

doi:10.3969/j.issn.1673-9833.2018.05.005

基于纳米金和辣根过氧化物酶信号放大的 癌胚抗原电化学免疫传感器

杨高建, 赖玉璇, 汤从利, 邓 燕

(湖南工业大学 生物医用纳米材料及器件湖南省重点实验室, 湖南 株洲 412007)

摘要: 以癌胚抗原 (CEA) 为检测目标构建 CEA 电化学免疫传感器: 壳聚糖为生物活性膜, 纳米金和生物素标记的辣根过氧化物酶为放大元, CEA、链霉亲和素标记的癌胚抗体免疫反应形成的复合物为固定的酶标免疫复合物, 并对检测条件进行了优化。通过竞争性酶联免疫法检测不同浓度 CEA 的电化学响应。结果表明, 该新型免疫传感器表现出良好的线性范围 (4~16 ng/mL, $R^2=0.9927$), 检测限为 1 ng/mL。

关键词: 电化学免疫传感器; 酶联免疫; 癌胚抗原 (CEA); 纳米金 (AuNPs)

中图分类号: O657.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2018)05-0027-05

A Carcinoembryonic Antigen Electrochemical Immunosensor Based on Gold Nanoparticles and Horseradish Peroxidase Signal Amplification

YANG Gaojian, LAI Yuxuan, TANG Congli, DENG Yan

(Hunan Key Laboratory of Biomedical Nanomaterials and Devices, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: A novel carcinoembryonic antigen (CEA) electrochemical immunosensor has been constructed using chitosan (CS) as bioactive membranes, gold nanoparticles (AuNPs) and biotinylated horseradish peroxidase (HRP) for signal amplification, and CEA, streptavidin-labeled carcinoembryonic anti-bodies (anti-CEA) immunoreactive complexes as immobilized enzyme-labeled immunoconjugates, accompanied by the optimization of the detection conditions. The effect of different electrochemical responses at different concentrations of CEA can be detected by adopting the competitive enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). This novel sensor exhibits such fine properties as with a good linear range (4~16 ng/mL, $R^2=0.9927$) and a low detection limits of 1 ng/mL.

Keywords: electrochemical immunosensor; enzyme-linked immunoassay; carcinoembryonic antigen (CEA); gold nanoparticles (AuNPs)

1 研究背景

肿瘤标志物^[1]是一种由肿瘤细胞或者其他组织产生的与肿瘤细胞活动有关的活性物质, 根据其生化或免疫特性可用于识别或诊断肿瘤。癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 是一种分子质量约

为 200 kDa 的酸性糖蛋白, 被广泛用作许多恶性肿瘤的标志物^[2], 如肺癌^[3]、卵巢癌^[4]、乳腺癌^[5]等。CEA 在血清中的相对浓度高低可作为标记物来诊断疾病、判断病症的复发或转移以及评估医疗效果^[6]。已有报道中对血清中 CEA 相对浓度的免疫检测方法

收稿日期: 2017-11-27

作者简介: 杨高建 (1994-), 男, 安徽池州人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为生物免疫电化学传感器, 纳米功能材料, E-mail: 1801318832@qq.com

很多,如酶联免疫吸附法^[7]、荧光免疫^[8]、放射免疫^[9]、化学发光^[10]等,这些方法需要昂贵复杂的仪器支持,操作时间较长,灵敏度不高,辐射及光污染严重,从而限制了其普及使用。血清中 CEA 等标志物的含量极低,发展高灵敏、简便的免疫分析技术对肿瘤标志物的检测有着至关重要的意义。电化学免疫传感器利用抗原和抗体间的高度特异性结合的原理,将免疫分析法和电化学传感技术相结合构建的生物传感器,具有灵敏度高、分析速度快、操作简便、成本低等特点。

壳聚糖具有良好的成膜能力和吸附性能,且无毒、机械强度高;纳米金具有很高的比表面积,可与多种生物大分子结合,给予蛋白质分子更自由的取向,能加快电子传递速率。本文拟构建一种基于纳米金(gold nanoparticles, AuNPs)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)两步信号放大的免疫传感器,通过竞争免疫法检测血清中 CEA 痕量相对浓度。

