

纳米技术应用丛书

纳米材料与生物技术

杨文胜 高明远 白玉白 等编著



化学工业出版社
材料科学与工程出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

纳米材料与生物技术/杨文胜, 高明远, 白玉白等编著.
北京: 化学工业出版社, 2005. 4
(纳米技术应用丛书)
ISBN 7-5025-6860-3

I. 纳… II. ①杨…②高…③白… III. 纳米材料-应用-
生物技术 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 027637 号

纳米技术应用丛书
纳米材料与生物技术
杨文胜 高明远 白玉白 等编著
责任编辑: 高 炜
文字编辑: 焦欣渝
责任校对: 吴 静
封面设计: 于 兵

化学工业出版社 出版发行
材料科学与工程出版中心
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)
发行电话: (010) 64982530
<http://www.cip.com.cn>

新华书店北京发行所经销
北京市兴顺印刷厂印装

开本 850mm×1168mm 1/32 印张 $8\frac{3}{4}$ 彩插 4 字数 234 千字
2005 年 7 月第 1 版 2005 年 7 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-6860-3/TB·132
定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究
该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

近年来,纳米材料与纳米技术在生物医学领域的重大应用前景已经吸引了人们的广泛关注,纳米材料与生物技术的结合一方面推动了纳米材料的发展,同时也为生物技术的发展提供了新的机遇。纳米材料在生物标记、生物分子和组织的分离、重大疾病的临床检测与治疗以及缓解困扰农作物等的环境胁迫压力等诸多领域都显示出巨大的应用前景。例如蛋白组计划中的痕量蛋白提取及纯化很大程度上要依赖于纳米材料和纳米技术的发展。

本书内容共分7章。第1章介绍了纳米材料作为生物标记物在生物检测技术中的应用。纳米材料制备技术的发展为生物标记技术提供了新型的标记物,这一方面推动了生物检测技术的发展,另一方面为我们更深入地了解生命过程提供了新的手段。第2章对磁性纳米材料的制备方法、表面修饰及其在生物分子和细胞分离与检测以及在临床医学诊断和治疗中的应用进行了介绍。磁性纳米材料是目前纳米材料研究的热点之一,在生物分子与细胞的分离以及临床疾病的诊断和治疗中有广阔的应用前景。第3章对金属、磁性和荧光纳米晶在免疫层析检测技术中的应用进行了探讨。免疫层析技术是20世纪90年代发展起来的一种新型临床疾病检测技术,与目前临床使用的放射免疫及酶联免疫法相比,具有快速、准确、廉价、安全等特点,纳米材料的发展将使这一技术日趋成熟,从而改变临床疾病检测市场的格局。第4章对纳米材料在靶向药物和基因治疗中的应用进行了简要介绍。靶向药物是药物剂型未来发展的一个重要方向,而基因治疗是通过基因导入实现疾病治疗的一种新的生物医学技术。纳米材料的应用对于其发展是至关重要的。第5章介绍了纳米加工技术如 Dip-pen 技术、软印刷技术、交替膜沉积技术等生物芯片技术中的应用前景。第6章介绍了对于提高陆地高等植

物的抗逆性如抗高温、抗干旱、抗病虫害、抗重金属毒害等具有重要意义的硅生物矿化过程。在自然界普遍存在的生物矿化过程在生命活动中扮演着重要的角色，而对于陆地高等植物来说，除了氮、磷、钾三种必需的营养要素外，硅也是一种重要的营养元素，植物体内存在大量的硅矿化结构——硅质体，它们在缓解植物所面临的环境胁迫方面发挥着重要作用。在第 7 章中我们对纳米材料在生物技术中的应用前景进行了展望，尽管目前在这一领域还有大量的基础性问题亟待解决，但毫无疑问纳米材料和生物技术的结合将极大地推动生物医学的发展，为人类的健康和生存环境的改善提供新的机遇。

由于本书所涉及的知识面较广，作者在这一领域的知识有限，书中难免有不当和错误之处，欢迎读者批评指正。

本书第 1 章由白玉白教授编写，第 2 章由高明远研究员编写，第 3 章和第 6 章由杨文胜教授编写，第 4 章由纪小会博士与王刚博士编写，第 5 章由庄家骐博士和白玉白教授编写，第 7 章由杨文胜教授和庄家骐博士编写。另外，美国 Arkansas 大学的 X. Peng 教授、云南大学单克隆抗体研究中心的马岚博士、华中农业大学植物营养学系的王荔军博士、吉林大学化学学院的魏莉博士、王连英博士、王美佳博士以及江林、马玉丹、陆子阳等同学在本书的编写过程中提供了大量有关资料并给予了大力支持，使本书能够顺利完成，在此对他们表示衷心的感谢。

