高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

血清蛋白冠对金纳米探针抗体固定策略及其抗原捕获能力的影响

石明凡，张释心，仁青央宗，吴　琼，陈芳芳
（吉林大学中日联谊医院纳米医学与转化研究中心，长春 130033）

摘要　在血清等复杂生物基质中进行检测时，纳米探针表面易形成蛋白冠层，可能遮蔽识别分子导致探针失效. 本文以金纳米粒子为载体，系统比较了3种兔抗鼠IgG固定方式：直接物理吸附、经巯基丙酸共价偶联以及通过葡萄球菌蛋白A定向固定，探索了不同抗体固定策略对抗体活性和抗干扰能力的影响. 综合运用纳米颗粒追踪分析、BCA蛋白定量及斑点印迹实验，定量评估了3种方法中单位粒子的抗体载量和抗体的可结合取向；并进一步模拟血清环境，分析了蛋白冠层对抗体暴露度的遮蔽效应及探针实际捕获目标抗原的能力. 实验结果表明，直接共孵育的物理吸附法在抗体负载量、结合取向优化方面表现最佳，且在血清孵育后仍能保持最高的抗体可及性与抗原结合容量，其综合性能显著优于另外2种化学修饰方法. 本研究揭示了简单直接的物理吸附法在制备用于复杂生物样本检测的纳米探针方面具有独特优势，为优化纳米探针设计、提高体外诊断可靠性提供了新的实验依据和实用化策略.

关键词　金纳米探针；蛋白冠；抗体固定策略；抗体取向；血清检测
中图分类号　O657　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20260057

Influence of Serum Protein Corona on Antibody Immobilization Strategies and Antigen Capture Capabilities of Gold Nanoparticle Probes

SHI Mingfan, ZHANG Shixin, REN Qingyangzong, WU Qiong*, CHEN Fangfang*
(*Nanomedicine and Translational Research Center*, *China-Japan Union Hospital of Jilin University*, *Changchun* 130033, *China*)

Abstract　When nanoprobes are applied for the detection in complex biological matrices such as serum, a protein corona is prone to form on their surface, which may mask the recognition molecules and thus lead to probe inactivation. To investigate the effects of different antibody immobilization strategies on antibody bioactivity and anti-interference performance, gold nanoparticles were used as the carrier in this study to systematically compare three immobilization methods for rabbit anti-mouse IgG: direct physical adsorption, covalent conjugation *via* mercaptopropionic acid, and site-directed immobilization mediated by staphylococcal protein A. We comprehensively adopted nanoparticle tracking analysis, BCA protein quantitation and dot blot assay to quantitatively evaluate the

收稿日期：2026-01-30. 网络首发日期：2026-02-22.
联系人简介：吴　琼，女，博士，副教授，主要从事生物医学材料制备及纳米诊疗应用方面的研究.
E-mail：qiong_w@jlu.edu.cn
陈芳芳，女，博士，教授，主要从事肿瘤标志物筛选、纳米材料免疫诊疗研究及成果转化方面的研究.
E-mail：cff@jlu.edu.cn
基金项目：国家重点研发计划项目(批准号：2024YFA0918600)、国家自然科学基金(批准号：32271446)和吉林省科技发展计划项目(批准号：YDZJ202601ZYTS395)和2025年吉林大学中日联谊医院MED+X交叉学科培育项目(批准号：2025023)资助.
Supported by the National Key Research and Development Program of China(No.2024YFA0918600), the National Nature Science Foundation of China(No.32271446), the Science and Technology Development Project of Jilin Province, China(No.YDZJ202601ZYTS395) and MED+X Interdisciplinary Incubation Program of Jilin University China-Japan Union Hospital, China(No.2025023).

antibody loading capacity per nanoparticle and the accessible binding orientation of antibodies for each method. Furthermore, a serum-mimicking environment was constructed to analyze the masking effect of protein corona on antibody exposure and the actual target antigen capture capability of the nanoprobes. The experimental results demonstrated that the physical adsorption method via direct co-incubation exhibited the optimal performance in antibody loading capacity and binding orientation optimization. Moreover, this method maintained the highest antibody accessibility and antigen-binding capacity after incubation in serum, and its overall performance was significantly superior to that of the two chemical modification methods. This study reveals that the simple and direct physical adsorption method possesses unique advantages in the preparation of nanoprobes for detection in complex biological samples, which provides novel experimental evidence and practical strategies for optimizing nanoprobe design and improving the reliability of *in vitro* diagnostics.

