

胶体金标记技术简介

在监测生物过程、纯化标记后的蛋白及其结合对象等都需要应用到蛋白质标记技术。高效的蛋白质标记技术能够提高检测灵敏度以及简化检测工作流程。

目前有多种蛋白质标记技术，如同位素标记、荧光标记、量子点标记、生物素标记、酶联标记等来帮助我们研究感兴趣的蛋白质的丰度、位置、相互作用、翻译后修饰、功能，乃至监测活细胞中的蛋白质运输等问题。使用金属对蛋白质进行标记，能够避免样本的自发荧光背景的干扰、无生物危害、极高的灵敏度、高通零等优势，具备极大的应用情景。随着质谱仪及质谱流式细胞技术的发展越来越迅速，发展越来越迅速，国内外对应用于该技术的金属蛋白试剂需求也越来越大，以满足高维度细胞检测的需求。

金纳米粒子能与蛋白质等生物大分子通过物理吸附作用形成稳定的生物复合物并已在诊断学、生物光学成像、靶向给药等生物医药领域广泛应用。基于纳米金颗粒的蛋白标记方法，可以把蛋白质巯基与纳米金颗粒进行耦连，可以通过对金元素的检测，实现对于被标记蛋白的检测，且方法简便、经济、实用性强、效率和可靠性较高。

技术原理

金纳米粒子与蛋白质之间的相互作用方式有物理吸附、化学共价结合和非共价特异性吸附等。

金纳米粒子与蛋白质间的**物理吸附**主要来源之一是纳米粒子表面配体与带电荷的蛋白质间发生静电吸附。金纳米粒子表面的配体可带正电荷、负电荷或不带电荷，决定了与之发生相互作用的蛋白质的种类及相互作用强度。柠檬酸、酒石酸、硫辛酸等含羧基的化合物稳定的金纳米粒子易吸附带正电荷的蛋白质，免疫球蛋白 G (IgG) 的等电点为 7，在 pH 值为 5.5 的溶液中，正电性的 IgG 可通过静电作用固定在上述金纳米粒子的表面蛋白质的正电性越强，与负电性的纳米粒子间的静电相互作用也就越强。此外，金纳米粒子还以范德华力、亲疏水作用等和蛋白质相互作用。

化学共价结合包括含有巯基的蛋白质与金纳米粒子表面形成 Au-S 键而发生化学吸附作用，或蛋白质的 N 端与金纳米粒子表面修饰的羧基分子通过碳二亚胺盐酸盐/N-羟基琥珀酰亚胺 (EDC/NHS) 进行酰胺键偶联。这种方法可提高蛋白质与金纳米粒子的亲和性，同时保留蛋白质的活性部位，减少其他分子与金纳米粒子间的非特异性吸附。

金纳米粒子与蛋白质的**非共价特异性吸附**主要是指金纳米粒子表面分子可特异性地结合蛋白质，如抗原-抗体、配体-受体、分子-分子结合蛋白等系统。硫辛酸小分子修饰的金纳

米粒子通过偶联钴化合物而特异性地连接组氨酸标记的蛋白质口。这种作用方式可以减少蛋白质与金纳米粒子间的非特异性吸附，提高纳米粒子与蛋白质的利用效率。

产品应用

通过物理吸附、化学共价结合、非共价特异性吸附等方法可以有效地将蛋白质固定在金纳米粒子的表面，进而特异性地与目标分子结合。检测方式分为三种：

金纳米粒子与目标分子作用后，引起金纳米粒子聚集使得溶液颜色发生变化，荧光淬灭或增强；

金纳米粒子先与分子 A 结合后聚集引起溶液颜色变化，当加入与分子 A 具有很强亲和力的分子 B 时，纳米粒子间的聚集消除，溶液颜色恢复；

目标蛋白发生化学反应后的产物引起金纳米粒子光学性质的变化来进行检测。

例 1：当罗丹明 B 静电吸附于金表面时，罗丹明 B 的荧光淬灭，同时罗丹明 B 可以保持金纳米粒子稳定地分散在水溶液中，溶液呈红色。乙酰胆碱酶可水解硫代乙酰胆碱生成硫代胆碱，从而与金纳米粒子形成 Au-S 键，而置换纳米粒子表面的罗丹明 B。使得罗丹明 B 恢复荧光，同时因为罗丹明 B 不再保持纳米粒子在溶液中的分散而产生聚集，溶液颜色由红色变为蓝色。

