru(bpy)₃Cl₂、罗丹明、Alexa fluor 系列染料、花青染料等是荧光免疫分析的主要荧光团,它们都能够吸收能量并进行荧光发射,根据不同的荧光发射波长及荧光强度对待测组分进行定性定量分析。时至今日,基于微珠的三明治免疫分析和流式细胞仪已被广泛应用于蛋白质检测。与传统检测相比,它们的灵敏度可以提高 2~4 倍,并且整个过程可以缩短至 20 分钟。

3.3.2. 以纳米材料为荧光发色团

近年来,以荧光团掺杂纳米颗粒、半导体量子点(QD)、上转换纳米颗粒和其他一些无机和有机荧光纳米颗粒作为荧光标记物提高荧光三明治免疫分析性能的研究受到了广泛关注,并取得了许多突出的成果[12] [13] [14] [15]。特别是半导体量子点,具有许多新颖的荧光特性,如尺寸、成分相关的窄发射、宽

吸收、单波长激发和多荧光发射、高量子产率等。Gu 等人利用 ZnO 量子点作为三明治免疫分析中的荧光标记物完成对癌症标志物 CA 19-9 的检测。该方法利用 CA 19-9 抗体与抗原的免疫反应构建了三明治免疫复合系统，而荧光标记物 ZnO 量子点则通过静电吸附引入体系，对 CA 19-9 的检测则转换为对标记的 ZnO 量子点的本征光致发光信号的测量，其线性响应范围为 1~180 U/mL，检测限为 0.25 U/mL [16]。Swanson 和他的同事开发了一种基于荧光量子点的多通道三明治免疫分析法，用于复杂样本中的多个疾病生物标记物的同时检测。利用稳定、可调谐的量子点作为荧光标记物，可在 15 分钟内完成对血清中保护性抗原(PA)和致死因子(LF)的多重检测，检测限低至 1 pM [17]。

3.4. 三明治电化学免疫分析

电化学检测具有灵敏度高、快速和经济的特点，小型化和发展成熟的电化学仪器也使实时、现场检测成为可能。通过测量免疫复合系统中氧化还原活性标记物输出的电信号可实现对蛋白质的电化学分析。然而，生物材料和电子传感器相互之间往往缺乏电子耦合，需要通过不同策略来放大抗体-抗原间的传导信号。

3.4.1. 氧化还原标记物

使用氧化还原标记物可以提高电化学反应中电子传递的灵敏度。通常，电化学三明治分析的灵敏度主要基于生物识别反应所引入的电化学信号。但大多数情况下，蛋白质和支撑电极之间的直接电子转移会有一些阻碍，因为活性氧化还原基团往往深嵌在蛋白质结构中。亚甲基蓝[18]，3,3',5,5'-四甲基联苯胺[19]，二茂铁[20]，硫堇[21]，耐尔兰等小分子因其出色的氧化还原特性以及易于标记负载而被广泛应用于电化学免疫分析。如图 2 所示，Gu 等以巯基二茂铁为外源标记分子，通过巯基与金属之间强化学键而固定于金纳米颗粒表面，与其共吸附于金纳米颗粒表面的二抗与抗原识别并与捕获抗体共同构成三明治免疫复合物。使用该方法，癌胚抗原(CEA)的浓度与二茂铁电流信号线性相关，线性范围为 0.05~20 ng/mL，最低检测限可达 0.01 ng/mL [20]。Alves-Balvedi 利用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺正电荷特性，使其静电吸附于 DNA 磷酸骨架表面，实现对待测组分的标记[19]。