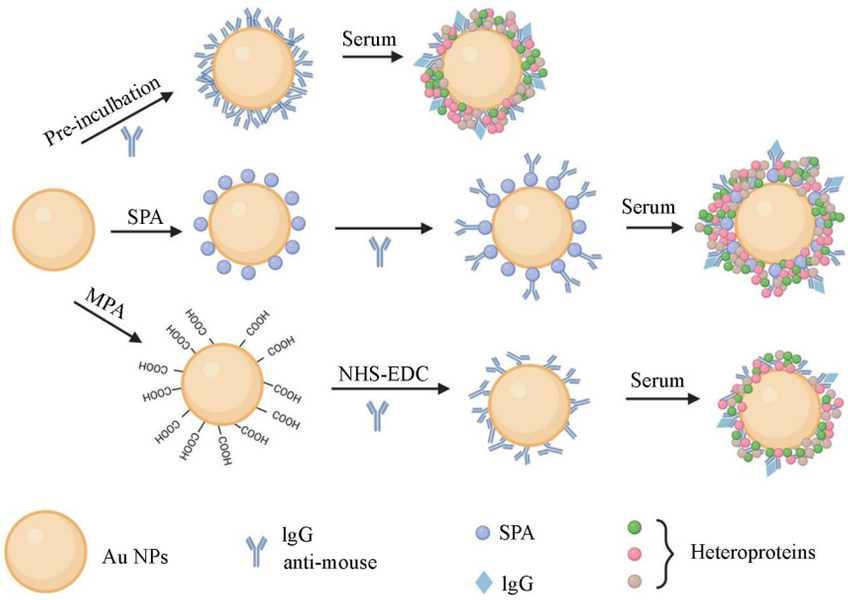
Keywords Gold nanoprobe; Protein corona; Antibody immobilization strategy; Antibody orientation; Serum detection

在纳米生物传感与体外诊断领域，将具有特异性识别功能的生物分子（如抗体、核酸适配体等）高效、稳定且功能化地固定于纳米材料表面，是构建高性能检测探针的核心步骤[1~3]，直接决定了探针的灵敏度、特异性与在真实样本中的可靠性[4~6]. 以金纳米粒子为代表的纳米载体，因其优异的光学特性、易于表面修饰和良好的生物相容性，已被广泛应用于疾病标志物检测、活体成像及靶向递送等领域[7~9]. 为实现目标分子的有效固定，已发展出包括依赖于非特异性相互作用的物理吸附法[10]，基于稳定化学键合的共价偶联法[11]，以及利用生物特异性相互作用的定向固定法[12]等多种策略. 然而，当这些功能化探针进入血清、血浆或组织液等含有高浓度异质蛋白质的复杂生物基质中时，纳米探针表面会迅速吸附一层由多种生物分子（主要是蛋白质）动态组成的“蛋白冠”[13,14]. 这层非特异性吸附的生物分子层可能改变纳米探针的尺寸、表面电荷、水动力学行为及其体内外分布，通过空间位阻效应或竞争性结合遮蔽识别位点、干扰分子取向或诱导构象变化，最终导致探针识别性能降低甚至丧失[15~17]，即发生“探针失效”现象. 蛋白冠的形成使得原本在理想缓冲体系中表现优越的探针在实际检测环境中面临严峻挑战，严重限制了其应用潜力.

