

免疫纳米金催化氯金酸与盐酸羟胺反应: 共振散射光谱检测超痕量免疫球蛋白 G

蒋治良^{①②*}, 张声森^①, 梁爱惠^②, 黄思玉^①

① 广西师范大学环境与资源学院, 桂林 541004;

② 桂林工学院材料与化学工程系, 有色金属及材料加工新技术教育部重点实验室, 桂林 541004

* 联系人: E-mail: zlijang89@126.com

收稿日期: 2007-08-04; 接受日期: 2007-11-26

国家自然科学基金(批准号: 20667001)、广西科学基金(批准号: 0728213)和广西新世纪十百千人才基金项目资助

摘要 用粒径为 10 nm 的金纳米粒子标记羊抗人 IgG 抗体获得纳米金标记羊抗人 IgG 抗体(AuGIgG). 在 pH 2.27 的柠檬酸钠-盐酸缓冲溶液中, AuGIgG 对氯金酸-盐酸羟胺生成较大粒径金颗粒这一慢反应具有较强的催化作用, 该金颗粒在 796 nm 处有一个较强的共振散射峰. 在一定条件下, AuGIgG 与 IgG 发生特异性结合生成纳米金免疫复合物, 以 16000 r·min⁻¹ 速度离心分离获得未反应的 AuGIgG, 以它作催化剂催化氯金酸-盐酸羟胺反应生成较大粒径金颗粒, 用共振散射光谱做检测技术, 建立了测定 IgG 的免疫共振散射光谱新方法. 结果表明, 随着 IgG 浓度增大, 离心溶液中 AuGIgG 浓度降低, $I_{796\text{nm}}$ 线性降低, 其降低值 $\Delta I_{796\text{nm}}$ 与 IgG 浓度在 0.08~16.0 ng·mL⁻¹ 范围内呈良好线性关系, 检出限为 0.02 ng·mL⁻¹. 本法具有灵敏度高、选择性好和快速等特点, 用于定量分析人血清 IgG, 结果满意.

关键词

免疫纳米金
纳米催化
金增强
共振散射光谱法
免疫球蛋白 G

胶体金标记技术是继放射性同位素标记、免疫酶标记、免疫荧光标记后发展起来的第四大免疫标记新技术, 因具有简单、快速、准确、无污染等特点, 在免疫检测中应用广泛, 特别是利用斑点免疫金渗滤法和免疫层析法对抗原、抗体的定性检测较多^[1-3]. 近年来, 以免疫标记纳米金作晶种来放大检测信号取得了较好的结果^[4-10]. 其一, 发展了银增强方法, 并用于生化分析^[11,12]; 以扫描和电化学做检测技术的银增强方法的检出限分别为 200 pmol·L⁻¹ (~33 ng·mL⁻¹)和 1 ng·mL⁻¹ IgG^[13,14]. 其二, 为克服银增强法的不足, 建立了金增强法, 显著提高了检测灵敏度^[15-17]. 其三, 发展了铜增强电化学检测法^[18], 其检出限为 0.5 ng·mL⁻¹ 人 IgG. 但采用共振散射(RS)光

谱做检测技术的银、金、铜增强方法尚未见报道.

RS是一种简便、灵敏的分析技术, 已用于多种无机物及有机物分析^[19-22]. 近年来研究表明, 金、银纳米微粒存在共振散射效应, 已用于共振散射光谱分析, 并获得了较好的效果^[23,24], 但未见将免疫纳米金对氯金酸-盐酸羟胺的催化作用与金标记免疫反应结合测定痕量IgG的工作报道. 本文建立了一个测定超痕量IgG的高选择性的免疫纳米金催化-共振散射光谱新方法.

1 实验

1.1 主要仪器与试剂

Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国 Varian 公司);

JSM-6380LV 扫描电子显微镜(日本电子株式会社); TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); Sigma 3K3D 高速冷冻离心机(德国); SKLH 超声波反应器(上海科导超声仪器有限公司).