作者

2005 年 6 月于长春

目 录

第 1 章 纳米材料在生物检测中的应用	1
1.1 生物标记技术	3
1.1.1 生物标记和标记物	3
1.1.2 免疫生物标记	5
1.1.3 纳米粒子和生物标记	7
1.2 免疫金纳米粒子细胞染色	8
1.3 金属纳米晶在核酸检测中的应用	12
1.3.1 光学比色分析	12
1.3.2 表面等离子体共振检测	17
1.3.3 表面增强拉曼散射检测	19
1.3.4 其他的光学检测方法	20
1.3.5 电学检测法	21
1.4 荧光量子点标记物	25
1.4.1 新型荧光标记物	25
1.4.2 荧光纳米晶的合成	28
1.4.3 荧光纳米晶的表面修饰	34
1.5 荧光量子点标记物在生物成像中的应用	39
1.6 量子点生物条码	47
参考文献	49
第 2 章 磁性纳米材料及其在生物医学中的应用	53
2.1 磁性纳米材料的制备	53
2.1.1 共沉淀法	56
2.1.2 高温分解法	58
2.1.3 微乳液和反相胶束法	61
2.1.4 超声化学法	63
2.2 磁性纳米粒子的表面修饰	64
2.2.1 有机小分子修饰	65
2.2.2 有机高分子修饰	66

2.2.3	粒子表面 SiO ₂ 修饰	74
2.2.4	非 SiO ₂ 类无机材料修饰	76
2.3	磁性纳米粒子在生物分离中的应用	80
2.3.1	磁分离方法的基本原理	80
2.3.2	细胞分离	81
2.3.3	蛋白质、DNA 的分离与检测	83
2.3.4	生物酶的磁偶联与磁分离	91
2.3.5	细菌和病毒的磁分离与磁检测	93
2.4	磁性纳米粒子在临床诊断和治疗中的应用	94
2.4.1	超顺磁性纳米粒子在磁共振成像中的应用	94
2.4.2	磁流体致（过）热治疗肿瘤	103
	参考文献	112
第3章	纳米材料在免疫层析检测技术中的应用	119
3.1	免疫层析技术	119
3.1.1	层析技术	120
3.1.2	单克隆抗体技术	123
3.2	金标免疫层析试纸	126
3.2.1	金纳米晶的制备	129
3.2.2	免疫金纳米晶的制备	130
3.2.3	金标免疫层析试纸的制备	131
3.3	新型纳米晶标记的免疫层析技术	135
3.3.1	新型金标免疫层析试纸的研制	136
3.3.2	荧光纳米晶标记的免疫层析试纸	140
3.3.3	磁性纳米晶标记的免疫层析试纸	147
	参考文献	151
第4章	纳米材料在靶向药物和基因治疗中的应用	154
4.1	纳米药物和基因载体	154
4.2	纳米材料在靶向药物输运中的作用	156
4.2.1	靶向药物	156
4.2.2	纳米靶向药物	157
4.2.3	磁性纳米粒子在磁导向药物上的应用	160
4.3	纳米载体在基因治疗中的作用	164
4.3.1	基因治疗	164
4.3.2	纳米材料在基因治疗中的应用	166