理想的固定策略不仅要实现在理想缓冲条件下的高负载量、高活性保留率和良好的稳定性，更致力于在接近真实应用的复杂环境中，使识别分子维持足够的表面可及性、正确的空间取向和完整的生物功能构象，从而有效抵抗蛋白冠的遮蔽与干扰作用. 尽管上述各类固定方法在简单的体外实验中均展现出一定的功能化效果，但其在模拟真实生物环境（如血清孵育）中的实际表现尚未得到系统、全面且定量的比较与深入机制阐释. 不同的固定机制均可能对识别分子的活性中心朝向、表面分布密度及抗体暴露度产生显著差异化的影响[18,19].

因此，系统评估与比较不同固定策略所构建的纳米探针在模拟真实生物环境下的综合性能，定量解析蛋白冠形成前后抗体可及性与抗原结合容量的变化，并深入揭示不同固定方法在抗蛋白冠干扰、维持长期功能稳定性方面的内在规律与潜在机制，已成为推动纳米探针从实验室走向临床应用的紧迫科学问题. 这一研究不仅能为理解“纳米-生物”界面复杂相互作用提供新见解，更能为面向实际诊断需求的高性能纳米探针的理性设计与优化提供关键的理论依据和实用的技术策略[20].

基于此，本文以兔抗鼠IgG抗体为模型识别分子，以金纳米粒子为载体，旨在系统探究并比较3种代表性固定策略：直接物理吸附、3-巯基丙酸（MPA）共价偶联以及通过葡萄球菌蛋白A（SPA）的定向固定在抗体负载量、结合取向优化及抗血清蛋白干扰能力方面的综合性能. 通过整合纳米颗粒追踪分析、BCA蛋白定量及斑点印迹等多种技术，定量评估了不同方法制备的探针的单位粒子的抗体载量与可结合能力，并重点模拟了血清环境，分析了蛋白冠层对抗体暴露度的遮蔽效应，以及探针在复杂基质中实际捕获目标抗原的效能（Scheme 1）. 期望揭示不同固定策略在应对真实检测环境挑战时的内在优劣，为发展更稳健、可靠的纳米探针，提升其在复杂生物样本检测中的准确性与实用性提供关键实验依据和设计原则.



Scheme 1　Sketch map of this study

1　实验部分

1.1　试剂与仪器

四水合氯金酸(上海麦克林生化科技股份有限公司；柠檬酸钠三水合物(上海沪试)；3-巯基丙酸(MPA)(上海安耐吉化学)；*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)；葡萄球菌蛋白A(SPA)Mouse IgG(北京，博奥森生物技术有限公司)；重组anti-IgG[RICC-69](英国abcam公司)、IRDye 800 CW Goat anti-Rabbit IgG，美国LI-COR公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(上海碧云天生物). 所用试剂均为分析纯，实验用水为超纯水.

MSC-100型恒温金属浴(美国Thermo Fisher公司)；XM-300UVF型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；Licor Odyssey型双色红外激光成像系统(美国LI-COR公司)；Nanosight NS300纳米颗粒跟踪分析系统和Zetasizer Lab型纳米粒度及Zeta电位分析仪(英国马尔文帕纳科仪器有限公司).

1.2　实验过程

1.2.1　Au纳米颗粒的制备　将50 mL四水合氯金酸(1 mmol/L)水溶液煮沸后迅速加入1.5 mL预热到60 ℃的柠檬酸钠三水合物(40 mmol/L)水溶液，继续回流反应60 min. 停止加热，在搅拌下冷却至室温，以6000 r/min转速离心15 min，弃去上层清液，将沉淀用15 mL ddH_2O重悬，得到金纳米颗粒.