人 IgG(IgG)与羊抗人 IgG(GIgG) (标准品, 上海捷门生物技术合作公司); 人血清样品(桂林市一八一医院); $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠与 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸配制的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液; 聚乙二醇 6000、聚乙二醇 20000; 1.0% 柠檬酸钠; $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (国药集团化学试剂有限公司); $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (广东西陇化工厂); pH 为 1.67~3.69 柠檬酸钠-盐酸缓冲溶液. 粒径为 10, 30, 60 和 80 nm 的金纳米粒子制备参照文献[25]. 所用试剂均为分析纯, 实验用水均为亚沸高纯水.

1.2 金标免疫共振散射光谱探针的制备

1.2.1 pH 值对金标记抗体的影响

胶体金与蛋白质的结合能否成功, 取决于 pH 值. 一般在蛋白质等电点或稍偏碱性条件下二者才能有效结合 [26]. 利用共振散射光谱方法试验了不同 pH 对于胶体金标记 GIgG 的影响. 取 25.0 mL 胶体金于锥形瓶, 滴加 0.25 mL 3.0% PEG20000 作稳定剂(终浓度为 0.030%). 各取 1.0 mL 胶体金(按金计算, $57.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)于刻度试管, 用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 K_2CO_3 或 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 分别调节 pH 为 4.5~10.0, 在每支试管加入 30.0 μL (1:25) GIgG, 放置 5 min 后, 加入 0.10 mL 10% KCl, 10 min 后将溶液稀释至 3.0 mL, 然后在 550 nm 处测其共振散射值 $I_{550 \text{ nm}}$ (仪器参数: 电压设为 500 V, 狭缝设为 5.0 nm). 当 pH 小于 6.0 时, 所加的 GIgG 不能稳定胶体金, 加入聚集剂 KCl 溶液后, 金溶胶发生了聚集, $I_{550 \text{ nm}}$ 较大; 当 pH 在 6.0~7.0 之间时, $I_{550 \text{ nm}}$ 最小, 这是由于 GIgG 包裹了胶体金, KCl 溶液不能使胶体金聚集; 当 pH 大于 7.0 时, 虽然 $I_{550 \text{ nm}}$ 较小, 但金标记 GIgG 的免疫反应性较差. 本文选择 pH 值为 6.5.

1.2.2 GIgG 用量的确定

取不同量的 GIgG (10.0~60.0 μL) 分别加到 1.0 mL pH 相应调节至 6.0~7.0 的胶体金溶液中, 另取一

管不加 GIgG 为对照管. 5 min 后均加入 0.10 mL 10% KCl, 混匀后静置 2 h, 稀释到 3.0 mL, 测定各管. 结果表明, 对照管和加 GIgG 的量为 10.0~40.0 μL 的各管 $I_{550 \text{ nm}}$ 均较大, 而加入 GIgG 的量为 45.0~60.0 μL 的各管 $I_{550 \text{ nm}}$ 较小且基本维持不变, 故 45.0 μL GIgG 为稳定 1.0 mL 胶体金溶液的最低用量, 即金标记 GIgG 的最低用量. 标记 100 mL 胶体金溶液时加入 4.5 mL GIgG.

1.2.3 GIgG 的金标记

用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2CO_3 溶液、 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和精密 pH 值试纸将 100 mL 胶体金溶液的 pH 值调到 6.5. 在磁力搅拌器缓慢搅拌下, 在 5 min 内将 4.5 mL GIgG (1:25) 滴加到胶体金溶液中, 然后加入 1.67 mL 3.0% PEG-20000 作为稳定剂(其最终浓度约为 0.05%), 搅拌 15 min 后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 纳米金标羊抗人 IgG (AuGIgG) 的浓度按金计算为 $53.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

1.3 实验方法

依次移取 0.20 mL pH 7.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液, 0.60 mL $53.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AuGIgG 和一定量 IgG 溶液于刻度试管中, 充分混匀后加入 0.80 mL 30% PEG6000 和 0.10 mL 10% KCl, 用水稀释到 3.0 mL, 在超声波反应器中温育 15 min, 然后以转速 16000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心纳米金标记免疫复合溶液 30 min, 移取离心溶液备用.