参考文献	177
第 5 章 纳米加工技术在生物检测中的应用	180
5.1 生物芯片技术	181
5.1.1 DNA 探针阵列型生物芯片	182
5.1.2 毛细管电泳型生物芯片	184
5.2 软刻蚀技术	185
5.2.1 自组装单层膜	185
5.2.2 接触印刷、复制模塑和压印	187
5.2.3 弹性印章和模具	187
5.2.4 软刻蚀技术	188
5.3 DPN 技术及其在生物检测中的应用	195
5.3.1 DPN 技术的原理和研究进展	195
5.3.2 DPN 技术在生物检测上的应用	200
5.4 交替沉积膜技术	206
5.4.1 交替沉积技术	207
5.4.2 交替沉积多层膜组装过程的监测	209
5.4.3 表面图案化	212
5.4.4 复合材料交替沉积多层膜	213
参考文献	215
第 6 章 生物体系中的 SiO ₂ 纳米结构矿化	219
6.1 生物矿化	219
6.2 硅化学和硅的矿化	222
6.2.1 硅化学	222
6.2.2 硅的矿化	224
6.3 海洋低等植物中的硅矿化	224
6.3.1 单细胞生物硅藻的硅矿化	224
6.3.2 海绵的硅矿化	230
6.4 陆地高等植物中的硅矿化	234
6.4.1 水稻中硅质体的分类	237
6.4.2 水稻中硅质体的提取及结构研究	239
6.4.3 水稻叶外表皮 SiO ₂ 生长和微结构发育	251
6.4.4 植物种类对硅质体形态的影响	252
6.5 生物矿化结构对高等植物抗逆性的影响	254
6.5.1 纳米结构 SiO ₂ 对植物抗重金属毒害的影响	254

6. 5. 2	SiO ₂ 对植物真菌病害的抑制作用	255
6. 5. 3	纳米结构 SiO ₂ 对植物耐高温胁迫的影响	256
参考文献		259
第 7 章 纳米材料在生物技术中的应用前景展望		264

第 1 章 纳米材料在生物检测中的应用

纳米技术是指在纳米水平上对原子或分子进行操作并控制其构造，从而发现物质的新性质，进而开发其新功能的技术。从这个角度看，纳米材料的开发及应用无疑在纳米科技中处于核心地位。人们希望借助纳米材料的优异性质来解决信息、环境、生命科学等领域内目前其他方法还无法解决的问题。在纳米技术发展过程中，纳米材料在信息技术领域的应用始终是研究的热点，科学家希望利用纳米技术构建体积更小、运算速度更快的芯片。近几年来，纳米材料在生物医学领域的应用潜力吸引了人们的广泛关注。

一般来说，纳米材料的尺寸在 $1\sim 100\text{ nm}$ 范围内，而大多数重要的生物分子（如蛋白质、核酸等）的尺寸都处在这一尺度内（图 1-1），因此可以利用纳米材料进入生物组织内部探测生物分子的生理功能，进而在分子水平上揭示生命过程。同时，自然界中的生物体系为人们提供了具有各种功能结构的纳米机器的范例，借鉴生物学原理将纳米材料和生物分子结合进行人工分子器件、纳米传感器、纳米计算机的设计与制造，从而实现人工纳米机器的制造，无疑是实现纳米技术最终目标最可行的途径之一。

目前纳米材料在生物医药领域的应用研究已经被许多国家列为纳米科技发展的重点，除了加大基础研究的投入外，还强调利用纳米技术改造传统产业工艺和形成新兴产业，并通过具有独享性的专利技术占领国内外市场，从而在新世纪的高科技产业中占据制高点。很多传统的生物医药企业也积极参与纳米生物材料的开发，并且一些技术上比较成熟的纳米生物材料已经有商品化的产品面市。从目前的研究进展看，纳米材料在生物技术领域中的应用主要集中在以下几个方面：

