

心肌肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条的研制

贾娟娟^{1,2}, 刘一兵^{1,2}, 冯婷婷^{1,2}, 韩世泉², 侯惠仁^{1,2} (1. 原子高科股份有限公司, 北京 102413; 2. 中国原子能科学研究院, 北京 102413)

【摘要】 目的 制备人心肌肌钙蛋白 I 免疫层析试纸条, 建立一种快速检测人心肌肌钙蛋白 I 的检测方法。**方法** 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 标记肌钙蛋白 I 单克隆抗体, 喷于玻璃纤维纸上制成胶体金结合物垫。将另一株肌钙蛋白 I 单克隆抗体和抗鼠二抗分别喷于试纸条的检测线和质控线处, 组装成试纸条并进行灵敏度、特异性及临床样品测定。**结果** 该试纸条检测灵敏度为 1 $\mu\text{g/L}$, 15 min 内可判断结果; 与 C-反应蛋白、人心肌脂脂肪酸结合蛋白、肌酸激酶、人心肌肌红蛋白无交叉反应; 测定健康人血清样本 40 例, 结果均为阴性; 测定 14 例心肌梗死患者血清, 结果均为阳性, 且 T 线显色程度与发光法测定值呈正相关。**结论** 该试纸条灵敏度高、特异性强、操作简便, 结果判断直观, 可用于急性心肌梗死的早期筛查。

【关键词】 心肌肌钙蛋白 I; 单克隆抗体; 胶体金; 免疫层析法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.22.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)22-2811-03

Development of immunochromatographic strip of human cardiac troponin I JIA Juan-juan^{1,2}, LIU Yi-bing^{1,2}, FENG Ting-ting^{1,2}, HAN Shi-quan¹, HOU Hui-ren^{1,2} (1. Atomic Hi-Tech Co. Ltd, Beijing 102413; 2. China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

【Abstract】 Objective The colloidal gold immunochromatographic test strip was developed in order to establish a quick method for detecting human cardiac troponin I. **Methods** The colloidal gold was obtained by trisodium citrate reduction method. Colloidal gold particles labelled with monoclonal antibody of cardiac troponin I were used as the detector reagent and coated on some glass fiber and dried. The other monoclonal antibody of cardiac troponin I and purified anti-mouse IgG were blotted on the test line and control regions of nitrocellulose membrane, respectively. Then the strip was finished and the detection sensitivity, specificity were measured, and clinical trial was done as well. **Results** The detection sensitivity of this method was 1 $\mu\text{g/L}$ and the analysis process can be completed within 15 min. There was no cross reaction with C-reactive protein, human heart-type fatty acid-binding protein, human creatine kinase MB and myocardial myoglobin. From 40 blood serum samples of healthy people and 14 of patients with myocardial infarction, the analysis results agreed well with the clinic symptoms. **Conclusion** This method has high sensitivity and specificity. The procedure of determination is simple and quick without special equipment. It may be used for early diagnosis of AMI.

【Key words】 cardiac troponin I; monoclonal antibody; colloidal gold; immunochromatographic strip

肌钙蛋白是肌肉组织收缩的调节蛋白, 与原肌球蛋白和肌动蛋白结合构成肌原纤维的细肌丝, 参与肌肉的收缩和舒张活动。心肌肌钙蛋白是心肌细胞内结构蛋白, 由 3 种亚基组成, 包括 Ca^{2+} 结合亚基-肌钙蛋白 C (TnC)、与原肌球蛋白结合亚基-肌钙蛋白 T (cTnT) 和抑制亚基-肌钙蛋白 I (cTnI), 3 种亚基组成复合体, 在钙离子的作用下调节肌肉收缩活动^[1-2]。在心肌细胞膜完整的情况下, 肌钙蛋白不能透过细胞膜进入血液循环; 当心肌细胞因缺血、缺氧而发生坏死时, 肌钙蛋白随肌原纤维破坏而不断释放入血液。cTnI 具有高度的心肌特异性^[3-4], 是目前诊断心肌梗死高灵敏、高特异的血清学标志物^[5-6]。cTnI 的测定方法有酶联免疫分析法、化学发光法等, 检测结果准确、定量, 但需在有仪器设备的实验室进行; 胶体金免疫层析法具有操作简便、快速、可随时随地单份检测的优点, 适于快检和普及。本实验在获得人 cTnI 单克隆抗体的基础上^[7], 选用 2 株单抗建立了人 cTnI 测定的胶体金免疫层析试纸条法, 为心肌梗死患者的诊断提供了一种简便、有效的方法。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器 人 cTnI 单克隆抗体: 本实验室制备, cTnI1F6 用于标记胶体金, cTnI3A7 包被硝酸纤维素膜; 驴抗鼠