依次移取 0.50 mL pH 值为 2.27 的柠檬酸钠-盐酸缓冲溶液、40.0 μL 离心溶液、0.40 mL $0.59 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAuCl_4 和 0.60 mL $8.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 于 5.0 mL 刻度试管, 然后定容到 2.5 mL 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 6 min. 取适量于石英池中, 置于 CARY ECLIPSE 荧光分光光度计上, 电压设为 500 V, 狭缝设为 2.5 nm, 同步扫描($\lambda_{\text{em}} = \lambda_{\text{ex}}$), 得到体系的共振散射光谱. 测定 796 nm 处的共振散射光强度 $I_{796 \text{ nm}}$, 不加 IgG 作空白并测定其空白值($I_{796 \text{ nm}})_b$, 计算 $\Delta I_{796 \text{ nm}} = (I_{796 \text{ nm}})_b - I_{796 \text{ nm}}$.

2 结果与讨论

GIgG 与 IgG 的反应具有较高的选择性, 两者之间存在结构和空间上的互补性及亲水性, 其作用力包括电荷引力, 范德华力, 氢键结合力, 疏水等作用力.

当IgG吸附在纳米金表面上, 纳米金表面的离子可以保护蛋白质免于因吸附过强而变性. 在适宜的pH条件下, AuGIgG与IgG发生特异性免疫反应生成纳米金标记免疫复合物, 共振散射强度增大, 可以定量分析IgG, 但检出限为 $0.78 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[127], 灵敏度不够高. 而纳米金标记免疫复合物可通过离心沉淀分离除去, 离心溶液中未反应的AuGIgG中的金纳米颗粒亦具有很大的比表面, 可作为催化剂晶种优先吸附溶液中的金络离子物种(AuCl_4^-)^[28-30], 催化氯金酸和盐酸羟胺反应, 生成平均粒径约为 260 nm的金颗粒(图 1). 随着IgG浓度越大, 生成的金标记免疫复合物越多, 离心溶液中AuGIgG减少, 催化生成的大颗粒金减少, 796 nm处的共振散射光强度线性降低. 据此, 可建立免疫金催化共振散射光谱法检测IgG的新方法(图 2).

2.1 共振散射光谱和吸收光谱

按实验方法, 取不同浓度 IgG 与纳米金标羊抗人 IgG 免疫反应后离心, 移取 40.0 μL 含有 AuGIgG 的离心溶液进行催化反应. 图 3 表明, AuGIgG 催化体系在 796 nm 处有 1 个最强的共振散射峰, 本文选择此波长定量分析 IgG. 实验结果表明, 纳米金催化体系的共振散射光谱轮廓与 AuGIgG 催化体系的共振散射光谱轮廓相似, 粒径为 10, 30, 60, 80 nm 纳米金的最大吸收峰分别为 518, 522, 529, 540 nm. 随着粒

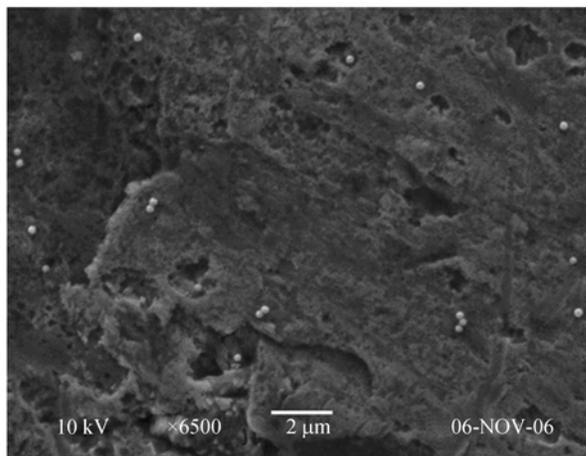


图 1 纳米金催化反应体系的扫描电镜图
 pH 2.27~8.85 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAuCl_4 -2.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_2OH -25.4 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Au ($d = 10 \text{ nm}$)

径增大, 其吸收峰红移展宽, 这与Mie理论结果一致^[31]. HAuCl_4 - NH_2OH 体系的吸收峰位于 308 nm处, 系 HAuCl_4 所致. 随着 IgG 浓度减小, 离心溶液中 AuGIgG浓度增大, 催化反应后在长波段吸光度增大, 而在 308 nm处的吸光度降低. 这是因为上层溶液中所含的未反应的标记纳米金催化 NH_2OH 还原 HAuCl_4 导致其浓度降低并生成大粒径微粒所致.