1.2.2　Au纳米颗粒的表面修饰　将Au纳米颗粒的浓度调整为1×10^9粒子/mL，取出两份体积为2 mL的溶液，分别加入SPA溶液(200 μL，1 mg/mL)和MPA(10 μL，11 mmol/L)溶液，充分混合均匀. 将混合溶液置于4 ℃冰箱中静置孵育3 h后，以6000 r/min转速离心15 min，弃去上层清液，收集沉淀，用ddH_2O重悬并定容至1 mL，得到Au-SPA和Au-MPA修饰纳米颗粒溶液，分别检测其粒径、电位及浓度.

1.2.3　Au-MPA纳米颗粒的活化处理　称1.72 mg NHS和14.37mg EDC，加入10 mL ddH_2O中，充分溶解后得到NHS-EDC活化液，备用. 取400 μL Au-MPA修饰纳米颗粒溶液，加入200 μL NHS-EDC活化液，涡旋混合均匀. 室温下静置反应30 min后，以6000 r/min转速离心15 min，弃去上层清液，收集沉淀，用200 μL超纯水重悬，检测其浓度.

1.2.4　IgG兔抗鼠一抗的偶联　分别取Au，Au-SPA和Au-MPA纳米颗粒溶液，调整至1×10^8粒子/mL的剂量，用超纯水定容至200 μL. 向上述各溶液中加入足量兔抗鼠IgG(一抗)，混合均匀后置于4 ℃金属浴中孵育4 h. 孵育结束后，以6000 r/min转速离心15 min，保留上层清液，收集沉淀并重悬，得到

Au-IgG，Au-SPA-IgG和Au-MPA-IgG偶联纳米颗粒溶液.

1.2.5 Mouse IgG标准品标准曲线的制备 提前制备不同浓度的IgG标准品溶液(100，50，25，12.5，6.25，3.125，0 ng/μL)，取各浓度标准品溶液1 μL，点样于NC膜上，待NC膜自然干燥后，加入10 mL的5% BSA溶液，室温下封闭30 min，封闭后用PBST溶液漂洗NC膜，加入1∶1000稀释的一抗，于4 ℃下孵育过夜，孵育结束后，用PBST溶液漂洗NC膜3次，将带有标准曲线的NC膜常温自然晾干，备用.

1.2.6 样品孵育 取Au-IgG，Au-SPA-IgG和Au-MPA-IgG偶联纳米颗粒溶液，与胎牛血清/胎牛血清+Mouse IgG标准品按1∶3比例混合，于37 ℃下孵育30 min. 孵育结束后，以6000 r/min转速离心15 min，收集沉淀并按原体积重悬.

1.2.7 BCA法测蛋白浓度 取偶联一抗前/后的Au，Au-SPA和Au-MPA原液和离心后的上层清液，采用差值法进行蛋白定量检测，计算各纳米颗粒表面的蛋白偶联数量. 将Au，Au-SPA和Au-MPA用10%BSA封闭30 min后，用含有Mouse IgG(50 μg/mL)标准品的胎牛血清孵育，采用差值法进行蛋白定量检测，计算各纳米颗粒表面的蛋白偶联数量.

1.2.8 Dot Blot检测 取1 μL重悬后的Au-IgG，Au-SPA-IgG和Au-MPA-IgG溶液，点样于上述已晾干的带标曲NC膜上，待膜干燥后，加入1∶10000稀释的荧光标记山羊抗兔IgG(二抗)，室温下孵育1.5 h. 孵育结束后，用PBST溶液漂洗NC膜3次，对膜进行显影并定量分析，计算各纳米颗粒表面的蛋白偶联数量.

1.2.9 计算方法 采用下式计算每个纳米颗粒上的IgG个数：

$$\text{Number of IgG on each nanoparticle} = \frac{\text{Protein concentration of IgG} \times \text{Sample volume}}{\text{Number of IgG nanoparticle} \times \text{Mass of single IgG}}$$

式中：IgG蛋白浓度由BCA或者Dot blot实验测得.