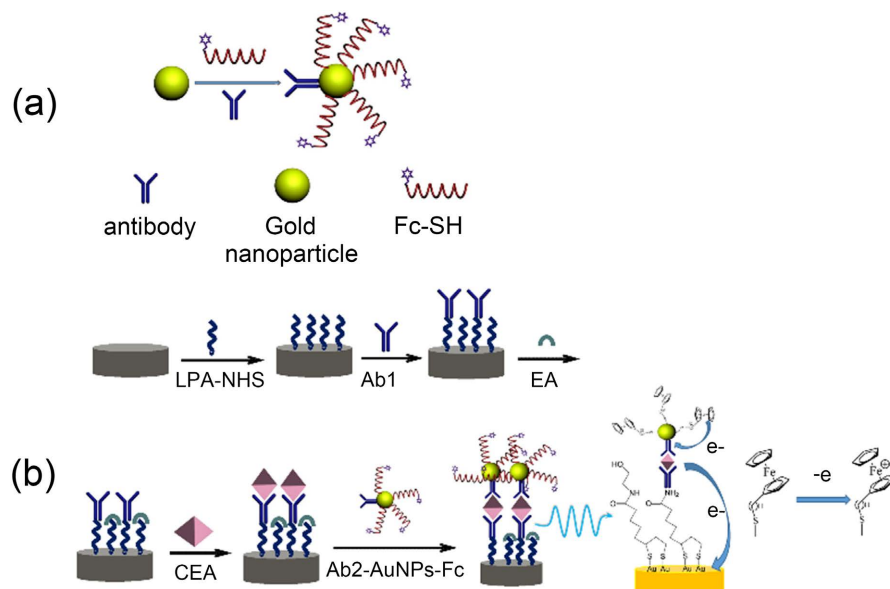


Figure 2. (a) Preparation of Fc-labeled nanogold probes (Ab2-Au-Fc), and (b) the procedures for the construction of sandwich-type electrochemical biosensor. Reprinted with permission from [20]. Copyright 2018 Elsevier

图 2. (a) Fc 标记的金纳米探针(Ab2-Au-Fc)和(b)三明治电化学传感器构建流程示意图。经 ref [20]作者允许后重印，版权归 2018 Elsevier 所有

3.4.2. 基于酶的放大策略

酶作为一类全新的信号放大策略可以极大提高电化学三明治免疫分析的灵敏度。在酶标记的电化学三明治免疫分析中,酶标记的抗体探针直接与抗原上的第二个结合位点结合。此时,抗原夹在两个抗体之间,底物经酶解生成电活性物质,记录产物的氧化还原循环可以获得增强的电化学信号。Akanda 等人设计了一种基于磷酸酶的超灵敏电化学三明治免疫分析法检测人血清中的心肌肌钙蛋白 I。该分析首先在 ITO 电极表面构建一个表面吸附有亲和素的免疫传感基底,进而在免疫传感层上形成三明治复合物,随后的酶反应提供可检测的电子信号。经过优化底物和氧化还原循环,肌钙蛋白 I 的检测限可降低至 10 fg/mL [22]。

3.4.3. 基于纳米材料的放大策略

纳米材料因其独特的物理化学性质,在电化学三明治免疫分析中显示出巨大的潜力。为提高基于纳米材料的电化学免疫测定的灵敏度,可以利用纳米载体的多酶携带能力来放大信号。通常,纳米材料具有较高的比表面积,使得每个纳米粒子能够携带许多酶来催化底物的氧化还原反应。金纳米粒子、碳纳米管(CNT)、氧化石墨烯(GO)、磁珠和二氧化硅纳米粒子已被广泛用作多酶的载体[7] [23] [24]。例如,金纳米颗粒既可以提供一个固定蛋白质分子的友好环境,也可以促进蛋白质分子与底层电极之间的电子转移。另外,利用纳米材料模拟酶的氧化还原中心和电极之间的电子转移提供路径,改变蛋白质与电极之间的直接电子转移效率低的事实,从而实现对三明治免疫分析灵敏度的提升。例如,基于适体修饰的碳纳米管 FET 的三明治分析用于凝血酶的无标记检测,检测限为 10 nM [25]。纳米颗粒修饰的石墨烯纳米片也被用以提高电化学免疫传感器灵敏度。