2.2 纳米金标免疫反应条件的优化

以 $4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IgG 胶体金免疫复合物离心溶液

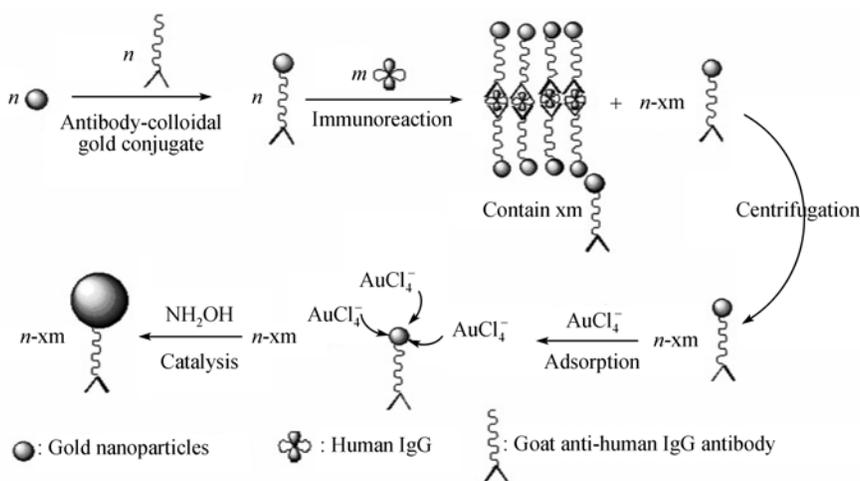


图 2 免疫纳米金催化共振散射法测定人 IgG 的原理

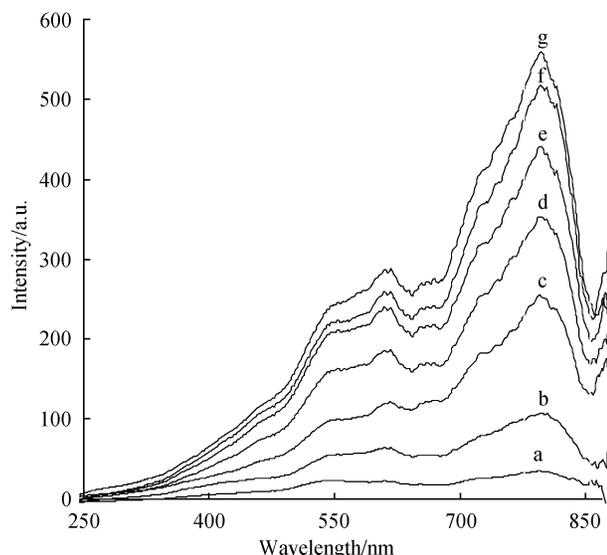


图 3 免疫纳米金催化体系的共振散射光谱

a: pH 2.97-0.094 mmol·L⁻¹ HAuCl₄-1.92 mmol·L⁻¹ NH₂OH; b: a-16.0 ng·mL⁻¹ IgG-0.172 μg·mL⁻¹ AuGIgG; c: a-8.0 ng·mL⁻¹ IgG-0.172 μg·mL⁻¹ AuGIgG; d: a-4.0 ng·mL⁻¹ IgG-0.172 μg·mL⁻¹ AuGIgG; e: a-2.0 ng·mL⁻¹ IgG-0.172 μg·mL⁻¹ AuGIgG; f: a-0.08 ng·mL⁻¹ IgG-0.172 μg·mL⁻¹ AuGIgG; g: a-0.0 ng·mL⁻¹ IgG-0.172 μg·mL⁻¹ AuGIgG

为例, 考察了 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲溶液(pH 为 6.0~7.8)及用量、AuGIgG 用量、PEG-6000 用量、超声温育时间对体系 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 的影响. 结果表明, 当体系选择 0.30 mL pH 7.0 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, 0.60 mL 53.8 μg·mL⁻¹ AuGIgG, 0.80 mL 30% PEG-6000, 超声温育时间 15 min 时, $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 有最大值.