二抗: 原子高科股份有限公司; 人 cTnI 标准品: Fitzgerald 公司; 氯金酸: 国药集团化学试剂有限公司; 牛血清清蛋白 (BSA): 上海赛达生物有限公司; 玻璃纤维纸、硝酸纤维素膜、吸水纸: Millipore 公司; PVC 胶板: 上海金标生物科技有限公司; 实验所用化学试剂均为分析纯; 喷膜机, 切条机: Bio-Dot 公司; 紫外可见分光光度计: 美国 Cary50; 高速冷冻离心机: Sigma 公司; 磁力加热搅拌反应套: 山东甄城华鲁电热仪器有限公司。

1.2 胶体金的制备及鉴定^[8-9] 1 g 氯金酸溶于 100 mL 去离子水中, 配成 1% 的氯金酸溶液。取 1 mL 加入 100 mL 去离子水中, 磁力搅拌下加热至沸腾, 加入 1.5 mL 1% 的柠檬酸三钠溶液, 继续加热 20 min, 冷却后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。将制备的胶体金用紫外可见分光光度计在 400~700 nm 处进行扫描, 测定最大吸收峰。

1.3 胶体金标记抗体结合物的制备

1.3.1 胶体金标记最佳蛋白浓度的选择 取适量胶体金, 用 0.1 mol/L 的碳酸钾溶液调 pH 值至 8.0 左右。将待标记的 cTnI1F6 抗体 (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 μg) 用蒸馏水稀释至 100 μL , 加入 1 mL 已调 pH 值的胶体金, 混匀, 室温放置 20 min。每管

中加入 10% 的氯化钠溶液 100 μ L, 室温静置 2 h, 观察各管颜色变化。以未变色管蛋白浓度加 20% 为胶体金标记最佳蛋白浓度^[10]。

1.3.2 cTnI 单克隆抗体的标记及胶体金结合物垫的制备
取 100 mL 胶体金溶液, 用 0.1 mol/L 碳酸钾溶液调胶体金溶液 pH 至 8.0 左右。磁力搅拌下将适量的 cTnI 单克隆抗体 (cTnI1F6) 缓慢加入胶体金溶液中, 室温反应 10 min; 加入 10 mL 10% BSA 溶液, 室温反应 10 min。将标记好的结合物在 4 $^{\circ}$ C 以 10 000 r/min 离心 30 min, 小心吸去上清液; 沉淀用 100 mL 洗液 (含 2% BSA 的 Tris-HCl 缓冲液) 复溶, 再次离心; 弃上清液, 沉淀加入洗液复溶后, 再离心一次。沉淀用适量金稀释液 (含 0.2% BSA 的 Tris-HCl) 复溶, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。将胶体金标记物均匀涂于玻璃纤维纸上, 37 $^{\circ}$ C 烘干, 塑料袋密封, 室温保存。

1.4 试纸条的组装及结果判断 在 PVC 胶板上依次粘贴硝酸纤维素膜 (NC 膜)、上吸水纸、胶体金结合物垫、样品垫, 相互重叠约 2 mm, 试纸条结构见图 1。检测线 (T 线) 包被 cTnI3A7 抗体, 质控线 (C 线) 包被驴抗鼠二抗。组装好的试纸条裁成 4 mm 宽, 用于免疫检测。