2 结果与讨论

2.1 Au，Au-SPA和Au-MPA纳米颗粒的制备

TEM照片[图1(A)]显示已制备了近似于球形的Au纳米颗粒. 由图1(B)的Zeta电位可见，裸AuNPs呈现−27.27 mV的负电位，修饰SPA后电位升至−19.77mV，负电位绝对值显著减小，这是由于SPA表面的正电氨基中和了部分AuNPs表面的负电荷所致；而修饰MPA后电位进一步降至−30.57 mV，负电位绝对值增大，这是由于MPA通过Au—S键共价结合并引入大量解离的羧基负电基团. 修饰前后粒径的变化如图1(C)所示，裸AuNPs的平均粒径为96 nm，修饰MPA和SPA后粒径分别增至117和121 nm. 从UV-Vis图[图1(D)]可知，裸AuNPs在528 nm处出现强的表面等离子体共振吸收峰，经

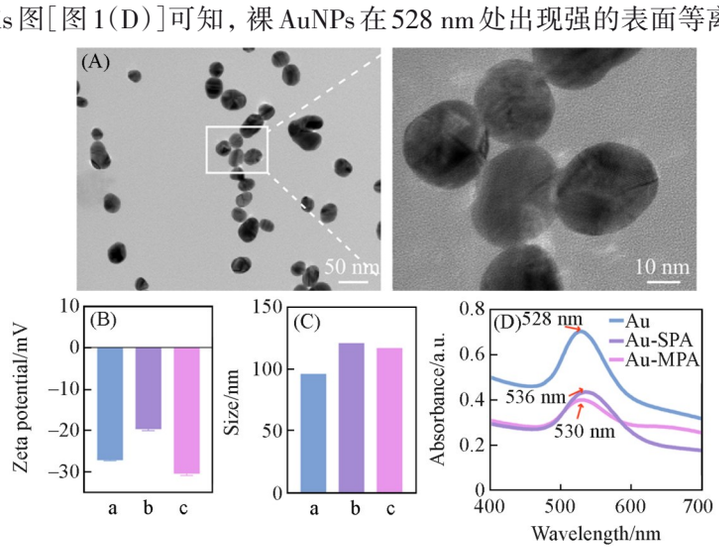


Fig. 1 TEM images of Au nanoparticles(A), zeta potential(B), particle size(C) and UV-Vis spectra(D) of Au, Au-SPA and Au-MPA nanoparticles

(B, C) a. Au; b. Au-SPA; c. Au-MPA.

SPA和MPA修饰后，吸收峰位置均发生红移，结合粒径、电位和UV-Vis光谱的变化共同证实了MPA和SPA在AuNPs表面的成功修饰.

2.2 不同抗体固定策略下一抗结合能力的对比

基于BCA蛋白定量法对一抗偶联前后蛋白的含量进行了检测(图2)，采用直接物理吸附法、SPA定向固定法和MPA共价偶联法的抗体结合总量分别为2.6×10^5，3.5×10^4和1.6×10^5 ng，经计算得出单颗金纳米颗粒表面初始结合一抗个数分别为1.1×10^7，1.4×10^6和6.5×10^6个. 结果表明，3种固定策略的抗体结合数量多少顺序为直接物理吸附法 > MPA共价偶联法 > SPA定向固定法的显著差异，该结果由不同固定，三者存在策略的结合机制、表面结合位点特性共同决定.