2 实验部分

2.1 主要试剂与仪器

人 CEA 酶联免疫检测试剂盒,上海生工生物工程公司;牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA),上海生工生物工程公司;壳聚糖(Chitosan, CS), BR;氯化钾, AR;六水合氯化铁, AR;盐酸, AR;硝酸, AR;磷酸二氢钾, AR;铁氰化钾, AR;氯金酸, AR;氯化钠, AR;柠檬酸三钠, AR;过氧化氢,质量分数为 30%, AR;邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPD), AR;冰醋酸, AR;十二水合磷酸氢二钠, AR。实验所用试剂均购于国药集团化学试剂有限公司,所用水均为超纯水。

电化学工作站,上海市辰华仪器公司;智能磁力搅拌器,巩义予华仪器公司;超声波清洗器,长沙明杰仪器有限公司。

2.2 壳聚糖溶液的配制

取 1 g 冰醋酸,用 99 g 分子水稀释,配制成质量分数为 1% 的醋酸溶液;再取 0.2 g 的 CS 于 10 mL 的烧杯中,用 9.8 g 质量分数为 2% 的醋酸溶液溶解。

2.3 纳米金的制备

所用玻璃仪器均用王水浸泡 12 h;分别配制质量分数为 0.01% 氯金酸以及质量分数为 1% 的柠檬酸三钠;取 100 mL 质量分数为 0.01% 的氯金酸于三口烧瓶,在油浴锅中于 100 °C 加热搅拌至沸腾;快速加入 3 mL 质量分数为 1% 的柠檬酸三钠溶液,溶液在短时间内转变为酒红色,继续搅拌 15 min;移去加热源,持续搅拌 15 min,将溶液收集置于玻璃

冷冻管,于 4 °C 温度条件下保存^[11-12]。

2.4 玻碳电极的处理

将玻碳电极^[13](glassy carbon electrode, GCE)用粒径为 0.05 μm 的抛光粉进行抛光,打磨数分钟;然后使用分子水冲洗电极,在超声清洗器中超声清洗 3~4 min,再分别用乙醇、硝酸以及分子水超声清洗 3~4 min^[14]。

用 0.05 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ (含有 0.1 mol/L KCl) 为支持液;在电化学工作站中(以 GCE 为工作电极,铂丝电极为对电极,甘汞电极为辅助电极)用循环伏安法^[15](cyclic voltammetry, CV),扫描范围为 -0.2~0.6 V,扫描速率为 50 mV/s,获得稳定的循环伏安响应曲线。

2.5 CEA 酶联免疫试剂盒的处理

将试剂盒从 4~8 °C 的储存室里置于室温下平衡 1 h;使用移液枪取适量标准品于 1.5 mL 的灭菌离心管中,并用标准品稀释液将其配制成 80, 16, 14, 11, 10, 6, 4 ng/mL 样液;分别取适量的链酶亲和素标记的 anti-CEA、生物素标记的 HRP、浓缩洗涤液,用无菌水稀释 20 倍,备用。

2.6 传感器的构建及电化学分析

本次研究所用的电化学免疫传感器示意图如图 1 所示。

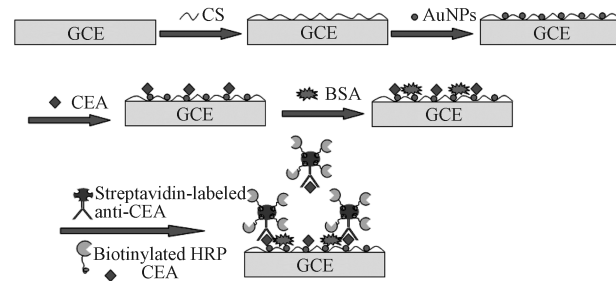


图 1 基于检测 CEA 的 AuNPs 和 HRP 两步信号放大的电化学免疫传感器示意图

Fig. 1 Schematic diagram of electrochemical immunosensor based on CEA detection of two-step signal amplification of AuNPs and HRP