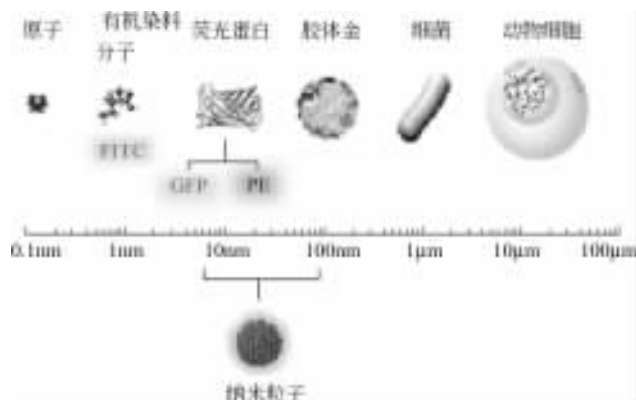


图 1-1 纳米粒子和生物分子的尺寸范围

(1) 在临床医学诊断和疾病检测中的应用 通过设计具有更高灵敏度的生物探针，例如半导体纳米晶，利用其优异的性质提高检测的灵敏度，或将其直接插入活细胞内进行探测，获取活细胞内功能状态的动态信息，为临床疾病的诊断和治疗提供更可靠的依据。与传统的有机分子探针相比，纳米粒子具有独特的优势。如金纳米粒子有很强的等离子吸收峰，具有很强的显色能力；银纳米粒子有很好的拉曼增强作用，可以大幅度提高生物分子的拉曼响应；半导体纳米晶具有强的荧光且具有良好的抗光漂白能力；纳米尺寸的氧化铁在室温下显现超顺磁性等。更重要的是，通过化学合成技术，可以制备复合型的纳米粒子，将两种或多种功能集成在一个纳米粒子上，得到多功能的标记物，如同时具有荧光和磁性的磁光复合粒子。根据不同的诊断和检测目的，这种探针也可以植入人体内不同部位或随血液在体内流动，用以实时检测人体内细胞的健康状态和病变的信息。

(2) 在分子水平上研究和理解病变的机理 由于人类基因序列图谱的绘制工作已经完成，对人体本身的认识将可望达到分子的水平，并在细胞的分子结构和分子的基因水平上真正认识和理解病变的机理，从而为疾病的防治提供理论基础。通过纳米加工可以大幅

度提高生物芯片的密度，降低制造成本，并且可以进一步实现多功能复合，将整个的分析过程集成在微小的芯片上，从而便于人们更全面地从分子水平上认识生命过程。

(3) 实现可定向输送和释放的靶向性药物 分子生物学的研究使得人们对疾病的发生机理有了更清晰的认识，并在此基础上研制出各种特效药物。但如何将这些特效药物定向地输送到病变部位，控制其释放方式达到药物作用的最大化，减少药物的副作用，仍是一个难题。纳米材料的出现为药物输送提供了一个理想的载体，利用高分子材料制造的纳米囊泡可以携带药物在人体组织内外自由出入，通过与磁性纳米粒子偶联可以更好地控制其在人体内的运输，进一步与生物免疫识别技术结合就可以实现药物的定向输送。

1.1 生物标记技术

生物标记技术，或称为生物示踪，是分子生物学中最常用也是最重要的技术之一。利用生物标记技术，可以为人们提供待测生物分子在生物体内或生物体外的存在、表达、分布等各种信息，这对于生物个体中的物质代谢过程的研究具有重要意义。利用生物标记技术还可以揭示生物体内和细胞内生理过程的奥秘，理解生命活动的物质基础，如蛋白质的生物合成，核酸的结构、表达、分布和代谢，基因的活性表达等一些生物学中的根本问题。生物标记技术和显微成像技术的结合使人们对生物器官、组织、细胞的精细结构有了更深刻的认识，极大地促进了医学研究从宏观向微观的转化。

1.1.1 生物标记和标记物

生物标记技术的原理是将具有标志性信号的材料，如不同颜色的染料分子、能发射强荧光的分子、具有磁性或放射性的分子等，通过化学键或非共价键和待识别的生物组织连接起来，从而直观地观察和分析被标记物的存在和变化。针对不同的标记物需要采用不

同的检测方法去读取标记物的检测信号。

按照检测信号的不同，目前通用的标记物可以分成放射性标记物、显色标记物、酶标记物、荧光标记物等。表 1-1 给出了一些常见的标记物及其检测方法。放射性标记物的应用最早，并且发展较成熟，它的原理是将分子中的元素用具有放射性的同位素来替换，通过放射性信号的检测达到检测目的。这种方法检测灵敏度很高，可以达到 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ mol/L，是目前具有权威性的一种分析方法，但存在放射性污染的问题。酶标法是通过酶催化底物的显色反应来达到检测目的，操作安全简便，在一些疾病的临床检测中得到广泛应用。显色标记物如金纳米粒子和彩色乳胶粒子等具有肉眼可以分辨的颜色，标记后目测或利用光学显微镜即可观察，测试方法简便，在细胞或组织染色和一些临床定性检测中应用较广。荧光标记物是目前最受人们关注的一类标记材料，这是由于荧光标记的应用范围广，它既可以用于分子的定量检测，又能用于细胞和组织的成像研究，同时还具有操作简便、结果直观、无生物毒害等优点。荧光标记物研究的核心是寻找灵敏度高、稳定性好的荧光物质，目前常用的有机染料分子虽然荧光强度高，但其光稳定性较差，同时和生物分子的背景荧光难以区分，导致灵敏度下降。绿色荧光蛋白是近年来出现的一种新型荧光标记物，它具有优于普通有机染料的发光特性，它的应用是目前生物成像技术研究的热点之一。