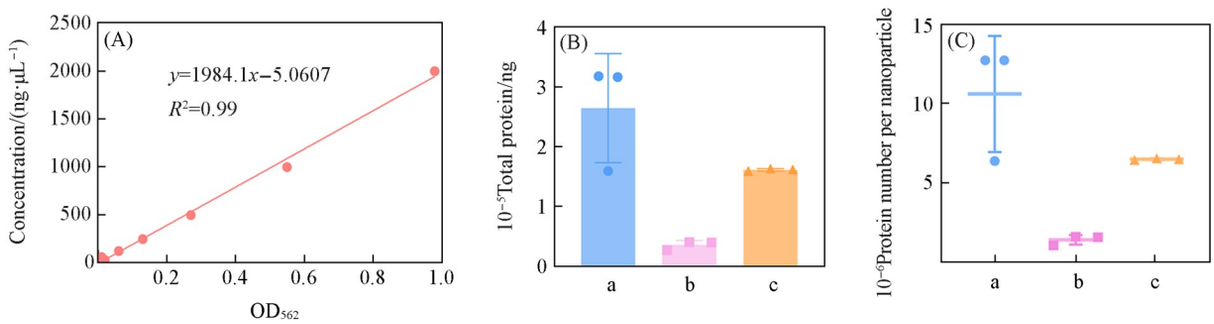


Fig. 2 Results of BCA protein quantification, standard curve(A), total amount of IgG primary antibody bound to the surface of Au-IgG, Au-SPA-IgG and Au-MPA-IgG nanoparticles(B, *n*=3) and the number of IgG molecules bound per nanoparticle(C, *n*=3)

(B, C) a. Au-IgG; b. Au-SPA-IgG; c. Au-MPA-IgG.

直接物理吸附法通过非特异性静电和疏水作用将抗体固定在金纳米颗粒表面. 该方法不受特异性结合位点的限制，抗体可在颗粒表面随机吸附和堆叠，对空间排布无严格要求[21,22]，因此其抗体结合总量和单颗粒偶联数均为最高. SPA定向固定法的抗体结合量最低，主要原因在于SPA蛋白具有特定的空间结构. MPA共价偶联法则通过Au—S键先将MPA共价修饰至金纳米颗粒表面，再经EDC-NHS活化羧基并与抗体氨基形成酰胺键，从而实现抗体偶联. 这种共价结合方式为抗体提供了稳定的修饰位点，能够实现较多数量的抗体偶联[23,24]，但其结合能力也依赖于纳米材料表面羧基的活性. SPA通过修饰位点固定在金纳米颗粒表面后，每个SPA分子仅能结合一个抗体分子. 该方法的抗体结合位点数量及空间排布受到SPA表面修饰密度和空间取向的限制，同时SPA分子本身也存在空间位阻[25,26]，因此无法像物理吸附和MPA共价偶联那样形成高密度的抗体结合位点.

2.3 不同抗体固定策略下抗体可利用度的对比

由于抗体结合在金纳米颗粒表面的取向不可控，但只有取向正确且保持活性的一抗分子才能真正发挥对抗原分子的捕获作用，实验中通过Dot Blot实验定量分析了结合在金纳米颗粒表面的一抗分子的可利用度. 由Dot Blot实验结果[图3(A)和(B)]可见，直接物理吸附法、SPA定向固定法和MPA共价偶联法的抗体有效结合量分别为2.5×10^3，2.3×10^3和2.1×10^3 ng. 经换算，单颗金纳米颗粒表面的有效抗体数分别为1.0×10^5，9.1×10^4和8.4×10^4个[图3(C)]，结合3种策略的初始抗体结合总量数据综合分析可知，不同固定策略对金纳米颗粒表面抗体的可结合取向调控效果存在显著差异[图3(D)]，其中SPA定向固定法展现出最优的抗体空间排布效果(6.8%)，MPA共价偶联法次之(1.3%)，直接物理吸附法调控效果最差，低至1.0%. SPA定向固定法利用SPA蛋白与抗体Fc段之间的特异性结合，实现了抗体在金纳米颗粒表面的精准、定向排布. 该方法能够使抗体的Fc段稳定贴附于颗粒表面，同时将抗原结合位点(Fab段)充分暴露于外部空间. 这种结合机制从根本上避免了Fab段因朝向或邻近效应而发生自我遮蔽与相互遮挡，从而呈现出最优的抗体可结合取向[27,28]. MPA共价偶联法通过酰胺键实现抗体与金纳米颗粒表面的共价连接. 虽然化学活化与偶联过程可能对抗体空间构象产生轻微影响，但其结合位点来源于颗粒表面均匀分布的MPA活化羧基，因此避免了抗体的无规则堆叠与密集聚集. 该