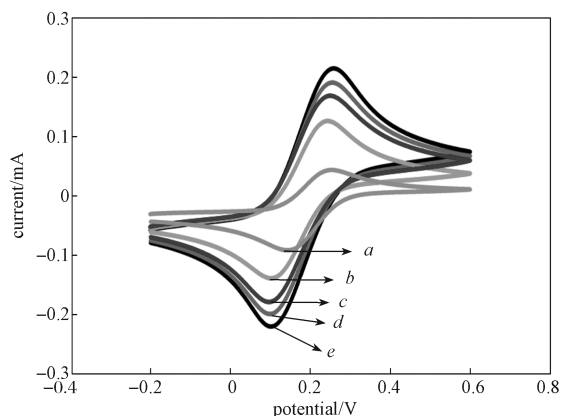
在处理好的 GCE 上滴加 10 μL 质量分数为 2% 的 CS,生成仿生物活性膜;随后滴加 10 μL AuNPs,使其自然干;再于电极表面滴加 10 μL 的 80 ng/mL CEA,于 4 °C 过夜自组装,用质量分数为 1% 的 BSA 封闭 1 h,封闭非特异性活性点;取链酶亲和素标记的抗体(streptavidin-labeled anti-CEA) 2.5 μL、生物素标记的 HRP (biotinylated HRP) 5 μL 以及 2.5 μL 的 CEA,并将其混合;取混合液 10 μL 滴加到电极表面,置于温育箱在 37 °C 下温育 1 h,通过自由 CEA 与固定 CEA 竞争性免疫结合 anti-CEA,传感器置于 0.01 mol/L PBS (pH 值为 7.2) 中在 4 °C 中保存。每

步修饰完成后在 0.05 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 0.1 mol/L KCl 混合溶液中进行 CV 检测; 构建的免疫传感器在 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.2) +15 mmol/L OPD+0.5 mmol/L H_2O_2 体系中对不同浓度的 CEA 进行电化学扫描。扫描范围为 -0.2~0.6 V, 扫描速率为 100 mV/s。

3 结果与讨论

3.1 免疫传感器的电化学行为

图 2 为玻碳电极在 0.05 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ 与 0.1 mol/L KCl 混合溶液中逐级修饰的 CV 图。图 2 中的曲线 *b* 是裸玻碳电极, 壳聚糖膜修饰的玻碳电极 CV 检测电流峰值最小 (曲线 *a*), 说明铁氰化钾的电子传递在电极表面受到了很大阻力^[16]; 再修饰纳米金 (曲线 *e*) 后, 因为纳米金的大比表面积和高传导能力促进了电极表面电子传递^[17], 电流峰值达到最大, 表明纳米金对该修饰电极具有电信号放大作用。在纳米金上修饰 CEA (曲线 *d*) 和 CEA 抗原抗体免疫反应 (曲线 *c*) 后, 由于抗原、抗体的电阻率相对较大, 对铁氰化钾的电子传递有阻碍, 导致峰值电流逐渐减小, 这说明抗原抗体结合完成。



a—CS/GCE; *b*—bare GCE; *c*—HRP/anti-CEA/CEA/AuNPs/CS/GCE; *d*—CEA/AuNPs/CS/GCE; *e*—AuNPs/CS/GCE

图 2 在 0.05 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ +0.1 mol/L KCl 溶液中玻碳电极逐级修饰的 CV 图

Fig. 2 CV diagram of glassy carbon electrode modified step-by-step in the 0.05 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ +0.1 mol/L KCl aqueous solution

将纳米金 / 壳聚糖膜修饰的 GCE 和免疫传感器在扫描范围为 -0.3~-0.8 V, 脉冲宽度为 50 ms, 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.2) 含有 15 mmol/L OPD、0.5 mmol/L H_2O_2 体系中进行微分脉冲伏安 (differential pulse voltammetry, DPV) 检测, 其结果如图 3 所示。图中免疫传感器的电流峰值 (曲线 *b*) 明显比用纳米金 / 壳聚糖膜修饰的 GCE 的电流峰值 (曲线 *a*) 高。这是因为 HRP 高效催化的作用下使得电子传递的速

