

生物检测用纳米金粒子还原制备方法比较

尹晋津, 许利剑, 曾晓希, 汤建新

(湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用重点实验室, 湖南 株洲 412008)

摘要: 分别采用柠檬酸钠还原法、柠檬酸钠-鞣酸还原法、抗坏血酸还原法、硼氢化钠还原法4种方法制备了粒径为十几纳米的胶体金, 并对制得的纳米胶体金粒径大小、分散度、稳定性及形貌进行了表征和比较分析。结果表明, 采用柠檬酸钠-鞣酸还原法制备胶体金纳米粒子的过程相对简单, 所得粒子平均直径约为十几纳米, 粒径分布窄, 形貌均一, 稳定性和分散性好, 满足生物标记探针的应用要求, 相对其它3种方法具有较大优势。

关键词: 胶体金; 生物标记; 柠檬酸钠-鞣酸还原法; 柠檬酸三钠还原法; 抗坏血酸还原法; 硼氢化钠还原法
中图分类号: Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-9833(2008)01-0104-05

Comparison on Reductive Preparations of Gold Nanoparticles in Biodetection

Yin Jinjin, Xu Lijian, Zeng Xiaoxi, Tang Jianxin

(Key Laboratory of Green Packaging and Application Biological Nanotechnology,
Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412008, China)

Abstract: Colloidal gold was reductively prepared by sodium citrate, sodium citrate-tannin, ascorbic acid and sodium borohydride respectively. And corresponding gold particles size, morphology, dispersion, and stability of the samples were characterized and compared. The results showed that the colloidal gold particles via sodium citrate-tannin reduction method possessed a diameter range of ca. 10 nm, and demonstrated narrow size distribution, uniform morphology, good time-dependent stability and dispersion. This colloidal gold could be used to biomarkers directly. Furthermore, this method has obvious advantages over other three above-mentioned methods.

Key words: colloidal gold; biomarkers; sodium citrate-tannin reduction; sodium citrate reduction; ascorbic acid reduction; sodium borohydride reduction

胶体金溶液是指分散相粒子直径在1~150 nm之间的纳米金粒子悬浮液, 属于多相不均匀体系, 颜色呈桔红色到紫红色。物质处于纳米级状态时会显现出一些独特的性质, 胶体金在标记探针应用方面具有其独特的优势, 可在不破坏生命物质结构和功能的前提下提供光电检测信号, 因此存在着广泛的应用前景。刘明贵等应用纳米金探针来检测 HSV-2 的目视化基因芯

片; 张磊等研制了合格的乙肝表面抗原单克隆抗体(HBsAgMab)标记的胶体金探针, 为后续研究提供了研究手段; 逢键涛等综述了基于纳米金粒子自组装聚集反应的生物监测和微阵列-金标银染检测以及纳米金粒子在电化学等领域的研究^[1-5]。此前很多科学家已经在制备方法上做了大量研究, 迄今为止, 在辐射、紫外光学及化学反应等领域已有众多制备纳米金粒子的

收稿日期: 2007-10-16

基金项目: 国家863高技术资助项目(2006AA03Z357), 中国博士后科学基金资助项目(20060390887), 湖南省教育厅基金资助项目(06C262)

作者简介: 尹晋津(1984-), 女, 天津人, 湖南工业大学硕士研究生, 主要从事生物芯片方面的研究。

方法^[6-8]。在众多的制备方法中, 最常见的是化学还原法, 其基本原理是: 向一定浓度的金离子溶液中加入一定量的还原剂, 使金离子变成金单质。目前常用的还原剂有: 白磷、乙醇、过氧化氢、硼氢化钠、抗坏血酸、枸橼酸钠、柠檬酸钠等。不同的方法可制备出不同粒径的纳米金粒子(直径: 1~500 nm), 作为免疫胶体探针的胶体金粒子的直径一般在3~30 nm之间, 而大量文献表明, 粒径在十几纳米的胶体金最适合作为生物标记^[5,10,11]。本文采用4种还原剂(柠檬酸钠、柠檬酸钠-鞣酸、抗坏血酸、硼氢化钠)分别还原氯金酸溶液, 制备纳米胶体金, 并通过紫外吸收光谱仪、纳米粒度和Zeta电位分析仪, 透射电镜等分别对制得的胶体金粒子大小、粒径分布情况、稳定性及微观形貌进行了表征和分析。