2.3 免疫纳米金催化反应条件优化

2.3.1 离心转速及时间的选择

考察了离心转速及时间对体系 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 的影响. 离心转速在 16000~17000 r·min⁻¹ 之间, 体系的 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 较稳定, 当转速大于 17000 r·min⁻¹, $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 开始降低. 随着离心时间(0~30 min)的延长, $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 增大; 继续延长离心时间, $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 明显降低. 故本文选择 16000 r·min⁻¹ 离心 IgG-AuGIgG 免疫复合物 30 min.

2.3.2 pH 值和试剂浓度的选择

考察了柠檬酸钠-盐酸缓冲溶液的 pH 值以及用量对 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 的影响. 图 4 表明, 当 pH 值为 2.27, 免疫金催化的 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 值最大. 同时试验了缓冲溶液用量对体系的影响, 实验结果表明, 缓冲溶液用量为

0.50 mL 时对体系的 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 具有最大值.

分别考察了 HAuCl₄ 和 NH₂OH·HCl 浓度对体系 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 的影响. 当 HAuCl₄ 和 NH₂OH·HCl 浓度为 0.094 和 1.92 mmol·L⁻¹ 时, 其 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 具有最大值. 故实验选取 0.094 mmol·L⁻¹ HAuCl₄ 和 1.92 mmol·L⁻¹ NH₂OH·HCl.

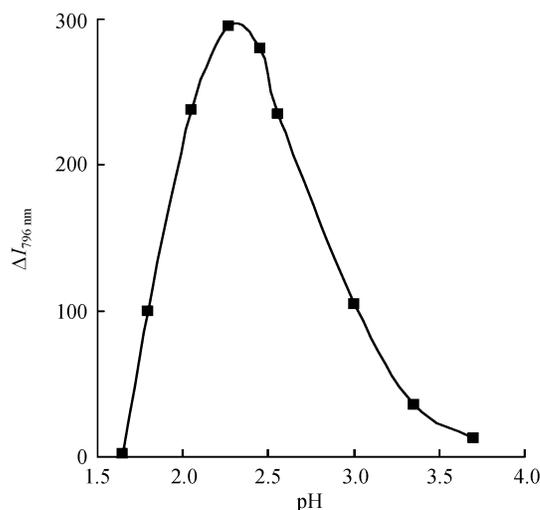


图 4 pH 值的影响

8.0 ng·mL⁻¹ IgG-0.172 μg·mL⁻¹ AuGIgG-0.094 mmol·L⁻¹ HAuCl₄-1.92 mmol·L⁻¹ NH₂OH

2.3.3 催化反应温度和时间的影响

由于本反应为催化反应, 温度对催化反应有较大的影响. 本实验考察了反应温度对 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 值的影响. 图 5 表明, 在 30℃ 恒温水浴条件下 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 值最大. 故选择 30℃. 在 30℃ 恒温水浴条件下, 催化反应 5 min 后 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 值已达到最大值且较稳定. 本实验选择 30℃ 恒温反应 6 min.

2.3.4 离心溶液用量的选择

按实验方法, 以 0.0 ng·mL⁻¹ IgG 体系的离心溶液为例, 考察了离心溶液用量对 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 的影响. 由图 6 可知, 体系 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 随离心溶液用量(0~40.0 μL)增加而线性增加. 而当离心溶液的用量大于 40.0 μL 时, 体系的 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 值增加不明显并略有下降. 故实验选择 40.0 μL 的离心溶液.

2.4 线性关系

按实验方法, 测定不同浓度 IgG(C_{IgG})对应的共

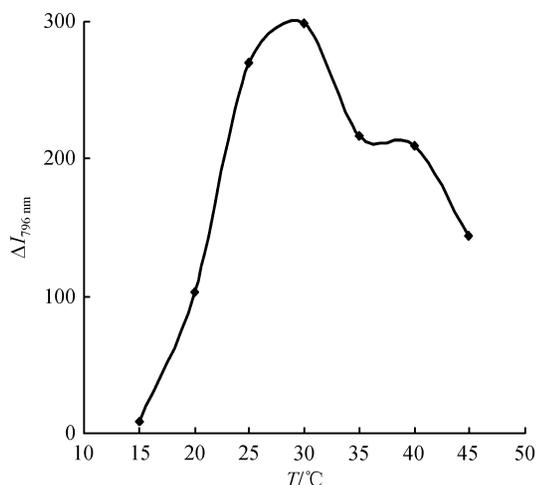


图5 反应温度对 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 的影响

pH 2.27~8.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IgG-0.172 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AuGIgG-0.094 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAuCl₄-1.92 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH₂OH