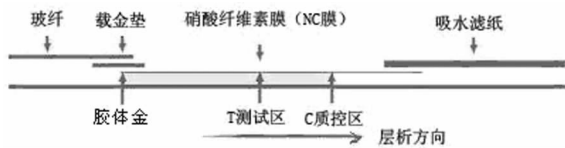


图 1 胶体金免疫层析试纸条示意图

检测时, 将样品滴加到样品垫上, 在毛细管作用下, 液体样品携带胶体金标记的 cTnI 抗体向另一端移动。如果样品中含有 cTnI, 则在移动的过程中发生抗原抗体反应形成 cTnI-cTnI 抗体-胶体金复合物; 当移动到 T 线时, 与包被抗体结合形成标记抗体-抗原-包被抗体复合物而被截留, 使 T 线显色; 剩余的胶体金标记抗体继续向前移动, 到达 C 线时, 被抗鼠二抗截留而使 C 线显色。结果判断如图 2 所示, cTnI 阳性的样品形成 T 线和 C 线 2 条显色带, cTnI 阴性样品只形成 C 线一条显色带, C 线不显色结果无效。

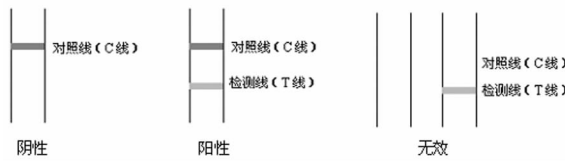


图 2 结果判断

1.5 胶体金标记物复溶体积的选择 胶体金标记物高速离心后, 按标记前胶体金体积的 1/2、1/5、1/10、1/15 进行复溶, 分别制备胶体金结合物垫, 与喷涂有抗体的 NC 膜组装成试纸条, 检测不同浓度的 cTnI 标准品, 观察胶体金浓度变化对试纸条测试结果的影响。

1.6 NC 膜上 T 线抗体包被浓度的选择 固定 C 线处二抗浓度用 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液将 cTnI3A7 抗体分别稀释至 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 喷于 NC 膜 T 线处, 2 线相距 4 mm。喷涂有抗体的 NC 膜与其他材料组装成试纸条, 检测不同浓度的 cTnI 标准品, 观察 T 线包被浓度变化对试纸条测试结果的影响。

1.7 NC 膜上 C 线二抗包被浓度的选择 固定 T 线处抗体浓度、C 线处二抗浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L。喷涂有抗

体的 NC 膜与其他材料组装成试纸条, 检测不同浓度的 cTnI 标准品, 观察二抗浓度变化对试纸条测试结果的影响。

1.8 cTnI 免疫层析试纸条方法学鉴定

1.8.1 灵敏度 将不同浓度的 cTnI 样品取 100 μ L 滴加到样品垫上, 观察 15 min, 出现阳性结果的最低 cTnI 浓度即其检测灵敏度。

1.8.2 特异性 将已知含量的肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、人人心肌肌红蛋白 (Myo)、人人心肌脂肪酸结合蛋白 (h-FABP)、C-反应蛋白 (CRP) 分别加入健康人血清中, 配制成一定浓度的样品, 取 100 μ L 滴加到 cTnI 胶体金免疫层析试纸条的样品垫上, 观察测试结果。

1.8.3 稳定性 将试纸条存于密封袋内, 分别在 37 $^{\circ}$ C 存放 2 d 和 7 d 后进行测试, 观察 37 $^{\circ}$ C 存放后测试结果的变化。

2 结果

2.1 胶体金的制备 所得胶体金溶液用紫外可见分光光度计在 400~700 nm 处扫描, 扫描图见图 3, 该胶体金溶液在 525 nm 有最大吸收峰, 峰宽较窄, 峰形左右对称, 说明金颗粒粒径均匀度较好。根据方程 $Y=0.4271X+514.56$ (X 为胶体金粒径, Y 为最大吸收峰) 计算得该胶体金粒径为 24.4 nm。