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); 激光颗粒分析仪 Zetasizer nano zs90(英国马尔文公司); TU-1901 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); JEOL-1230 透射电镜(日本电子公司); 针头过滤器、0.22 μm 的过滤膜(上海兴亚净化材料厂)。

氯金酸(上海派兰特贵金属有限公司, $W_{(\text{Au})} \geq 47.8\%$), 柠檬酸钠、鞣酸、碳酸钾、抗坏血酸、硼氢化钠(均购于天津市科欧化学试剂开发中心, 分析纯), 二次蒸馏水(自制)。

1.2 实验过程

本文的实验采取以下4种不同的方法制备粒径为10~15 nm的胶体金。

1) 柠檬酸三钠还原法^[12]

取质量分数为0.01%的氯金酸水溶液100 ml, 加热至沸腾, 搅动下准确加入质量分数为1%的柠檬酸三钠2 ml, 继续煮沸15 min, 冷却后以蒸馏水恢复到原来的体积。

2) 柠檬酸三钠-鞣酸还原法^[13]

取质量分数为1%的柠檬酸钠水溶液4 ml, 加入浓度为0.1 mol/L的碳酸钾溶液0.025 ml, 质量分数为1%的鞣酸0.1 ml, 双蒸水15.9 ml组成还原保护试剂; 取质量分数为1%的氯金酸1 ml, 双蒸水79 ml组成氯金酸水溶液; 在60 $^{\circ}\text{C}$ 、360~400 r/min搅拌速度的条件下, 将还原保护试剂加入到氯金酸水溶液中, 继续搅拌15 min, 冷却至室温。

3) 抗坏血酸还原法^[14]:

取4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的质量分数为1%的氯金酸水溶液1 ml, 浓度为0.2 mol/L的碳酸钾溶液1.5 ml, 双蒸水25 ml混匀; 在搅拌的条件下加入1 ml质量分数为0.7%的抗

坏血酸水溶液, 加双蒸水至100 ml, 加热至溶液变为透明的红色为止。

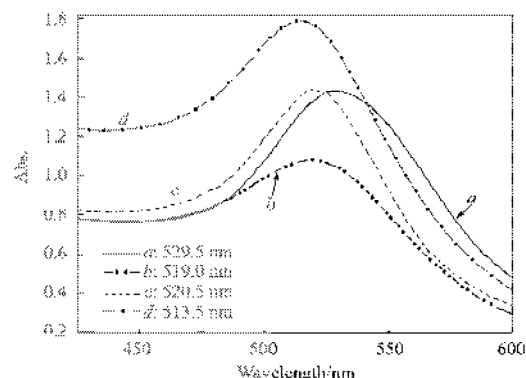
4) 硼氢化钠还原法^[15]

在4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的40 ml双蒸水中加入0.6 ml的质量分数为1%的氯金酸; 再加入浓度为0.2 mol/L的碳酸钾溶液0.2 ml; 在搅拌条件下, 迅速加入新鲜配制的硼氢化钠水溶液(质量浓度为0.5 mg/ml)0.4 ml, 重复实验时加入的量不同, 直至溶液的蓝紫色变为酒红色为止, 然后再搅拌5 min。

2 结果与表征

2.1 紫外光谱分析

紫外吸收光谱是研究胶体金的常用方法, 根据Mie理论^[16,17], 3~20 nm金微粒在520 nm左右有吸收峰。随着粒子粒径的增大, 会出现最大吸收波长红移及峰形展宽的现象。图1为不同方法制备胶体金粒子的紫外可见光图谱, 图中4条曲线在520 nm左右均出现了明显的吸收峰, 可以说明4种方法均制备出了纳米金粒子, 且符合Mie理论的相关结果。



a-为柠檬酸钠还原法; b-柠檬酸钠-鞣酸还原法;
c-抗坏血酸还原法; d-硼氢化钠还原法

图1 胶体金的紫外可见光谱图

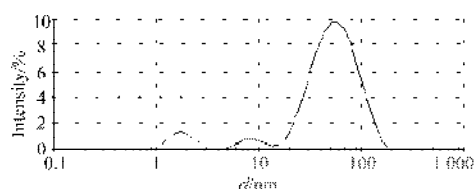
Fig. 1 The UV Vis spectrum of colloidal gold

