AURION 金溶胶产品信息

AURION 金溶胶基于严格定义的颗粒尺寸，分别为6、10、15或25nm。

金溶胶是单分散的，变异系数<15%，但在大多数情况下<10%。

实际批次规格（尺寸、变异和有效期）均在单独的质量控制表中注明。 AURION 金溶胶在质量控制分析日期后有一年的保质期。 产品应储存在4-8°C。 不要冷冻!

一般性说明

结合程序可以在CRC Press出版的"Immunogold Labeling in Cell Biology"（A.J. Verkley & J.L.M. Leunissen编，1989年，佛罗里达州博卡拉顿）中找到。 此外，Academic Press出版的"Colloidal Gold"（M.A. Hayat编，1989年，加利福尼亚州圣地亚哥）也是非常推荐的。

使用AURION金溶胶制备金缀合物的介绍

成功的关键因素是确定待偶联蛋白质的等电点（pI）。 该值或比该值高约0.5 pH单位的值被认为是金缀合物制备的最佳pH值。 在这些条件下，蛋白质净电荷为零或略为负。

添加到金溶胶中防止电解质溶液引起颜色变化的最低蛋白质量被认为是稳定量。

剩余的未涂层颗粒表面可以通过添加二级稳定剂来覆盖。

在金缀合物制备后，必须通过超速离心去除多余的游离蛋白质分子。

蛋白质最小保护量的确定.

蛋白质溶液在适当的pH值下（对应于pI值或高约0.5 pH单位）透析于非常稀的（约5 mM）盐溶液或缓冲液中。

如果可能的话，溶液应该透析于蒸馏水中。 免疫球蛋白最好在pH 9.0下透析于2 mM硼砂缓冲液或5 mM $NaHCO_3$中。

透析后的溶液在100,000xg下离心1小时，并测定蛋白质浓度。 蛋白质浓度应保持在1 mg/ml以下，以防止形成二聚体和寡聚体。 适量胶体金的pH值同样用0.2 N K_2CO_3或0.2 M H_3PO_4调节。

pH电极应与溶胶接触时间尽可能短，因为胶体颗粒容易堵塞电极膜。 玻璃电极可以用王水清洗。

由于凝胶填充电极的电解质流速较低，因此优于标准电极。

金溶胶的pH调节

胶体金的pH值应根据蛋白质的pI值进行调节。 pH电极应与溶胶接触时间尽可能短，以防止电极膜堵塞。

胶体金的pH值可以用0.2 N K_2CO_3或0.2 M H_3PO_4调节。

蛋白质溶液稀释

取一定量的蛋白质储备液，用透析缓冲液稀释至浓度为 0.5 mg/ml。 根据表 1，在 5 ml 塑料管中制备 10 个线性稀释液：

表 1：

试管编号	蛋白质溶液	透析缓冲液
1	100 µl	0 µl
2	90 µl	10 µl
3	80 µl	20 µl
4	70 µl	30 µl
5	60 µl	40 µl
6	50 µl	50 µl
7	40 µl	60 µl
8	30 µl	70 µl
9	20 µl	80 µl
10	10 µl	90 µl

向每个试管中加入 1 ml 已调节至所需 pH 值的溶液。 涡旋混匀，静置 2 分钟。 然后，加入 100 µl 10% NaCl 溶液，涡旋混匀，静置 5 分钟。 使用 1 ml 金溶液、100 µl 透析缓冲液和 100 µl 蒸馏水作为空白对照，在 580 nm 波长处测定吸光度 (OD)。 将测得的吸光度值绘制成浓度可变吸附等温线 (CVAI)。 曲线上渐近线接近 x 轴的点代表保护性蛋白的最小量。

金偶联物的制备和进一步纯化

使用未稀释的蛋白储备液制备所需的金偶联物。 将最少量的蛋白质储备液加入金溶胶中，静置 2 分钟。
加入辅助稳定剂以防止金颗粒表面残留自由表面积，并防止金纳米粒子偶联物聚集。 为此，可以使用牛血清白蛋白 (BSA)（调整至与结合 pH 值相同的 pH 值）。 加入的 10% BSA 溶液的量应足以达到 1% 的最终浓度。
为了去除未吸附的蛋白质、不稳定的颗粒和聚集体，必须对金缀合物进行纯化。 纯化通常通过离心进行。 根据表 2 中的数据，在 4°C 下离心金缀合物。

表 2：

粒径	离心力	时间
6 nm	45,000 x g_{av}	45 分钟
10 nm	45,000 x g_{av}	30 分钟
15 nm	12,000 x g_{av}	45 分钟 |
25 nm	12,000 x g_{av}	30 分钟 |

颗粒收集与纯化

沉淀物部分呈固体状，部分呈蓬松状。 收集蓬松部分进行后续纯化。 固体沉淀物主要由聚集体组成，因此不予回收。 未吸附的蛋白质保留在上清液中。

光学显微镜和印迹应用

对于光学显微镜和印迹应用，将蓬松颗粒重悬于含有 1% BSA 和 20 mM NaN3（pH 7.6）的 PBS 缓冲液中。
可重复离心，并再次收集蓬松颗粒。 金偶联物在使用前储存于 4°C，OD520nm 值为 1.0– 2.0。