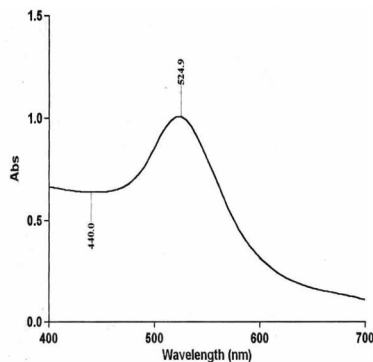


图 3 胶体金在紫外可见分光光度计 400~700 nm 波段扫描图

2.2 胶体金标记最佳蛋白浓度的选择 胶体金是一种带负电的疏水胶溶液, 由于静电作用而成为稳定的胶体状态。胶体金标记实质上是蛋白质分子被吸附到胶体金颗粒表面的过程。当加入的蛋白量不足以吸附到所有的胶体金颗粒上时, 由于盐离子效应, 加入氯化钠溶液时, 会破坏胶体金的稳定态而出现由红变蓝的聚集现象。本实验中 1 mL 胶体金溶液中抗体加入量 1~12 μ g, 静置 2 h 后观察, 结果显示当抗体量为 8 μ g 时胶体金溶液未变色, 则在其基础上加 20% 为该蛋白的最小标记量, 即 10 μ g/mL。

2.3 胶体金标记物复溶体积的选择 分别按标记前体积的 1/2、1/5、1/10、1/15 对胶体金标记物进行复溶, 然后各取 100 μ L 涂于玻璃纤维纸上, 制备胶体金结合物垫, 与包被有抗体的 NC 膜组装成试纸条, 检测 2、5、10 μ g/L 的 cTnI 标准品, 结果见图 4。由图 4 可见, 胶体金标记物复溶体积由 1/2~1/10, 随着胶体金浓度的增加, T 线与 C 线显色渐增强; 按 1/10 与 1/15 比例复溶的胶体金显色程度相当, 故选择标记物的复溶体积为标记前的 1/10。

2.4 NC 膜上 T 线抗体包被浓度的选择 NC 膜 C 线处二抗包被浓度为 1.5 g/L, T 线处 cTnI3A7 抗体包被浓度依次为 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L, 喷膜体积 1 μ L/cm。检测 1、2、5 μ g/L 的 cTnI 标准品, 结果见图 5。由图 5 可见, T 线抗体包被浓度由 0.5 g/L 增加至 1.5 g/L 时, T 线显色渐增强; 由 1.5 g/L 增

加至 2.0 g/L 显色减弱,由此说明 1.5 g/L 包被即达最佳,即确定为 T 线包被浓度。

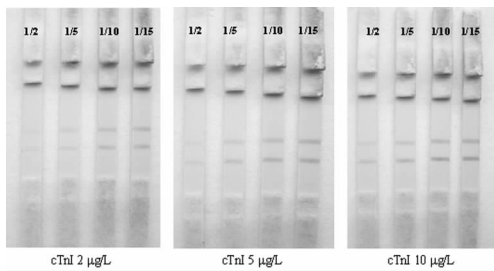


图 4 胶体金标记物复溶体积的选择

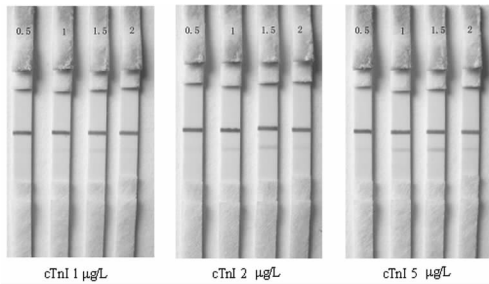


图 5 T 线抗体包被浓度选择

2.5 NC 膜上 C 线处二抗包被浓度的选择 NC 膜上 T 线处抗体包被浓度为 1.5 g/L, C 线处二抗包被浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L, 2 线相距 4 mm, 喷膜体积 1 µL/cm。检测 2、5 µg/L 的 cTnI 标准品, 结果见图 6。由图 6 可见, 二抗包被浓度达 1 g/L 后, C 线显色基本不随包被浓度的增加而变化, 由此说明 C 线处二抗包被浓度为 1 g/L 即可。