2.2 纳米粒度分析

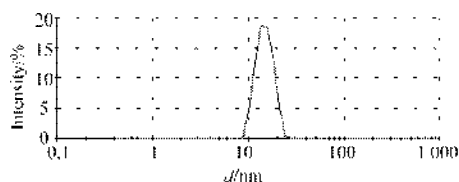
颗粒大小的主要参数是颗粒的粒度及其分布特性, 这些性质决定了颗粒加工工艺的性质和效率的高低, 是选择和评价制备方法、工艺以及进行过程控制的基本依据^[18]。颗粒的大小通常用粒径和粒度来表征。粒径是以单一的颗粒为对象表示颗粒的大小, 而粒度是以颗粒群为对象表示所有颗粒大小分布的总体概念^[19]。

图2给出了不同方法制备的纳米金粒子的纳米粒度图谱。图2中的a): 平均粒径为24.6 nm的粒子, 有86.9%分布在宽度为29.2 nm的主峰内; 图2中的b): 平均粒径为13.4 nm的粒子, 有93.6%分布在宽度为15.4 nm的主峰内; 图2中的c): 平均粒径为26.2 nm的

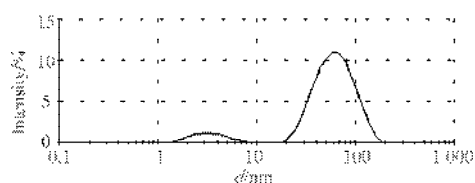
粒子,有87.2%分布在宽度为27.8 nm的主峰内;图2中的d):两峰分界不明显,平均粒径为5.71 nm的粒子,有41.4%的分布在宽度为11.8 nm的峰内;平均粒径为23.7 nm的粒子,有58.6%的分布在宽度为68 nm的峰内。结果表明,使用不同方法制备的胶体金,只有柠檬酸钠-鞣酸还原法制得的胶体金粒子的粒径分布比较集中。



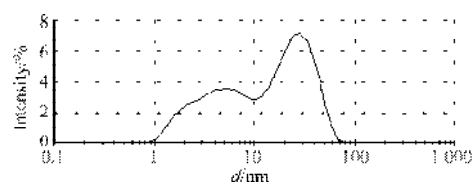
a) 柠檬酸钠还原法制得胶体金的纳米粒度图



b) 柠檬酸钠-鞣酸还原法制得胶体金的纳米粒度图



c) 抗坏血酸还原法制得胶体金的纳米粒度图



d) 硼氢化钠还原法制得胶体金的纳米粒度图

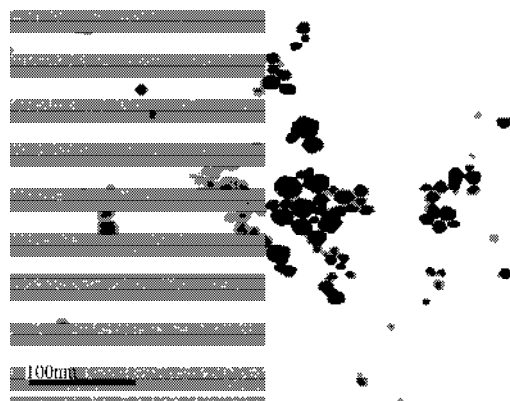
图2 胶体金的纳米粒度图谱

Fig. 2 The distribution graphs of diameter of colloidal gold

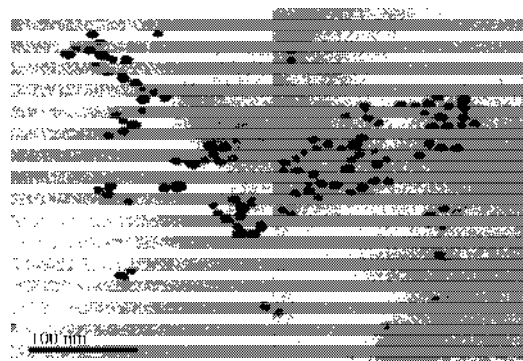
2.3 TEM分析

图3为不同方法制得的胶体金粒子的透射电镜图,测量所用溶液的浓度相同。由图3可看出,柠檬酸钠-鞣酸还原法制得的纳米胶体金粒子呈规则的球形,粒径尺寸为十几纳米,而且比较均匀,分散性较好,图3中的a)、c)、d)中粒子均出现不同程度的团聚现象,粒径尺寸不均匀,相差较大。图4为对应图3的不同方法所制得的胶体金粒子的透射电镜图的粒子统计图,图中粒径为十几纳米的粒子占了绝大部分,且b)的粒径分布较为集中。结果表明,采用柠檬酸钠-鞣酸还原法制备胶体金可以得到粒径分布较集中、粒径