免疫球蛋白金偶联物的制备

然而，在制备免疫球蛋白金偶联物时，建议仅进行一次离心。 这是因为反复离心容易导致免疫球蛋白金偶联物聚集。

电子显微镜应用

对于电子显微镜应用，可通过在缓冲液中进行 10– 30%
甘油或蔗糖线性梯度离心，进一步纯化样品并提高粒径均一性。
离心后，去除梯度上的上清液，收集梯度上三分之一的溶液。 如有必要，可通过透析去除甘油。
该方法的另一个优点是能够去除金缀合物的聚集体，去除梯度上清液中残留的未吸附大分子，并实现高产率制备。

梯度离心数据

表 3 总结了按粒径划分的梯度离心数据。

表 3：

粒径	离心力	时间 |
6 nm	125,000 xg_{av}	45 分钟 |
10 nm	50,000 xg_{av}	45 分钟 |
15 nm	15,000 xg_{av}	45 分钟 |
25 nm	10,000 xg_{av}	45 分钟 |

金缀合物的纯化和储存

纯化后，测定金缀合物的 $OD_{520\ nm}$ 值，并按所述方法进行调整。 金缀合物在使用前储存于 4°C。
添加甘油或蔗糖至终浓度至少为 20% 或 2M，可使金缀合物分别在液氮中冷冻并储存于 -80°C 或 -20°C（Slot 和 Geuze，《细胞生物学杂志》，90，(1981)，533），甚至有报道称可成功进行冻干（Baschong 和 Roth，《组织化学杂志》，17，(1985)，1147）。

金缀合物的评价

可通过电子显微镜和点滴试验评价金缀合物的质量。 电子显微镜可用于定量评估颗粒大小、粒径分布和团簇的存在。
金缀合物可附着于涂覆有聚赖氨酸的Formvar或Parlodion包覆的电子显微镜载网上。
为便于评估簇状结构的存在，单位表面积的颗粒密度应保持较低。
通常，含有至少75%单体且至多5%三聚体的金缀合物被认为是可接受的。
金缀合物的生物活性可通过检测其对免疫印迹技术的适用性来评估（Moeremans等，J. Immunol. Methods, 74, (1984), 353）。

金缀合物生物活性的评估

在该测试中，将浓缩的金缀合物以1:10至1:20的比例稀释，并与预先点样有相应抗原稀释系列（每点250-0.1 ng 的硝酸纤维素膜条反应。 反应后出现的红色可提供金缀合物生物活性的定量数据。
该方法也可用于测定金偶联物的稳定性。 可通过将一系列稀释的金偶联物与固定量的抗原点反应来监测工作滴度。

金偶联物的稳定性

虽然金偶联物通常相当稳定，但长期储存后可能会发生蛋白质从金颗粒表面的解吸。
建议在长期储存后检查金偶联物的性能。 如果性能下降，可能需要重复纯化，例如通过（梯度）离心。
除了可能发生的解吸外，特定蛋白质的活性也可能随时间推移而降低，因此应监测这一情况。

AURION ST-US 产品信息

AURION ST-US 基于超小原子金簇（原子数/簇 < 30，平均直径 < 0.8 nm），
这些金簇已用牛血清白蛋白片段稳定化，可以通过戊二醛交联共价结合到（宏）分子。
超小簇尺寸（和相关的试剂尺寸）保证了最佳的灵敏度和促进了渗透。 AURION ST-US
在质量控制分析日期后有一年的保质期。 产品应存放在 4-8°C。 不要冷冻！AURION ST-US
颗粒可以通过共价结合与大分子偶联。 描述了一种基于戊二醛偶联的程序。
在该过程中，由于席夫碱的形成，混合物的颜色会发生变化。

实验步骤

1. 将适量的 AURION ST-US 的 pH 调整至 8.0，使用 1M NaOH。 同样，将 10% 戊二醛溶液（最纯级别）的 pH 调整至 8.0，使用 1M NaOH。
2. 将 pH 调整后的 AURION ST-US 和调整后的戊二醛溶液等体积混合，在通风橱中于 35-40°C 下搅拌 2 小时。
3. 将混合物在 5mM $NaHCO_3$ 中透析过夜，4°C，至少更换 4 次。
4. 将待结合的特定蛋白质溶解在 5mM $NaHCO_3$ 中，浓度为 0.2mg/ml。
5. 将特定蛋白质溶液和透析后的戊二醛活化 AURION ST-US 等体积混合，4°C 下搅拌过夜。
6. 添加 1ml 2M 甘氨酸溶液，用 NaOH 将 pH 调整至 8.0，4°C 下搅拌过夜。 该处理导致剩余的游离醛基失活。

所得缀合物可以通过凝胶过滤色谱法纯化。 复合物可以通过亲和纯化进一步纯化，以分离特定的蛋白质/AURION ST-US 缀合物和未结合的 AURION ST-US。

AURION
Immuno Gold Reagents & Accessories
Custom Labelling

Binnenhaven 5
6709 PD WAGENINGEN, THE NETHERLANDS
phone: (+31)-317-415094
e-mail: info@aurion.nl
website: https://aurion.nl/