3.5. 局域表面等离子体共振

局域表面等离子体共振(LSPR)是指发生在金属纳米结构(通常是金、银和铂)的表面的电子集体振荡,当其振动频率与外部电磁辐射频率匹配时,两者发生共振,引起金属纳米颗粒表面附近电磁场性质发生显著增强,由此产生许多全新的光学应用,表面增强拉曼光谱就是其中最引人瞩目的应用之一。系统地改变金属纳米粒子的尺寸、形状和组成,可以在可见光甚至近红外区域里系统调整 LSPR 的频率。金属纳米结构表面吸附的蛋白质或抗原-抗体免疫复合物改变金属周围的折射率,最终导致表面等离子共振吸收带的位移或强度变化,而这种位移或强度变化则与待测组分的浓度成正比[26]。

增强的局部电磁场使吸附在金属纳米结构表面的目标分子的光谱响应得以放大,这种基于 LSPR 的放大信号已应用于多种光学技术,如表面增强拉曼散射(SERS) [27] [28] [29]和表面增强荧光(SEF) [30] [31] [32]。例如,Gu 等以二维有序的金微电极阵列为支持基底并在其上固定捕获抗体,通过构建三明治结构,完成了癌胚抗原(CEA)以及甲胎蛋白(AFP)的电化学和 SERS 的双信号免疫分析[18]。

3.6. 超级三明治结构

在三明治分析中,目标分子仅与一个信号探针结合,这就限制了信号扩增的程度。为了克服这一问题,需要将多个信号探针集成在一起以放大最终信号,这就是所谓的“超级三明治”分析法。Rusling 和他的同事开发了一种碳纳米管微孔阵列,用于灵敏检测癌症生物标志物(前列腺特异性抗原(PSA)和白细胞介素-6(IL-6))。在他们的方法中,二氧化硅纳米颗粒含有 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 用于放大信号。PSA 的检测限为 1 pg/mL,IL-6 的检测限为 0.25 pg/mL [33]。Plaxco 等人开创性地发展了杂交链式反应(HCR),并将其用于生物样品中 DNA 检测。在 HCR 中,精心设计的 DNA 链节可以通过彼此的杂交识别反应形成长的链节连环[34]。随后,该信号放大策略被用至蛋白质检测领域。例如,Tang 等人精心设计了不同序列的 DNA,并使用二茂铁标记其中 H1 和 H2,巧妙地利用 HCR 将电化学活性分子二茂铁引入免疫复合体系,从而实现信号的放大。

相比于常规三明治免疫分析,该方法可将 IgG 的检测限降低至 0.1 fg/mL [35]。如图 3 所示,Gu 等将二抗和 HCR 同时固定于金纳米颗粒的表面,利用标记分子亚甲基蓝,耐尔兰, TMB 等分子的正电荷特性,将标记分子通过静电吸附固定在带负电的 HCR 磷酸骨架表面,形成超级三明治结构实现对响应信号的放大 [18] [36]。