共振散射强度 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$, 以 C_{IgG} 对 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 作图, C_{IgG} 在 0.08~16.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与共振散射强度的降低值 $\Delta I_{796 \text{ nm}}$ 存在良好的线性关系. 回归方程为 $\Delta I_{796 \text{ nm}} = 25.92 C_{\text{IgG}} + 0.622$, 相关系数为 0.9937, 检出限为 0.02 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. 本法既具有共振散射光谱法简便灵敏又具有免疫反应的高特异性, 且操作简便、经济、样品用量少.

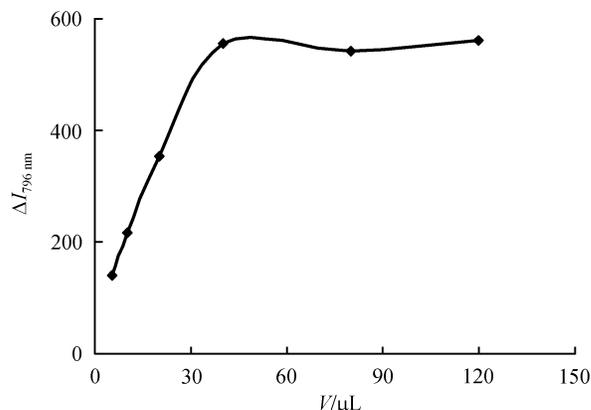


图6 离心溶液用量的影响

pH 2.27~0.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IgG-0.172 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AuGIgG-0.071 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAuCl₄-1.92 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH₂OH

2.5 共存物质的影响

按实验方法, 考察了共存物质对测定 2.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IgG 的干扰影响. 当相对误差在 $\pm 10\%$ 之间时, 2000 倍的 HSA、葡萄糖、Zn(II), 1000 倍的 IgA、L-精氨酸、 β -苯丙氨酸、Ca²⁺, 800 倍的 EDTA、L-谷氨酸、L-胱氨酸、Cu(II), 300 倍的苏氨酸、L-色氨酸、L-组氨酸、L-白氨酸, 100 倍的 L-脯氨酸、L-赖氨酸不干扰测定, 这说明本法具有较好的选择性.

表1 血清样品分析结果

样品编号	单次测得值/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	平均值/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	参考结果/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
1 [#]	11.52, 10.54, 11.20, 11.32, 9.93	10.90	6.01	11.2
2 [#]	15.28, 15.93, 16.85, 16.57, 16.17	16.16	3.75	18.4
3 [#]	4.65, 4.43, 4.82, 4.80, 4.01	4.56	6.90	4.3
4 [#]	10.09, 9.91, 10.87, 11.11, 10.37	10.47	4.86	10.7
5 [#]	16.30, 16.00, 15.41, 15.89, 15.43	15.80	2.42	16.2
6 [#]	19.65, 19.57, 19.96, 19.83, 19.48	19.70	0.99	19.2
7 [#]	21.85, 20.89, 21.70, 21.46, 21.24	21.43	1.77	20.8
8 [#]	13.87, 14.72, 13.74, 14.89, 14.04	14.25	3.64	14.4
9 [#]	5.83, 5.11, 5.54, 5.74, 5.24	5.69	5.70	5.4
10 [#]	19.22, 19.63, 20.13, 20.00, 20.07	19.81	1.93	22.3
11 [#]	25.35, 25.61, 25.91, 26.35, 25.87	25.82	1.45	24.9
12 [#]	17.93, 18.07, 18.17, 18.43, 18.24	18.17	1.03	15.5
13 [#]	23.46, 23.57, 23.74, 24.72, 23.67	23.83	2.13	24.4
14 [#]	19.22, 18.28, 19.59, 19.04, 18.37	18.90	2.96	18.5
15 [#]	8.39, 8.91, 8.72, 8.37, 7.57	8.39	6.14	8.0
16 [#]	8.24, 8.80, 8.30, 8.65, 8.07	8.41	3.63	8.9
17 [#]	12.24, 10.74, 11.50, 11.72, 11.09	11.46	5.04	13.8
18 [#]	14.98, 15.63, 16.00, 15.67, 14.78	15.41	3.32	14.9
19 [#]	14.43, 14.20, 13.41, 14.17, 13.91	14.03	2.78	14.4
20 [#]	10.26, 10.59, 10.35, 10.82, 10.09	10.48	3.38	8.7