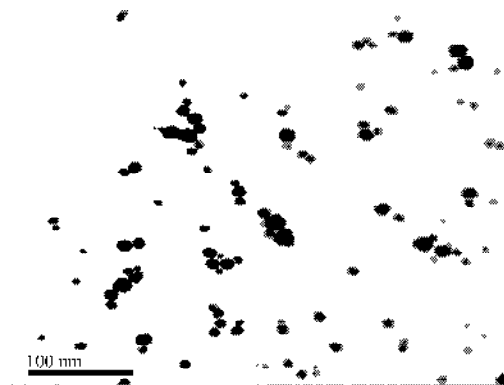
尺寸较均匀、分散性较好的胶体金。



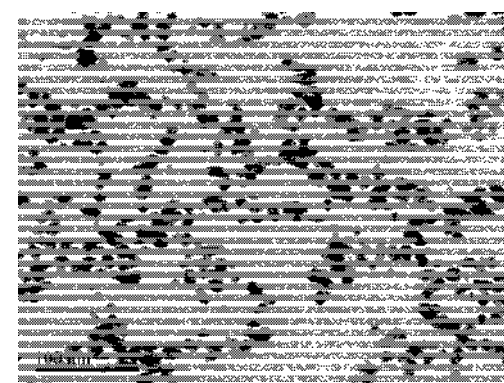
a) 柠檬酸钠还原法制得胶体金的TEM图



b) 柠檬酸钠-鞣酸还原法制得胶体金的TEM图



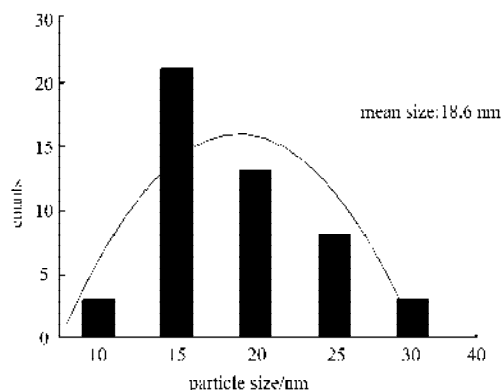
c) 抗坏血酸还原法制得胶体金的TEM图



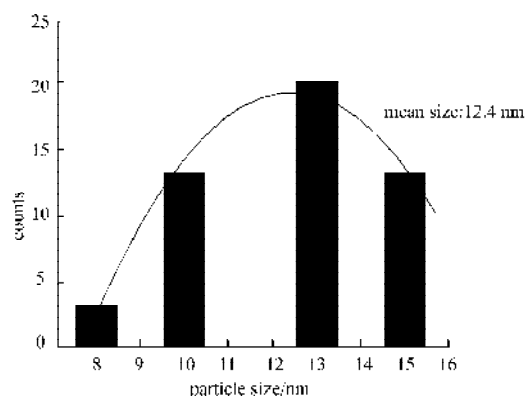
d) 硼氢化钠还原法制得胶体金的TEM图

图3 胶体金粒子的透射电镜图

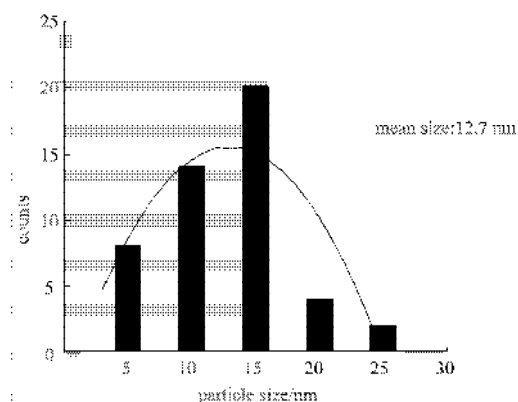
Fig. 3 The TEM graphs of colloidal gold



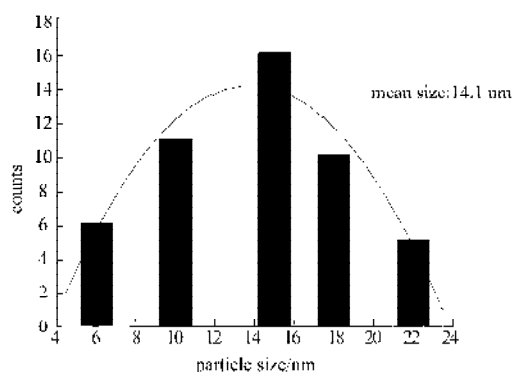
a) 柠檬酸钠还原法制得 TEM 粒子统计图



b) 柠檬酸钠-鞣酸还原法制得 TEM 粒子统计图



c) 抗坏血酸还原法制得 TEM 粒子统计图



d) 硼氢化钠还原法制得 TEM 粒子统计图

图4 胶体金粒子的透射电镜粒径统计图

Fig. 4 Statistics diagram of diameters of colloid gold in TEM

2.4 zeta 电位分析

zeta 电位在较高时 ($-85 \sim -30$ mV), 分散体系相对稳定, 即 zeta 电位的电负性越强, 电子由金属向受体转移的速率越快, 静电荷的聚集造成一个“混合”表面电位, 使氧化反应和还原反应能以相同的速率进行, 使体系处于比较稳定的状态^[20], 表1为用不同方法制备的胶体金的 zeta 电位表, 表中数据表明, 4 种方法制得的胶体金的 zeta 电位均为负值, 原始测量 zeta 电位时, 柠檬酸钠-鞣酸还原法制备的胶体金的 zeta 电位的绝对值最大, 因此比较而言由柠檬酸钠-鞣酸还原法制备胶体金的方法体系比较稳定。一个月后再分别测其 zeta 电位, 相应的均有不同程度的变化, 但由柠檬酸钠-鞣酸还原法制备胶体金的 zeta 电位的绝对值仍然最大, 说明此体系相对最为稳定。