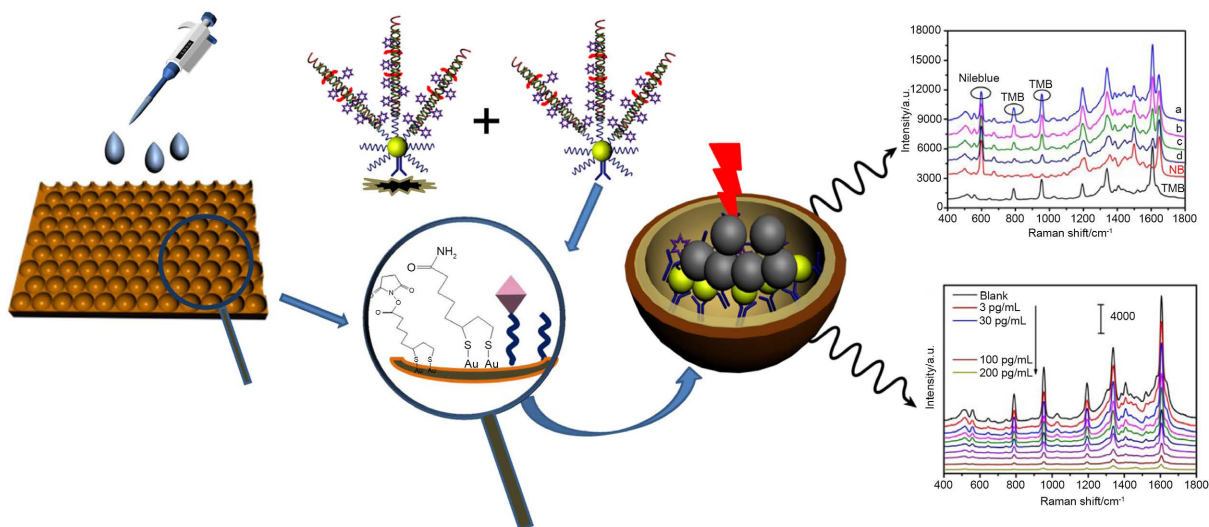


Figure 3. Schematic illustration of the preparation of immuno-probe (Ab-AuNPs-HCR^{label}) and the construction of the SERS-based competitive immunosensors. Reprinted with permission from ref. [36]. Copyright 2021 Elsevier

图 3. 免疫探针(Ab-AuNPs-HCR^{label})的制备及基于 SERS 竞争免疫传感器构建的示意图。经 ref. [36]作者允许后重印,版权归 2021 Elsevier 所有

4. 结论与展望

三明治免疫分析现在和将来都将广泛应用于临床诊断、常规实验室检测、食品安全、环境监测等领域。得益于生物技术、合成化学、纳米技术和电子技术的最新进展,人们正从各个方面努力改进其分析性能。例如,在三明治分析中引入适体,将三明治分析的目标物从蛋白质和 DNA (或 RNA)扩展到小分子和离子。纳米颗粒在三明治分析中的应用显著放大了信号并降低了检测限。此外,一些荧光纳米颗粒,如量子点和染料掺杂纳米颗粒可以产生比传统有机染料更稳定和更强的信号。更多的信号读出方式被应用来读取复合体系的信号,如荧光计、电化学工作站、石英晶体微天平、SPR 和微悬臂梁等。当然,在分析过程中,生物分子与纳米粒子的复合物的稳定性(热稳定性和长期储存稳定性)仍然是一个问题,还需进一步发展表面钝化方法以抵抗非特异性吸附,这依赖于化学、物理和生物学的进一步发展以及这些领域的前沿研究。

参考文献

- [1] Self, C.H. and Cook, D.B. (1996) Advances in Immunoassay Technology. *Current Opinion in Biotechnology*, **7**, 60-65. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80096-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80096-6)
- [2] Tian, S., You, W., Shen, Y., et al. (2019) Facile Synthesis of Silver-Rich Au/Ag Bimetallic Nanoparticles with Highly Active SERS Properties. *New Journal of Chemistry*, **43**, 14772-14780. <https://doi.org/10.1039/C9NJ02879J>
- [3] Vasan, R.S. (2006) Biomarkers of Cardiovascular Disease. *Circulation*, **113**, 2335-2362. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570>
- [4] Shen, J., Li, Y., Gu, H., et al. (2014) Recent Development of Sandwich Assay Based on the Nanobiotechnologies for Proteins, Nucleic Acids, Small Molecules, and Ions. *Chemical Reviews*, **114**, 7631-7677. <https://doi.org/10.1021/cr300248x>