2.6 样品分析

从医院取人血清 20 份, 用二次蒸馏水将人血清稀释 300 倍, 取稀释后的样品 10.0 μL , 按实验方法测定 IgG 的含量, 测得结果如表 1. 本法测定结果与透射比浊法测得结果基本一致. 本法的相对标准偏差 (RSD) 在 0.99%~6.90% 之间.

3 结论

本文采用共振散射光谱研究了纳米金对 $\text{HAuCl}_4\text{-NH}_2\text{OH}$ 体系中的催化作用. 在一定范围内, 纳米金

浓度与催化反应体系的共振散射强度成线性关系. 纳米金的粒径越小, 比表面积越大, 催化作用越强. 由于胶体金制备简单, 容易标记, 且标记物比放射性、酶标记物稳定. 我们用纳米金标记 GIgG 获得了 IgG 的免疫纳米金探针, 以它做催化剂, 催化 Au^{3+} 还原成 Au 单质沉积在免疫金表面, 生成形态规则、大小一致的大粒径金微粒, 致使共振散射信号急剧增大, 建立了免疫金催化共振散射光谱法检测人 IgG 的新方法. 此法灵敏、快速、经济, 为定量分析其它抗原提供了一条新途径.

参考文献

- 1 袁著革. 环境卫生纳米应用技术. 北京: 化学工业出版社, 2004. 40—24
- 2 Chu X, Fu X, Chen K, Shen GL, Yu RQ. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 1805—1812
- 3 Sun X L, Zhao X L, Tang J, Jun Z, Chu F S. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. *Int J Food Microbiol*, 2005, 99: 185—194 [\[DOI\]](#)
- 4 Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, 289: 1757—1760 [\[DOI\]](#)
- 5 Park S J, Lazarides A A, Mirkin C A, Brazis P W, Kannewurf C R, Letsinger R L. The electrical properties of gold nanoparticle assembly linked by DNA. *Angew Chem Int Ed*, 2000, 39: 3845—3848 [\[DOI\]](#)
- 6 Brown K R, Fox A P, Natan M J. Kinetic control of interparticle spacing in Au colloid-based surfaces: Rational nanometer-scale architecture. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 1148—1153 [\[DOI\]](#)
- 7 Lyon L A, Musick M D, Natan M J. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing. *Anal Chem*, 1998, 70: 5177—5183 [\[DOI\]](#)
- 8 Dansher G, Norgaard S O. Light microscopic visualization of colloidal gold on resin embedded tissue. *J Histochem. Cytochem*, 1983, 31: 394—398
- 9 Park S J, Taton T A, Mirkin C A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle. *Science*, 2002, 295: 1503—1506
- 10 Maya Z, Ronan B, Inna P, Itamar W. Biocatalytic growth of Au nanoparticles: from mechanistic aspects to biosensors design. *Nano letters*, 2005, 5: 21—25 [\[DOI\]](#)
- 11 Eliades P, Karagouni E, Stergiatou I, Miras K. A simple method for the serodiagnosis of human hydatid disease based on a protein A/colloidal dye conjugate. *J Immunol Methods*, 1998, 218: 123—132 [\[DOI\]](#)
- 12 Sumi M G, Mathai A, Sarada C, Radhakrishnan V V. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a dot immunobinding assay to detect mycobacterial antigen in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 3925—3927
- 13 Niemeyer C M, Ceyhan B. DNA-directed functionalization of colloidal gold with proteins. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40: 3685—3688 [\[DOI\]](#)
- 14 Chu X., Fu X, Chen K, Shen G L, Yu R Q. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 1805—1812 [\[DOI\]](#)
- 15 Hainfeld J F, Powell R D, Stein J K, Hacker G W, Hauser-Kronbberger C, Cheung A, Schofer C. Gold-based autometallography. In: Bailey G W, Jerome W G, Mckernan S, Mansfield J F, Price R L, eds. *Proc 57th Ann Mtg, Micros Soc Amer New York, N Y, Springer-Verlag*, 1999. 486—487
- 16 Ma Z F, Sui S F. Naked-eye sensitive detection of immunoglobulin G by enlargement of Au nanoparticles in vitro. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 2176—2179 [\[DOI\]](#)
- 17 Jagotamoy D, Md A A, Haesik Y. A Nanocatalyst-based assay for proteins: DNA-free ultrasensitive electrochemical detection using