表1 胶体金的 zeta 电位表

Table 1 The zeta potentials of colloidal gold

制备方法	zeta 电位平均测量值 /mV	
	原始值	1 个月后的值
柠檬酸三钠还原法	-37.4	-29.1
柠檬酸三钠-鞣酸还原法	-41.7	-36.5
抗坏血酸还原法	-33.6	-14.3
硼氢化钠还原法	-33.1	-30.8

3 结论

通过比较柠檬酸钠还原法、柠檬酸钠-鞣酸还原法、抗坏血酸还原法、硼氢化钠还原法制备纳米胶体金, 并对不同方法制得的纳米胶体金的粒径大小、分散度、稳定性及形貌进行表征, 发现柠檬酸钠-鞣酸还原法制备纳米胶体金粒子的过程较简单, 制得的胶体金粒子稳定性、分散性好, 粒径均匀, 适合作为检测生物物质的信号标记。

参考文献:

- [1] 刘 丽, 沈广宇, 沈国励, 等. 基于酪胺电聚合膜和纳米金自组装界面的甲状腺激素压电免疫传感器的研究[J]. 传感技术学报, 2007, 20(2): 254-257.
- [2] 刘明贵, 王业富, 隋 放, 等. 应用纳米金探针检测 HSV-2 的目视化基因芯片[J]. 中国病毒学, 2006, 21(3): 294-297.
- [3] 逢键涛, 文思远, 王升启. 金纳米颗粒聚集以及金纳米探针-微阵列技术研究进展[J]. 分析化学评述与进展, 2006, 34(6): 884-888.
- [4] 敖丽梅, 高 峰, 潘碧峰, 等. 胶体金标记免疫凝聚光度法检测癌胚抗原[J]. 上海交通大学学报, 2006, 40(8): 1448-1451.
- [5] 张 磊, 邵 晨, 邵中军, 等. HBsAg Mab 胶体金探针