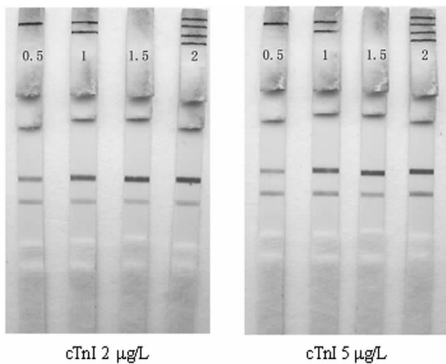


图 6 C 线处二抗包被浓度的选择

2.6 灵敏度及临床样品测定 将不同浓度的 cTnI 样品, 滴加到样品垫上, 15 min 内观察试纸条的显色情况。结果显示 1 µg/L 时, T 线可明显显色; 0.5 µg/L 时, T 线也可显色但较弱, 呈现出弱阳性; 小于 0.5 µg/L, T 线不显色, 为阴性。确定本方法灵敏度为 1 µg/L。采用本方法测定健康人血清样本 40 例, 结果均为阴性; 测定 14 例心肌梗死患者血清, 化学发光法测定值范围 1.18~27.97 µg/L, 结果均为阳性, 且 T 线显色程度与发光法测定值呈正相关。

2.7 特异性 将 60 mg/L 的 CRP、5 mg/L 的人心肌脂肪酸结合蛋白、5 mg/L 的肌酸激酶同工酶、10 mg/L 的人心肌肌红蛋白各取 100 µL 滴加到试纸条的样品垫上, 15 min 内观察, 结果均为阴性, 由此说明均无交叉反应。

2.8 稳定性 胶体金试纸条在 37 °C 密封存放 2 d 和 7 d 后, 与室温放置的试纸条同时检测 2、5、10 µg/L cTnI 标准品, 结

果见图 7。由图 7 可见, 37 °C 存放 7 d, 测定结果基本无变化, 稳定性较好。

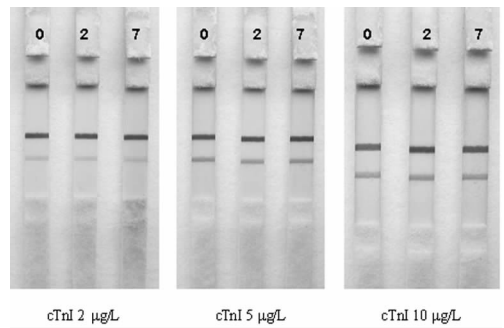


图 7 试纸条 37 °C 稳定性

3 讨论

胶体金免疫层析技术是 20 世纪 90 年代初发展起来的快速免疫标记分析技术, 主要由胶体金技术和层析法 2 个部分组成。胶体金免疫层析试纸条以硝酸纤维素膜为固相载体, 将已知的特异性物质(抗原或抗体)固定于膜上作为检测带, 胶体金标记物干燥在玻璃纤维纸的结合物垫上, 与样品垫和上吸水纸组装成试纸条。当含有被分析物的样品加到样品垫后, 通过毛细管作用向前移动, 流经含标记物的玻璃纤维纸, 使金标记物水化并发生特异性抗原-抗体结合一起向前泳动, 至检测线, 标记物与待测物的复合物被特异性截留, 通过胶体金显色, 达到检测的目的。胶体金免疫层析试纸具有简便快速的特点, 在医院急诊、社区医疗服务以及慢性病患者的自我检测中发挥了重要作用。