- [5] Miles, L.E.M. and Hales, C.N. (1968) The Preparation and Properties of Purified 125I-Labelled Antibodies to Insulin. *Biochemical Journal*, **108**, 611-618. <https://doi.org/10.1042/bj1080611>
- [6] Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- [7] Yang, Y., Zhu, J., Zhao, J., *et al.* (2019) Growth of Spherical Gold Satellites on the Surface of Au@Ag@SiO₂ Core Shell Nanostructures Used for an Ultrasensitive SERS Immunoassay of Alpha-Fetoprotein. *Acs Applied Materials & Interfaces*, **11**, 3617-3626. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b21238>
- [8] Ma, Y., Liu, H., Chen, Y., *et al.* (2020) Quantitative and Recyclable Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Immunoassay Based on Fe₃O₄@TiO₂@Ag Core-Shell Nanoparticles and Au Nanowire/Polydimethylsiloxane Substrates. *Acs Applied Nano Materials*, **3**, 4610-4622. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c00652>
- [9] Zhao, J., Wu, C., Zhai, L., *et al.* (2019) A SERS-Based Immunoassay for the Detection of Alpha-Fetoprotein Using AuNS@Ag@SiO₂ Core-Shell Nanostars. *Journal of Materials Chemistry C*, **7**, 8432-8441. <https://doi.org/10.1039/C9TC01890E>
- [10] Zhang, Y., Sun, H., Gao, R., *et al.* (2018) Facile SERS-Active Chip (PS@Ag/SiO₂/Ag) for the Determination of HCC Biomarker. *Sensors and Actuators B—Chemical*, **272**, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.139>
- [11] He, W., Liu, Y., Yuan, J., *et al.* (2011) Au@Pt Nanostructures as Oxidase and Peroxidase Mimetics for Use in Immunoassays. *Biomaterials*, **32**, 1139-1147. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.040>
- [12] Zhou, L., Zhou, J., Feng, Z., *et al.* (2016) Immunoassay for Tumor Markers in Human Serum Based on Si Nanoparticles and SiC@Ag SERS-Active Substrate. *Analyst*, **141**, 2534-2541. <https://doi.org/10.1039/C6AN00003G>
- [13] Zhang, S., Zhang, C., Jia, Y.Z., *et al.* (2019) Sandwich-Type Electrochemical Immunosensor Based on Au@Pt DNRs/NH₂-MoSe₂ NSs Nanocomposite as Signal Amplifiers for the Sensitive Detection of Alpha-Fetoprotein. *Bioelectrochemistry*, **128**, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.03.012>
- [14] Wang, Y., Zhao, G., Wang, H., *et al.* (2018) Sandwich-Type Electrochemical Immunoassay Based on Co₃O₄@MnO₂-Thionine and Pseudo-ELISA Method toward Sensitive Detection of Alpha Fetoprotein. *Biosensors & Bioelectronics*, **106**, 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.002>
- [15] Zhu, D., Hu, Y., Zhang, X., *et al.* (2019) Colorimetric and Fluorometric Dual-Channel Detection of Alpha-Fetoprotein Based on the Use of ZnS-CdTe Hierarchical Porous Nanospheres. *Microchimica Acta*, **186**, 124. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3225-4>
- [16] Gu, B., Xu, C., Yang, C., *et al.* (2011) ZnO Quantum Dot Labeled Immunosensor for Carbohydrate Antigen 19-9. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 2720-2723. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.031>
- [17] Mukundan, H., Xie, H., Anderson, A.S., *et al.* (2009) Optimizing a Waveguide-Based Sandwich Immunoassay for Tumor Biomarkers: Evaluating Fluorescent Labels and Functional Surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, **20**, 222-230. <https://doi.org/10.1021/bc800283e>
- [18] Gu, X., Wang, K., Qiu, J., *et al.* (2021) Enhanced Electrochemical and SERS Signals by Self-Assembled Gold Microelectrode Arrays: A Dual Readout Platform for Multiplex Immunoassay of Tumor Biomarkers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **334**, Article ID: 129674. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129674>
- [19] Alves-Balvedi, R.P., Caetano, L.P., Madurro, J.M., *et al.* (2016) Use of 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine as New Electrochemical Indicator of DNA Hybridization and Its Application in Genosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, **85**, 226-231. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.016>
- [20] Gu, X., She, Z., Ma, T., *et al.* (2018) Electrochemical Detection of Carcinoembryonic Antigen. *Biosensors & Bioelectronics*, **102**, 610-616. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.014>
- [21] Zhang, D., Huang, L., Liu, B., *et al.* (2019) A Vertical Flow Microarray Chip Based on SERS Nanotags for Rapid and Ultrasensitive Quantification of Alpha-Fetoprotein and Carcinoembryonic Antigen. *Microchimica Acta*, **186**, 699. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3792-z>
- [22] Akanda, M.R., Aziz, M.A., Jo, K., *et al.* (2011) Optimization of Phosphatase- and Redox Cycling-Based Immunosensors and Its Application to Ultrasensitive Detection of Troponin I. *Analytical Chemistry*, **83**, 3926-3933. <https://doi.org/10.1021/ac200447b>
- [23] Yang, S., Zhang, F., Wang, Z., *et al.* (2018) A Graphene Oxide-Based Label-Free Electrochemical Aptasensor for the Detection of Alpha-Fetoprotein. *Biosensors & Bioelectronics*, **112**, 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.026>
- [24] Zhang, C., Gao, Y., Yang, N., *et al.* (2018) Direct Determination of the Tumor Marker AFP via Silver Nanoparticle Enhanced SERS and AFP-Modified Gold Nanoparticles as Capturing Substrate. *Microchimica Acta*, **185**, 90. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2652-y>
- [25] So, H.M., Won, K., Kim, Y.H., *et al.* (2005) Single-Walled Carbon Nanotube Biosensors Using Aptamers as Molecular Recognition Elements. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 11906-11907.