度大幅度提高^[18-19], HRP 在该传感体系中具有大幅信号放大的作用。

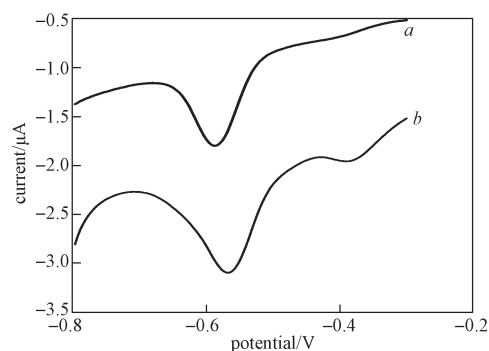


图 3 在 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.2)+15 mmol/L OPD+0.5 mmol/L H_2O_2 体系 AuNPs/CS/GCE 和 HRP/anti-CEA/CEA/AuNPs/CS/GCE 的 DPV 图

Fig. 3 DPV diagram of AuNPs/CS/GCE and HRP/anti-CEA/CEA/AuNPs/CS/GCE in 0.1 mol/L PBS (pH value is 7.2)+15 mmol/L OPD+0.5 mmol/L H_2O_2 aqueous solution

3.2 电化学检测条件优化

据文献报道^[18-19], CEA 最优孵化温度为 35~37 °C, 最优孵化时间为 30~45 min^[21-23]。本实验对反应体系的 pH 值与催化底物浓度进行条件优化。

在该传感体系中, H_2O_2 是 HRP 的催化底物, 实验分析了 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mmol/L H_2O_2 浓度下免疫传感器的信号响应。在 -0.3~-0.8 V 扫描范围, 脉冲宽度为 50 ms, 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.2) 含有 15 mmol/L OPD、0.5~3.5 mmol/L H_2O_2 体系进行 DPV 检测, 实验结果如图 4 所示。实验结果显示, 免疫传感器在 H_2O_2 不同浓度下的对应电流峰值与 H_2O_2 浓度呈线性关系, 在 0.5~3.5 mmol/L H_2O_2 线性浓度之间, CEA 免疫传感器的灵敏度会随 H_2O_2 浓度的升高而线性递增。

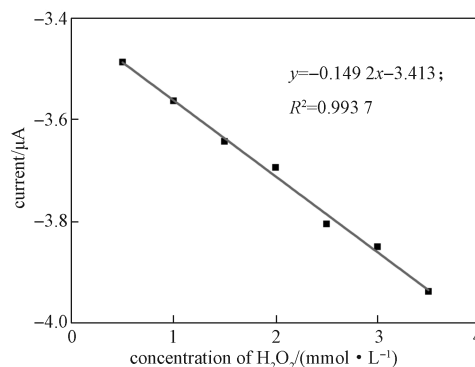


图 4 在 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.2) +15 mmol/L OPD+0.5~3.5 mmol/L H_2O_2 体系免疫传感器的 DPV 峰电流关系图

Fig. 4 Relation schema of the DPV peak current and the concentration of H_2O_2 in the 0.1 mol/L PBS (pH value is 7.2)+15 mmol/L OPD+0.5~3.5 mmol/L H_2O_2 aqueous solution

将传感器在扫描范围为 $-0.3\sim-0.8\text{ V}$ ，脉冲宽度为 50 ms ， 0.1 mol/L PBS (pH 值为 $4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.2, 7.5$) 含有 15 mmol/L OPD、 0.5 mmol/L H_2O_2 体系中进行 DPV 检测，结果如图 5 所示。由图可知免疫传感器在不同 pH 值下对应的峰值电流有明显的变化，在 pH 值为 5.0 时有最大峰值电流^[24]。该结果说明，在 pH 值为 5.0 时免疫传感器的灵敏度最高。