胶体金的制备一般采用化学还原法, 其原理是利用某些还原剂对金离子的还原作用, 使金离子还原成金原子, 进而凝集成所需直径的金颗粒。常用的方法有柠檬酸三钠法、鞣酸-柠檬酸三钠法、抗坏血酸法和硼氢化钠法, 其中柠檬酸三钠法制备的胶体金在稳定性及均一性方面均优于其他方法^[10]。胶体金粒径可通过改变还原剂的加入量来调控, 粒径大小对试纸条的灵敏度有重要影响。粒径太小, 不易产生足够的颜色信号, 导致目测效果较差; 粒径较大, 则因空间位阻问题, 导致胶体金标记物较难与特异性的蛋白结合, 导致灵敏度下降。本实验采用柠檬酸三钠法烧制了最大吸收峰分别为 520、525、530 nm 的 3 种胶体金溶液, 分别标记抗体, 制备胶体金标记物, 结果显示, 最大吸收峰在 525 nm 的胶体金, 粒径均匀度较好^[11], 分析灵敏度及稳定性均较好, 因此选择其作为本实验的标记物。

在胶体金免疫层析方法中, 抗体的选择至关重要。本实验经胶体金免疫层析法对所得 12 株 cTnI 单抗进行筛选, 确定最佳应用方式为 cTnI3A7 包被, cTnI1F6 标记胶体金, 该配对方式分析灵敏度优于经化学发光法筛选到的最优配对抗体^[7]。这可能因抗体与胶体金的结合方式为静电吸附和疏水作用相结合, 对抗体的生物活性影响较小; 另外抗体在 NC 膜与在固相聚苯乙烯板上的结合方式可能不同, 从而引起抗体构象的改变不同。

cTnI 是评价心肌梗死的首选标志物, 本文采用双抗体夹心免疫层析法制备了 cTnI 测定的胶体金免疫层析试纸条, 该试纸条无需仪器即可判断结果, 颜色深浅与 cTnI 含量呈正相关。本方法最低检测限 1 µg/L, 15 min 内可判断结果。该试纸条操作简便, 结果直观, 其推广和普及对心肌损伤患者的快速诊断具有重要意义。

常用指标主要根据 FPG 定量和尿糖及 2 h PBG,但由于它们波动较大,血糖测定又只能代表即时血糖水平,因此均为短期血糖控制监测方法^[3]。HbA1C 是红细胞中血红蛋白与葡萄糖缓慢、持续且不可逆地进行非酶促蛋白糖化反应的产物,形成 2 周后不易分开。当血液中葡萄糖浓度较高时,人体所形成的 HbA1C 含量也会相对较高。由于蛋白质浓度保持相对稳定, HbA1C 水平主要取决于葡萄糖浓度,也与蛋白质和葡萄糖接触的时间长短有关。人体内红细胞的寿命一般为 120 d,在红细胞死亡前,血液中 HbA1C 含量也会保持相对不变。因此, HbA1C 水平反映的是在检测前 120 d 的平均血糖水平,而与抽血时间、患者是否空腹、是否使用胰岛素等因素无关,是判定 DM 长期控制情况的良好指标^[4-5]。HbA1C 的测定结果以百分率表示,指的是和葡萄糖结合的血红蛋白占全部血红蛋白的比例。健康人平均 HbA1C 水平为 4.4%~6.2%。

DM 并发症的发病机制主要是 HbA1C 增多,使体内 2、3-DPG 的反应性降低,血红蛋白对氧的结合能力增强而不易释放氧,造成局部组织细胞的长期缺氧,这是产生 DM 慢性并发症的病理生理基础。由于蛋白质的非酶糖化有全身性倾向^[6],除血红蛋白外,身体其他部位的蛋白质糖化则会出现其功能的改变而引起组织或器官的病变。主要表现为 DM 肾病、视网膜、微血管等部位的慢性并发症。英国前瞻性 DM 研究也证明, HbA1C 下降 1%,任何 DM 相关的终点事件的风险将下降 12%,急性心肌梗死降低 16%,糖尿病视网膜病变降低 21%,大血管事件降低 25%,白内障摘除术降低 24%。文献分析显示, HbA1C 水平每升高 1%,心血管疾病风险也随之上升 13%~18%^[7-8]。因此,控制血糖浓度,使 HbA1C 保持在一个较低的水平,将会在一定程度上降低 DM 患者并发症的发生率。