表 1-1 常见标记物及其检测方法^[1]

标记物	检测方法	标记物	检测方法
⁵⁷ Co	固体闪烁计数器	香豆素衍生物	荧光分析
¹²⁵ I	固体闪烁计数器	藻胆蛋白	荧光分析
辣根过氧化物酶	显色	Eu ³⁺ 螯合剂	时间分辨荧光
碱性磷酸酯酶	显色	Sm ³⁺	时间分辨荧光
β-乳糖苷酶蜂毒素	显色	Tb ³⁺	时间分辨荧光
FAD 辅基	显色	Au 粒子	显色目测
荧光素	荧光分析	乳胶粒子	显色目测
罗丹明衍生物	荧光分析		

1.1.2 免疫生物标记

除选择合适的标记物外，标记的实现还需通过在标记物和目标分子间建立适当的偶联方式，使标记物能够牢固与被标记生物成分结合成一体，同时避免与体系内其他组分的非特异性结合。早期的标记技术一般通过形成化学键的方法，使得标记物和具有特定官能团的生物组分偶联在一起，但具有特定官能团的生物组分数目有限，大大限制了生物标记技术的应用范围。因此需要发展一种通用的能实现标记物与生物分子特异性结合的方法。

在人和脊椎动物体内，都存在着具有免疫识别功能的组织结构，即免疫系统，包括淋巴组织、免疫活细胞和免疫活性介质，当称为“抗原”（antigen）的外源性物质入侵高等动物机体后，激活了机体免疫系统，机体就会针对性地产生称为“抗体”（antibody）的一类蛋白质。抗体能特异性的识别抗原并与之结合，这称为免疫反应。这种特异性识别的专一性可以超过酶对底物的识别水平，抗体-抗原复合物的稳定性也很好，稳定常数一般为 10^9 ，有时可以高达 10^{15} 。因此，免疫系统可以看作是一部天然的生产特异性试剂的合成机器，R. A. Lerner 认为，免疫系统能制造大约 10 亿种不同的抗体，这为人们提供了一个应有尽有、取之不竭的特异性试剂库。

免疫生物标记技术就是将生物标记技术的高度灵敏性和免疫反应的高度特异性结合在一起而发展出的一种生物检测技术。这一分析方法不仅灵敏度高、特异性强、重复性好、准确性高，而且操作简单，易于商品化和自动化。它的应用范围极其广泛，可以测定内分泌激素、蛋白质、多肽、核酸、神经递质、受体、细胞因子、细胞表面抗原、肿瘤标志物等各种生物活性物质；已经深入到生化学、生理学、病理学、药理学、酶学、病原微生物、病毒、寄生虫、免疫学、分子生物学、法医学等各个基础医学的分支；同时与临床各专科密切相关，如内分泌、血液、肿瘤、妇产科、儿科、心血管、消化、泌尿生殖、自身免疫病等，对基础医学研究和临床医学发展起到了积极的促进作用^[2~5]。

免疫生物标记技术是一类技术系列的统称，按照不同标记物可以分为放射性免疫标记、酶免疫标记、荧光免疫标记、化学发光免疫标记等，表 1-2 给出了各种免疫标记技术的概要发展史^[2]。酶免疫标记操作简便，使用成本低廉，目前在临床医学诊断中应用较多，而在生物学研究中荧光免疫标记则应用较广。如果按照反应体系的物理状态分类，又可以分为均相免疫标记分析和非均相免疫分析两类，均相免疫标记的特点是结合和未结合的抗原不需要用物理分离过程，使标记免疫分析更易于实现自动化测量，但多数均相标