- <https://doi.org/10.1021/ja053094r>
- [26] Im, H., Bantz, K.C., Lee, S.H., *et al.* (2013) Self-Assembled Plasmonic Nanoring Cavity Arrays for SERS and LSPR Biosensing. *Advanced Materials*, **25**, 2678-2685. <https://doi.org/10.1002/adma.201204283>
- [27] Zhang, Z., Wang, J., Shanmugasundaram, K.B., *et al.* (2020) Tracking Drug-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer by a Microfluidic Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Immunoassay. *Small*, **16**, Article ID: 1905614. <https://doi.org/10.1002/smll.201905614>
- [28] Zhang, X.X., Xu, D., Guo, D., *et al.* (2020) Enzyme-Free Amplified SERS Immunoassay for the Ultrasensitive Detection of Disease Biomarkers. *Chemical Communications*, **56**, 2933-2936. <https://doi.org/10.1039/C9CC09379F>
- [29] Xiao, R., Lu, L., Rong, Z., *et al.* (2020) Portable and Multiplexed Lateral Flow Immunoassay Reader Based on SERS for Highly Sensitive Point-of-Care Testing. *Biosensors & Bioelectronics*, **168**, Article ID: 112524. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112524>
- [30] Zhang, R., Jin, Z., Tian, Z., *et al.* (2021) A Straightforward and Sensitive “ON-OFF” Fluorescence Immunoassay Based on Silicon-Assisted Surface Enhanced Fluorescence. *Rsc Advances*, **11**, 7723-7731. <https://doi.org/10.1039/D0RA08759A>
- [31] Wang, M., Shang, Z., Yan, X., *et al.* (2021) Enhance Fluorescence Study of Grating Structure Based on Three Kinds of Optical Disks. *Optics Communications*, **481**, Article ID: 126522. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2020.126522>
- [32] Pei, X., Tao, G., Wu, X., *et al.* (2020) Nanomaterial-Based Multiplex Optical Sensors. *Analyst*, **145**, 4111-4123. <https://doi.org/10.1039/D0AN00392A>
- [33] Sardesai, N.P., Barron, J.C. and Rusling, J.F. (2011) Carbon Nanotube Microwell Array for Sensitive Electrochemiluminescent Detection of Cancer Biomarker Proteins. *Analytical Chemistry*, **83**, 6698-6703. <https://doi.org/10.1021/ac201292q>
- [34] Xia, F., White, R.J., Zuo, X., *et al.* (2010) An Electrochemical Supersandwich Assay for Sensitive and Selective DNA Detection in Complex Matrices. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 14346-14348. <https://doi.org/10.1021/ja104998m>
- [35] Zhang, B., Liu, B., Tang, D., *et al.* (2012) DNA-Based Hybridization Chain Reaction for Amplified Bioelectronic Signal and Ultrasensitive Detection of Proteins. *Analytical Chemistry*, **84**, 5392-5399. <https://doi.org/10.1021/ac3009065>
- [36] Gu, X., Tian, S., Chen, Y., *et al.* (2021) A SERS-Based Competitive Immunoassay Using Highly Ordered Gold Cavity Arrays as the Substrate for Simultaneous Detection of β -Adrenergic Agonists. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **345**, Article ID: 130230. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130230>