- 制备与鉴定的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(1): 22-25.
- [6] Kurihara K, Kizling J, Stenius P, et al. Laser and Pulse Radiolytically Induced Colloidal Gold Formation in Water and in Water-in-Oil Microemulsions[J]. J. Am. Chem. Soc., 1983, 105(9): 2574-2579.
- [7] Wang C Y, Liu C Y, Shen T. Investigation on composite Au/TiO₂ nanoparticles (I) - Synthesis and characterization [J]. Chin. Sci. Bull., 1998, 43: 268-270.
- [8] Doron A, Katz E, Willner I. Organization of Au Colloids as Monolayer Films onto ITO Glass Surfaces: Application of the Metal Colloid Films as Base Interfaces To Construct Redox-Active Monolayers[J]. Langmuir, 1995, 11(4): 1313-1317.
- [9] 赵立凡, 李伯生, 黑笑涵, 等. 银染增强的纳米金技术检测微量核酸[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(11): 919-923.
- [10] Dykman L A, Bogatyrev V A, Khlebtsov B N, et al. A protein assay based on colloidal gold conjugates with trypsin [J]. Anal. Biochem, 2005, 341: 16-21.
- [11] Li Jishan, Wu Zhaisheng, Wang Hua, et al. A reusable capacitive immunosensor with a novel immobilization procedure based on 1,6-hexanedithiol and nano-Au self-assembled layers[J]. Sensors and Actuators B, 2005, 110: 327-334.
- [12] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution[J]. Nature Phys., 1973, 241: 20-22.
- [13] Slot J W, Geuze H J. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry[J]. Cell Biol., 1985, 90(2): 533-536.
- [14] Stathis E C, Fabrikanos A. Preparation of colloidal gold[J]. Chem. Ind., 1958, 47: 860-861.
- [15] Tschoop J, Eckhard R, Hans J. Molecular organization of C9 within the membrane attack complex of complement[J]. Fed. Proc., 1982, 156: 268-282.
- [16] Link S, Mohamed M B, El-Sayed M A. Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant[J]. Phys. Chem. B., 1999, 103(16): 3073-3077.
- [17] Link S, El-Sayed M A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles[J]. Phys. Chem. B., 1999, 103(21): 4212-4217.
- [18] 任俊, 沈健, 卢寿慈. 颗粒分散科学与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 35.
- [19] 曹茂盛, 李大勇, 荆天辅. 纳米材料学[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2002: 41.
- [20] Klabunde K J. 纳米材料化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 109-119.

(责任编辑: 廖友媛)

(上接第 94 页)

用户信息管理 管理员拥有查看用户详细信息的权限, 在用户设备出现问题时, 可以在第一时间和用户联系, 还可以进行删除和添加新用户, 添加新的管理员, 以备系统需要。

用户设备管理 管理员对用户的灯光设备进行增添、删除、管理和查看。当用户要求增加受控灯光设备时, 管理员便对新的设备进行编号, 并录入数据库, 以便控制。管理员还实时监控用户的灯光设备, 如有情况发生, 能够及时通知用户。

留言板管理 管理员查看用户对自己家中的设备的疑问或是对灯光设备的新要求, 在第一时间回复用户。这样方便管理员及时知道用户以及用户的灯光设备的问题, 有利于用户对系统有效的使用, 以及管理员对系统的维护。

4 结论

较之以前传统的监控系统, 采用基于 Web 的远程监控技术实现的灯光远程控制系统避免了种种弊端,

管理人员不必亲临现场, 远程可以对现场的设备进行监视和控制, 大大提高了劳动生产率, 充分利用了异地智力资源和物力资源^[6], 具有安全、方便的优越性。随着远程监控技术的发展, 它必将应用到更多的领域中, 也必将有更多更新的技术应用到远程监控系统中, 满足人们更多的需要。

参考文献:

- [1] 王建新, 杨世凤. 远程监控技术的发展现状和趋势[J]. 国外电子测量技术, 2005(4): 9-12.
- [2] 朱文凯, 何岭松, 丁汉, 等. 基于 Internet 的嵌入式 Web 传感器[J]. 传感器技术, 2002(8): 1-4.
- [3] 周万珍, 高鸿斌. PLC 分析与设计应用[M]. 北京: 电子工业出版社, 2004.
- [4] 周健良. 远程监控系统研究与应用[D]. 成都: 西南交通大学, 2003.
- [5] 邱萌. B/S 模式的流程工业实时信息系统和智能故障诊断的研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2003.
- [6] 朱文凯, 陶波, 何岭松, 等. 基于 Internet 的测控系统——网络化仪器[J]. 中国计量, 2004(7): 53-54.

(责任编辑: 罗立宇)