总之, HbA1C 监测是 DM 日常管理中的一个重要环节,是监测 DM 患者多脏器(尤其是眼、肾、心脏、血管)的损害和功

能衰竭的重要指标,DM 血糖的持续监控检测和 HbA1C 的检测联合使用,将会对 DM 的诊断以及并发症的预防与控制方面都会起到一个很好的指导作用。

参考文献

- [1] 钱荣立. 关于糖尿病的新诊断标准与分型[J]. 中国糖尿病杂志, 2000, 8(1): 5.
- [2] 王克安, 李天麟, 向红丁, 等. 中国糖尿病流行特点研究-糖尿病和糖耐量低减患病率调查[J]. 中华流行病学杂志, 1998, 19(5): 282-285.
- [3] Jimeno MJ, Molist BN, Franch NJ, et al. Diagnosing type 2 diabetes: in primary care, fasting plasma glucose and glycosylated haemoglobin do the job [J]. Aten Primaria, 2004, 34(5): 222-227.
- [4] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 12 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1231-1246.
- [5] 王祖碧, 邬蜀军, 邓克林, 等. 糖化血红蛋白和血糖及血脂联合检测在 2 型糖尿病诊治中的意义[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(11): 1327, 1330.
- [6] 陈洪涛, 张红雨, 陈凯, 等. 2 型糖尿病患者糖化血红蛋白与血糖、血脂间的相关性观察[J]. 中国实用医学, 2009, 4(19): 53-54.
- [7] 邱毅, 蔡晓军, 郝铭. 2 型糖尿病患者糖化血红蛋白与血糖、血脂的相关性及意义[J]. 浙江实用医学, 2007, 12(6): 399-400.
- [8] 曾娇娥, 宁尚侠, 王景丽, 等. HbA1C 作为筛选糖尿病标准价值探讨[J]. 辽宁糖尿病杂志, 2002, 10(1): 30-31.

(收稿日期: 2012-06-21)

(上接第 2813 页)

参考文献

- [1] Takeda S, Kobayashi T, Taniguchi H, et al. Structural and functional domains of the troponin complex revealed by limited digestion[J]. Eur J Biochem, 1997, 246 (3): 611-617.
- [2] Takeda S, Yamashita A, Mameda K, et al. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form[J]. Nature, 2003, 424(6944): 35-41.
- [3] Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury[J]. CMAJ, 2005, 173(10): 1191-1202.
- [4] Bodor GS, Porter S, Landt Y, et al. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or disease adult human skeletal muscle tissue[J]. Clin Chem, 1995, 41(12 Pt 1): 1710-1715.
- [5] Apple FS, Smith SW, Pearce LA, et al. Assessment of the multiple- biomarker approach for diagnosis of myocardial infarction in patients presentation with symptoms suggestive of acute coronary syndrome[J]. Clin Chem, 2009, 55

- (1): 93-100.
- [6] Ilva T, Lund J, Porela P, et al. Early markers of myocardial injury: cTnI is enough[J]. Clin Chim Acta, 2009, 400(1-2): 82-85.
- [7] 贾娟娟, 刘一兵, 许文革, 等. 抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的制备及初步鉴定[J]. 现代免疫学, 2010, 30(6): 467-470.
- [8] Frans G. Controlled Nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. Nature, 1973, 241: 20-22.
- [9] Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance dependent optical properties of gold nanoparticles[J]. Science, 1997, 277(5329): 1078-1081.
- [10] 杨玉新, 叶阳, 周有祥, 等. 四种化学还原法制备胶体金的比较研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(3): 476-478.
- [11] 彭剑淳, 刘晓达, 丁晓萍, 等. 可见光光谱法评价胶体金粒径及分布[J]. 军事医学科学院院刊, 2000, 24(3): 211-212.

(收稿日期: 2012-06-25)