表 1-2 免疫标记技术的发展史

时 间	创始人	标 志
1959 年	Yalow, Berson	胰岛素放免分析, 建立放射免疫分析 (RIA) 方法
1960 年	Ekins	竞争蛋白结合分析
1961 年	Dandliker	荧光偏振均相分析法检测青霉素
1963 年	Hunter, Green Wood	氯胺 T 法碘放射性标记
1964 年	Murphy	皮质醇竞争性蛋白结合分析
1966 年	Katt, Wide	提出固相抗体分离概念, 并用于 RIA
1968 年	Miles, Hales	建立非竞争性免疫放射分析法 (IRMA)
1968 年	Korenman	建立测定雌激素放射受体分析法 (RRA)
1968~1971 年	Addisson, Hales	建立双位点夹心法 (TRMA)
1971 年	Engvall, Vanweemen	建立测定 IgG 的酶联免疫分析法 (ELISA)
1972 年	Lcut	提出电子自旋共振均相免疫分析标记
1972 年	Ruberstein	均相酶倍增免疫分析 (EMIT) 检测药物
1975 年	Milstein, Kohler	创建 B 淋巴细胞杂交瘤技术制备单克隆抗体
1976 年	Schroeder	利用辅助因子标记实现生物发光免疫分析
1976 年	Carrico	ATP 标记抗体
1981 年	Ngot	荧光免疫分析 (FIA)
1981~1983 年	Pannagli	化学发光免疫分析 (CLIA)
1983 年	Petterson, Eskola	垂体激素时间分辨荧光免疫分析
1983 年	Soini	固相免疫分析技术扩展到小分子固相抗原
1984 年	Soini, Kojita	固相抗体用于时间分辨荧光免疫分析
1984 年	Whitehead, Thorpe	在发光免疫分析系统中引入发光增强剂荧光素
1986 年	Octell	引入亲和素-生物素体系
1989~1991 年	Paul Schaap	增强化学发光酶免疫分析法
1990 年	Causse	利用活化塑料新技术提高抗体的均一性与检测的灵敏度

记免疫分析中只能测定小分子的物质，结合的与未结合的抗原之间的差异较小，导致了检测信号变化的局限性，从而限制了该方法的应用范围。非均相标记免疫分析需要一个将结合与未结合游离的标记物分离的步骤，有时可能是一个较复杂的步骤，但这却可以有效地降低非特异结合的本底信号，从而提高检测的灵敏度。非均相标记免疫分析既适用于小分子也可用于大分子物质的测定。目前在临床诊断中广泛采用的酶联免疫分析技术（ELISA）就属于非均相分析方法。

1.1.3 纳米粒子和生物标记

免疫学的建立和计算机信号处理技术的发展，使生物标记技术成为了生物学和医学研究中不可或缺的研究手段。同时分子生物学和临床医学检测对生物标记技术也提出了更高的要求。提高检测信号的灵敏度，延长标记时间，增强多指标同时标记检测的能力，发展活体内检测的方法是生物标记技术未来发展的重要方向。例如，对癌症细胞的检测灵敏度如果能达到单细胞检出的水平，就可以大大提高癌症的早期治疗水平，从而挽救更多病人的生命；如果在细胞的生长发育过程中能实现对细胞内物质的持续标记追踪，就可以更清楚地了解生物体生长的机制，从而解释一些生命科学中的基本问题；如果可以实现对生物体系中不同组分的同时标记和检测，就可以对生物分子间的协同作用有更全面的理解。要满足这些要求，除了提高检测仪器的灵敏度和信号分析的能力外，发展新型的高性能、多功能生物标记物是至关重要的一环。

纳米粒子用于生物标记，首先要求纳米粒子通过适合的功能团实现与生物分子的偶联，表 1-3 给出了一些有关纳米粒子与生物分子偶联的方法^[24]。目前各种纳米粒子标记物的制备方法和在生物标记中的应用研究报道层出不穷。由于目前免疫标记已经成为生物标记的主流方法，纳米粒子和生物分子的偶联也大多采用这一技术。磁性纳米粒子在生物检测中的应用在第 2 章中有专题介绍，纳米粒子在免疫层析检测中的应用将在第 3 章中作详细介绍，本章中