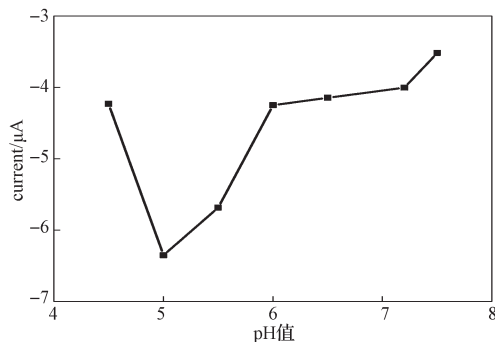


图 5 在 0.1 mol/L PBS (pH 值为 $4.5\sim 7.5$) + 15 mmol/L OPD + 0.5 mmol/L H_2O_2 体系免疫传感器 DPV 峰值电流图
Fig. 5 DPV peak current diagram of system immunosensor in 0.1 mol/L PBS (pH value is $4.5\sim 7.5$) + 15 mmol/L OPD + 0.5 mmol/L H_2O_2 aqueous solution

3.3 CEA 免疫传感器的性能

在 pH 值为 7.2 ，其他实验条件为最佳条件下，模拟生理环境，对 CEA 免疫传感器的性能进行分析。在传感器的扫描范围为 $-0.3\sim-0.8\text{ V}$ ，脉冲宽度为 50 ms ，支持液为 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.2) 含有 15 mmol/L OPD、 0.5 mmol/L H_2O_2 体系中进行 DPV 检测，其结果如图 6 所示。

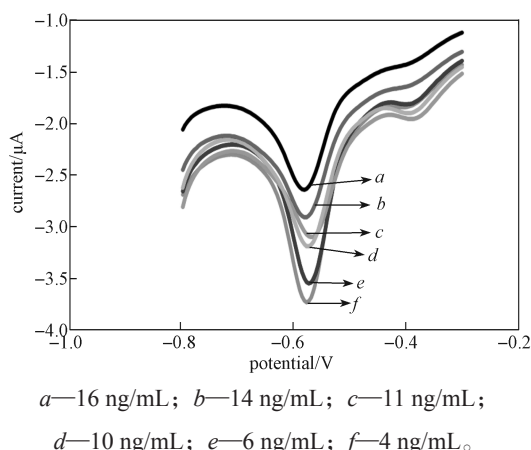


图 6 在 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.2) + 15 mmol/L OPD + 3.5 mmol/L H_2O_2 体系中，不同 CEA 浓度竞争性免疫作用下传感器的 DPV 图

Fig. 6 DPV diagram of the immunosensor under competitive immunization with different concentrations of CEA in 0.1 mol/L PBS (pH value is 7.2) + 15 mmol/L OPD + 3.5 mmol/L H_2O_2 aqueous solution

取 $4, 6, 10, 11, 14, 16\text{ ng/mL}$ CEA $2.5\text{ }\mu\text{L}$ ，混合链酶亲和素标记的 anti-CEA $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 、生物素标记的 HRP $5\text{ }\mu\text{L}$ 。取混合液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 滴加在固定有 CEA 的 GCE 上，通过竞争性免疫构建免疫传感器。

如图 6 所示，随着自由 CEA 浓度的上升，自由 CEA 同固定 CEA 竞争有限酶标 anti-CEA，使得固定 CEA 与酶标 anti-CEA 的结合量减少，从而使固定的 HRP 量减少，进而使催化效果下降，最终导致免疫传感器的 DPV 检测信号减小。经过对免疫传感器在不同 CEA 浓度下的 DPV 分析，并对免疫传感器在不同 CEA 浓度下的 DPV 电流峰值进行线性拟合 (图 7)，得到免疫传感器线性检测范围为 $4\sim 16\text{ ng/mL}$ ，检测限为 1 ng/mL ，线性相关性为 $R^2=0.9927$ 。这一结果表明，该免疫传感器线性范围好、检测限低。