- catalytic reduction of *p*-nitrophenol by gold-nanoparticle labels. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 16022—16023 [\[DOI\]](#)
- 18 Mao X, Jiang J H, Luo Y, Shen G L, Yu R Q. Copper-enhanced gold nanoparticle tags for electrochemical stripping detection of human IgG. *Talanta*, 2007, 73(3): 420—424 [\[DOI\]](#)
- 19 Liu S P, Luo H Q, Li N B, Liu Z F, Zheng W X. Resonance Rayleigh scattering study of the interaction of heparin with some basic diphenyl naphthylmethane dyes. *Anal Chem*, 2001, 73: 3907—3914 [\[DOI\]](#)
- 20 Wu L P, Li Y F, Huang C Z, Zhang Q. Visual detection of sudan dyes based on the plasmon resonance light scattering signals of silver nanoparticles. *Anal Chem*, 2006, 78: 5570—5577 [\[DOI\]](#)
- 21 Luo H Q, Li N B, Liu S P. Resonance Rayleigh scattering study of interaction of hyaluronic acid with ethyl violet dye and its analytical application. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21: 1186—1194 [\[DOI\]](#)
- 22 Jiang Z L, Zhou S M, Liang A H, Kang C Y, He X C. Resonance scattering effect of rhodamine dye association nanoparticles and its application to respective determination of trace ClO₂ and Cl₂. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 4286—4291 [\[DOI\]](#)
- 23 Jiang Z L, Sun S J, Liang A H, Huang W X, Qin A M. Gold-labeled nanoparticle-based immunoresonance scattering spectral assay for trace apolipoprotein AI and apolipoprotein B. *Clin Chem*, 2006, 52: 1389—1394 [\[DOI\]](#)
- 24 蒋治良, 陈媛媛, 梁爱惠, 陶慧林, 唐宁莉, 钟福新. 痕量纤维蛋白原的银纳米标记免疫共振散射光谱分析. *中国科学 B 辑: 化学*, 2006, 36: 419—424
- 25 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000: 426
- 26 孔繁德, 黄印尧, 赖清金. 免疫胶体金技术及其发展前景. *福建畜牧兽医*, 2002, 24(7): 42—45
- 27 Jiang Z L, Li Y, Sun S J, Chen B. A new nanogold-labeled immunoresonance scattering spectral probe for determination of trace IgG. *Chin J Chem*, 2007, 25: 1282—1287 [\[DOI\]](#)
- 28 Sremsdoerfer G, Perrot H, Martin J R, Cleechet P. Atuocatalytic deposition of gold and palladium onto n-GaAs in acidic media. *J Electrochem Soc*, 1988, 135: 2881—2885 [\[DOI\]](#)
- 29 朱梓华, 朱涛, 刘忠范. 大粒径单分散金纳米粒子的水相合成. *物理化学学报*, 1995, 15(11): 966—970
- 30 吴泓橙, 董守安, 董颖男, 唐春, 杨生春. 金纳米粒子的阳光光化学合成和晶种媒介生长. *高等学校化学学报*, 2007, 28(1): 10—15
- 31 van de Hulst H C. *Light Scattering by Small Particles*. John Wiley&Sons, Inc New York, 1957: 397