例 2：利用 CuO 纳米粒子标记的抗体，可成功地把 Cu 检测体系用于免疫检测，并可以用肉眼进行高灵敏度和高选择性的艾滋病病毒 HIV 检测。该系统是通过抗原-抗体反应，将二抗修饰的 CuO 颗粒富集于孔板。抗坏血酸将盐酸所释放的 Cu (II) 还原为 Cu (I)。Cu (I) 催化修饰在金纳米粒子表面的炔基和叠氮分子发生点击反应而使纳米粒子聚集，溶液由红色变成紫色或蓝色，从而实现 HIV 病毒的可视化检测。

金纳米粒子与蛋白质、抗体间存在多种作用方式。金纳米粒子表面等离子体共振效应引起可见光区的特征吸收及表面增强拉曼散射，常用来研究金纳米粒子与蛋白质、抗体间的标记作用。利用金纳米粒子与蛋白质的相互作用及纳米金的谱学性质，可以对疾病或环境污染进行简单、高效、低成本检测，也可用于疾病治疗。

参考文献

- [1]叶春洁, 赵玉云, 陈嵘, 等. 金纳米粒子与蛋白质的相互作用及其应用[J]. 中国科学: 化学, 2012, 42(12):1672-1682.
- [2]Mayer KM, Hafner JH. Localized surface plasmon resonance sensors. Chem Rev, 2011, 111:3828-3857.

- [3]Deka J, Paul A, Chattopadhyay A. Sensitive protein assay with distinction of conformations based on visible absorption changes of citrate-stabilized gold nanoparticles. *J Phys Chem C*, 2009, 113:6936-6947.
- [4]Lioubashevski O, Chegel VI, Patolsky F, Katz E, Willner I. Enzyme-catalyzed bio-pumping of electrons into Au-nanoparticles: A surface plasmon resonance and electrochemical Study. *J Am Chem Soc*, 2004, 126:7133-7143.
- [5]Zhou X, Xu WL, Wang Y, Kuang Q, Shi YF, Zhong LB, Zhang QQ. Fabrication of cluster/shell Fe₃O₄/Au nanoparticles and application in protein detection via a SERS method. *J Phys Chem C*, 2010, 114:19607-19613.
- [6]Zhao YY, Wang Z, Zhang W, Jiang XY. Adsorbed tween 80 is unique in its ability to improve the stability of gold nanoparticles in solutions of biomolecules. *Nanoscale*, 2010, 2:2114-2119.
- [7]Sen T, Mandal S, Haldar S, Chattopadhyay K, Patra A. Interaction of gold nanoparticle with human serum albumin(HSA) protein using surface energy transfer. *J Phys Chem C*, 2011, 115:24037-24044.
- [8]Walkey CD, Olsen JB, Guo HB, Emili A, Chan WC. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J Am Chem Soc*, 2012, 134:2139-2147.
- [9]Huang CC, Chiang CK, Lin ZH, Lee KH, Chang HT. Bioconjugated gold nanodots and nanoparticles for protein assays based on photoluminescence quenching. *Anal Chem*, 2008, 80:1497-1504.
- [10]Tan WM, Huang Y, Nan TG, Xue CG, Li ZH, Zhang QC, Wang BM. Development of protein A functionalized microcantilever immunosensors for the analyses of small molecules at parts per trillion levels. *Anal Chem*, 2010, 82:615-620.
- [11]Wengera B, Kugelbrey K, Gao H, Sierist H, Voirina G. Au-labeled antibodies to enhance the sensitivity of a refractometric immunoassay: detection of cocaine. *Biosens Bioelectron*, 2012, 34:94-99.
- [12]Li Y, Ji XT, Liu BW. Chemiluminescence aptasensor for cocaine based on double-functionalized gold nanoprobe and functionalized magnetic microbeads. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401:213-219.
- [13]Zhou Y, Wang SX, Zhang K, Jiang XY. Visual detection of copper(II) by azide- and alkyne-functionalized gold nanoparticles using click chemistry. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47:7454-7456.