主要介绍金属纳米粒子和半导体荧光纳米晶作为生物标记物的一些研究进展。

表 1-3 纳米粒子和生物分子的偶联

纳米晶	偶联分子	偶联官能团	生物分子
Au	柠檬酸 链霉亲和素 链霉亲和素 链霉亲和素 链霉亲和素 柠檬酸 柠檬酸 Cd ²⁺ , HS-(CH ₂) ₂ OH HS-(CH ₂)-COOH	HS—Cys	免疫球蛋白, 血清白蛋白 ^[6,7]
Au		H ₂ N—Lys	蛋白质 ^[8,9]
Au		生物素-(CH ₂) ₆	免疫球蛋白, 血清白蛋白 ^[10]
Au		生物素-(CH ₂) ₆	DNA ^[11]
Au		HS-(CH ₂) ₆	DNA ^[12,13]
Au		(HS—PO ₃ R ₂) ₅	DNA ^[14,15]
Ag		H ₂ N—Lys	血红蛋白, 免疫球蛋白 ^[16,17]
ZnS		HS—Cys	Gluthathione ^[18]
CdS		HS—Cys	对肽 ^[19]
CdS		HS-(CH ₂) ₆	DNA ^[20,21]
CdSe/ZnS		HS-(CH ₂) ₆	DNA ^[22]
CdSe/ZnS		H ₂ N—Lys	免疫球蛋白, 转铁蛋白 ^[23]

1.2 免疫金纳米粒子细胞染色

金纳米粒子是研究较早的一种纳米材料，在生物学研究中一般将其称为胶体金。它的粒子尺寸一般在 1~100 nm 之间，随粒径的变化呈现不同的颜色，有关胶体金的合成和免疫胶体金的制备将在第 3 章中作进一步的介绍。另外，由于金纳米粒子具有很高的电子密度，在电子显微镜下具有很好的衬度，因此十分适合作为电镜测试的标记物。1971 年，Faulk 和 Taylor^[25] 首先将胶体金作为标记物引入到免疫学研究中，通常称之为免疫金标记。之后，大量研究表明胶体金能够稳定而迅速地吸附蛋白质，而且蛋白质的生物活性不发生明显改变。它可以作为探针进行细胞表面和细胞内多糖、蛋白质、多肽、抗原、激素、核酸等生物大分子的精确定位，也可以用于常规的免疫诊断，进行免疫组织化学定位，因而在临床诊断及药物检测等方面得到了广泛的应用。近 10 多年来胶体金标记已经成为一种重要的免疫标记技术，电镜水平的免疫金染色（IGS）、

光镜水平的免疫金银染色（IGSS）以及肉眼水平的斑点免疫金染色技术已经成为科学研究和临床诊断的有力工具^[26]。

胶体金颗粒呈橘红色到紫红色，有利于肉眼观察，将其应用于光学显微镜下检查细胞表面抗原，具有操作步骤少、染色深浅易控制、制片稳定、呈色鲜明、结果保存时间长、试剂无毒害以及能够用于暗视野显微镜等优点。但是由于免疫金标记法要求金标抗体的浓度较高，因此光镜下染色需要较大用量。银离子增强的方法可以提高标记的灵敏度，称为免疫金银染色法（IGSS）^[27]。IGSS方法的核心就是在免疫金标记基础上增加了一个染色标记物放大的过程，使得免疫金标记的结合位点可以被观察到。它的理论基础是胶体金对于溶液中银离子的还原有催化作用，使得金属银在金表面沉积，这个过程类似于照相的显影过程。该技术的关键是控制金催化银离子还原反应的速度。IGSS在使用时常采用间接法，即先用特异性第一抗体与相应的抗原进行反应，再用胶体金标记的第二抗体与一抗结合。用这一方法增强的金标抗体可以稀释10倍后使用，经一步反应后，光镜下观察不到阳性部位胶体金所呈现的红色，而经过银显影液增强，使金粒子周围沉积大量的银，光镜下就能观察到阳性部位呈现金属银的黑褐色，检测的灵敏度得到大大提高。如图1-2所示，在测定细胞表面标志物时，是以单抗为一抗，以金纳米粒子标记的单抗为二抗，与细胞孵育，固定后，经银显影液染色和吉姆萨（Giemsa）复染，即可在光镜下观察。

胶体金也是免疫电镜技术中较为理想的免疫标记物，这是由于：①胶体金颗粒在电镜下具有很高的电子密度，大小颗粒清晰可辨，且不影响对原有超微结构的观察（图1-3）；②通过计量被检部分金颗粒，可以对被检抗原或抗体进行免疫定量研究；③采用不同直径的金标抗体进行免疫双重或多重标记染色，能在一张电镜图片上同时显示两种或多种被检测物质的组织或细胞的超微结构。

早期胶体金标记多直接采用全血清或亲和层析抗体，Romano最早发展了使用蛋白A的间接标记法^[28]。随着胶体金标记免疫球蛋白制备方法的改进，标记第二抗体、 γ -球蛋白组分和亲和层析纯