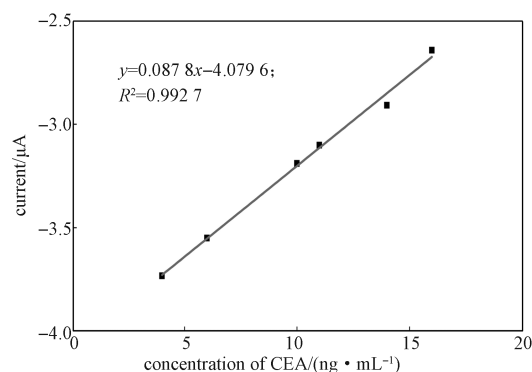


图 7 在 0.1 mol/L PBS (pH 值为 7.2) + 15 mmol/L OPD + 3.5 mmol/L H_2O_2 体系中，不同 CEA 浓度竞争性免疫作用下免疫传感器的峰电流的关系图
Fig. 7 Relation schema of the peak current of immunosensor under competitive immunization with different concentrations of CEA in 0.1 mol/L PBS (pH value is 7.2) + 15 mmol/L OPD + 3.5 mmol/L H_2O_2 aqueous solution

3.4 免疫传感器的重现性与稳定性

对完全相同的体系进行电化学检测^[25]，传感器的 CV 和 DPV 检测的偏差分别为 7% 和 6% ，可见免疫传感器的重现性良好。

将免疫传感器在 0.01 mol/L PBS (pH 值为 7.2) 中于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 温度条件下保存 15 d 后，再用 CV 以及 DPV 检测，得到传感器的 CV 和 DPV 峰值电流变化分别为 8.0% 和 7.5% ，故可知该免疫传感器的稳定性也很好。

4 结语

课题组成功构建了一种应用 AuNPs 和 HRP 两步放大法检测癌胚抗原微量浓度的免疫传感器。该传感器利用壳聚糖在分子结构上的网状结构以及

与 AuNPs 良好的结合作用, 为 AuNPs 提供良好的附着位点; 再利用 AuNPs 的高电子密度以及介电特性, 让 AuNPs 和 CEA 更高效地结合; 最后通过免疫竞争法让自由 CEA 和固定化 CEA 竞争有限的酶标 anti-CEA。HRP 标记的 anti-CEA 与固定在 AuNPs/CS 修饰玻碳电极上的 CEA 结合生成 HRP 标记的免疫复合物。该免疫传感器线性检测范围为 4~16 ng/mL, 检测限为 1 ng/mL。

参考文献:

- [1] WU J, FU Z F, YAN F, et al. Biomedical and Clinical Applications of Immunoassays and Immunosensors for Tumor Markers[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(7): 679-688.
- [2] SCHLAGETER M H, LARGHERO J, CASSINAT B, et al. Serum Carcinoembryonic Antigen, Cancer Antigen 125, Cancer Antigen 15-3, Squamous Cell Carcinoma and Tumor-Associated Trypsin Inhibitor Concentrations During Healthy[J]. *Clinical Chemistry*, 1998, 44(9): 1995-1998.
- [3] HERNÁNDEZ L, ESPASA A, FERNÁNDEZ C, et al. CEA and CA 549 in Serum and Pleural Fluid of Patients with Pleural Effusion[J]. *Lung Cancer*, 2002, 36(1): 83-89.
- [4] ENGELEN M J, BRUIJN H W D, HOLLEMA H, et al. Serum CA 125, Carcinoembryonic Antigen and CA 19-9 as Tumor Markers in Borderline Ovarian Tumors[J]. *Gynecologic Oncology*, 2000, 78(1): 16-20.
- [5] GOHRING J T, DALE P S, FAN X. Detection of HER2 Breast Cancer Biomarker Using the Opto-Fluidic Ring Resonator Biosensor[J]. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2010, 146(1): 226-230.
- [6] DAI Z, CHEN J, YAN F, et al. Electrochemical Sensor for Immunoassay of Carcinoembryonic Antigen Based on Thionine Monolayer Modified Gold Electrode [J]. *Cancer Detection and Prevention*, 2005, 29(3): 233-240.
- [7] MEKLER V M, BYSTRYAK S M. Application of o-Phenyldiamine as a Fluorogenic Substrate in Peroxidase-Medical Enzyme-Linked Immunosorbent Assay[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1992, 264(1): 359-364.
- [8] MATSUMOTO K, YUAN J, WANG G, et al. Simultaneous Determination of Alpha-Fetoprotein and Carcinoembryonic Antigen in Human Serum by Time-Resolved Fluoroimmunoassay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1999, 276(1): 81-87.
- [9] CIOFFI M, TVIETRI M, GAZZERRO P, et al. Serum Anti-P53 Antibodies in Lung Cancer: Comparison with Established Tumor Markers[J]. *Lung Cancer*, 2001, 33(2/3): 163-169.
- [10] LIN J H, YAN F, JU H X. Noncompetitive Wzzyme Immunoassay for Carcinoembryonic Antigen by Flow Injection Chemiluminescence[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2004, 341(1): 109-115.
- [11] FRENS G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions[J]. *Nature Physical Science*, 1973, 241(105): 20-22.
- [12] GRABAR K C, FREEMAN R G, HOMMER M B, et al. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers[J]. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(4): 735-743.
- [13] 刘可可, 刘媛, 东红明, 等. 纳米多孔类碳糊电极的制备工艺改进及其电化学行为 [J]. *湖南工业大学学报*, 2015, 29(6): 80-84.
LIU Keke, LIU Yuan, DONG Hongming, et al. Improvement of Nano-Porous Carbon Paste Electrode Preparation and Its Electrochemical Behavior[J]. *Journal of Hunan University of Technology*, 2015, 29(6): 80-84.
- [14] WANG Huiqiang, MA Zhanfang. Amperometric Immunoassay for the Tumor Marker Neuron-Specific Enolase Using a Glassy Carbon Electrode Modified with a Nanocomposite Consisting of Polyresorcinol and of Gold and Platinum Nanoparticles[J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(9): 3247-3253.
- [15] 何农跃, 许利剑, 杜晶晶. 玻碳电极上的自组装 APMDES 制备电化学生物传感器 [J]. *湖南工业大学学报*, 2008, 22(2): 59-62.
HE Nongyue, XU Lijian, DU Jingjing. Preparation of Electrochemical Biosensor by Self-Assembly APMDES on Glassy Carbon Electrode[J]. *Journal of Hunan University of Technology*, 2008, 22(2): 59-62.
- [16] TANG Hao. A Label-Free Electrochemical Immunoassay for Carcinoembryonic Antigen (CEA) Based on Gold Nanoparticles (AuNPs) and Nonconductive Polymer Film[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(6): 1061-1067.
- [17] SHU Huawei, WEN Wei, XIONG Huayu, et al. Novel Electrochemical Aptamer Biosensor Based on Gold Nanoparticles Signal Amplification for the Detection of Carcinoembryonic Antigen[J]. *Electrochemistry Communications*, 2013, 37(12): 15-19.
- [18] LUO X L, KILLARD A J, MORRIN A, et al. Enhancement of a Conducting Polymer-Based Biosensor Using Carbon Nanotube-Doped Polyaniline[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 575(1): 39-44.
- [19] ZHOU K F, ZHU Y H, YANG X L, et al. A Novel Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Au-Graphene-HRP-Chitosan Biocomposites[J]. *Electrochimica Acta*, 2010, 55(9): 3055-3060.

- et al. General Plan Optimization for Substation in Mountainous Areas[J]. Hubei Electric Power, 2015, 39(10): 53-55, 58.
- [3] 刘然. 变电站平面布置设计的一些优化[J]. 电气技术, 2016, 17(4): 142-145.
LIU Ran. Optimization of Substation Layout Design[J]. Electrical Engineering, 2016, 17(4): 142-145.
- [4] 胡新怡. ± 800 kV 特高压直流输电线路的塔头空气间隙和绝缘配合计算[D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
HU Xinyi. ± 800 kV Calculation of Tower Head Air Gap and Insulation Coordination of UHVDC Transmission Lines[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2014.
- [5] 杨洋, 李翔飞, 王星. 株洲茶陵城关 110 kV 变电站优化设计[J]. 湖南工业大学学报, 2016, 30(3): 37-42.
YANG Yang, LI Xiangfei, WANG Xing. Optimized Design of 110 kV Substations in Chengguan District of Chaling Country[J]. Journal of Hunan University of Technology, 2016, 30(3): 37-42.
- [6] 吕诗如, 李勇. 常宁 110 kV 新一代智能变电站优化设计[J]. 湖南工业大学学报, 2017, 31(5): 59-64.
LÜ Shiru, LI Yong. Design of an Optimized 110 kV Intelligent Substations in Changning City[J]. Journal of Hunan University of Technology, 2017, 31(5): 59-64.
- [7] 国家电网公司. 电力系统污区分级与外绝缘选择标准第 1 部分交流系统: Q/GDW1152.1—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 1-6.
State Grid Corporation of China. Pollution Classification and External Insulation Selection for Electric Power System Part 1: A. C. System: Q/GDW1152.1—2014[S]. Beijing: China Standard Press, 2014: 1-6.
- [8] 国家电网公司. 高海拔外绝缘配置技术规范: Q/GDW 13001—2014[S]. 北京: 中国电力出版社, 2014: 1-9.
State Grid Corporation of China. High Altitude Outer Insulation Configuration Specifications: Q/GDW13001—2014[S]. Beijing: China Electric Power Press, 2014: 1-9.
- [9] 中华人民共和国住房和城乡建设部, 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 交流电气装置的过电压保护和绝缘配合: GB/T 50064—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 4-53.
Ministry of Housing and Urban-Rural Construction of the People's Republic of China, State General Administration of the People's Republic of China for Quality Supervision and Inspection and Quarantine. Code for Design of Over-Voltage Protection and Insulation Coordination for AC Electrical Installations: GB/T 50064—2014[S]. Beijing: China Standard Press, 2014: 4-53.
- [10] 李三, 曹晶, 陈勇, 等. 高海拔地区 750 kV 开关站空气间隙选择研究[J]. 水电能源科学, 2009, 27(6): 206-208, 212.
LI San, CAO Jing, CHEN Yong, et al. Research on Air Gaps Selection of 750 kV Switching Station in High Altitude Area[J]. Water Resources and Power, 2009, 27(6): 206-208, 212.

(责任编辑: 廖友媛)

(上接第 31 页)

- [20] LI J, XIE H Q, LIU Y H, et al. Au-F127 Strawberry-Like Nanospheres as an Electrochemical Interface for Sensitive Detection of Carcinoembryonic Antigen in Real Sample[J]. Talanta, 2015, 144(11): 404-410.
- [21] LIN Zhenyu, ZHANG Guiyun, YANG Weiqiang, et al. CEA Fluorescence Biosensor Based on FRET Between Polymer Dots and Au Nanoparticles[J]. Chemical Communications, 2012, 48: 9918-9920.
- [22] LAI Guosong, CHENG Hui, XIN Dinghong, et al. Amplified Inhibition of the Electrochemical Signal of Ferrocene by Enzyme-Functionalized Graphene Oxide Nanoprobe for Ultrasensitive Immunoassay[J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 902(1): 189-195.
- [23] LIU Zhimin, MA Zhanfang. Fabrication of an Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for CEA Based on Conducting Long-Chain Polythiols[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 46(8): 1-7.
- [24] CAO Xia, WANG Ning, JIA Shu, et al. Bimetallic AuPt Nanochains: Synthesis and Their Application in Electro-Chemical Immunosensor for the Detection of Carcinoem-Bryonic Antigen[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 39(1): 226-230.
- [25] YANG Zhanjun, LAN Qingchun, LI Juan, et al. Efficient Streptavidin-Functionalized Nitrogen-Doped Graphene for the Development of Highly Sensitive Electrochemical Immun-Osensor[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 89(1): 312-318.

(责任编辑: 申剑)