方法能较好地控制Fab段的遮蔽程度，同时共价结合的稳定性也减少了因抗体空间重排导致的结合位点遮蔽，使其抗体可结合取向表现优于直接物理吸附法．直接物理吸附法则依赖于静电和疏水作用实现抗体与颗粒表面的非特异性结合．该方法缺乏定向调控机制，抗体分子在颗粒表面呈随机吸附状态，容易发生密集堆叠与无规则排布．这导致大量抗体的Fab段因朝向颗粒内侧或被邻近抗体分子覆盖而失去与抗原结合的能力，显著降低了其有效结合取向与功能．但是由于高负载率，直接物理吸附法仍然是3种方法中单位纳米颗粒含有有效抗体数量最高的方法．

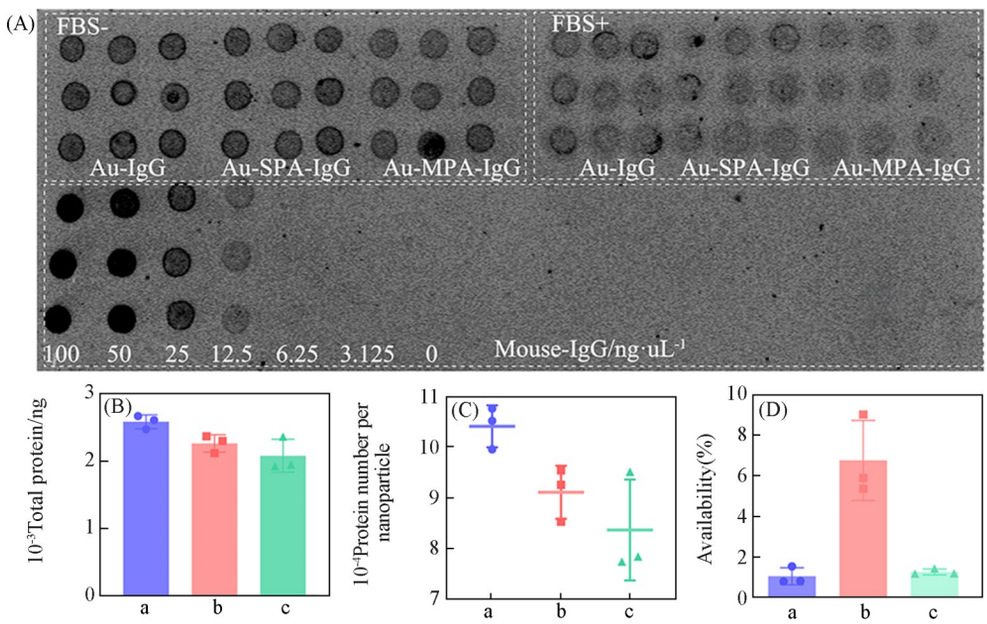


Fig. 3　Dot Blot images(A), effective antibody binding amount under different strategies(B, *n*=3), effective antibody molecules per nanoparticle(C, *n*=3) and antibody availability(D, *n*=3) of Dot Blot protein

(B, C, D) a. Au-IgG; b. Au-SPA-IgG; c. Au-MPA-IgG.

2.4　血清蛋白冠环境下不同抗体固定策略的抗体活性对比

纳米探针用于血清这种复杂基质检测时，其表面形成的多组分蛋白冠层会进一步对抗体分子进行遮蔽，抗体的可利用度会进一步降低．实验中将探针与血清孵育后进行Dot Blot检测，结果显示直接物理吸附法、SPA定向固定法和MPA共价偶联法的抗体有效结合量分别为1.3×10^{3}，1.1×10^{3}和7.4×10^{2} ng[图3(A)和图4(A)]，对应单颗金纳米颗粒表面的有效抗体数分别为5.4×10^{4}，4.6×10^{4}和2.9×10^{4}个[图4(B)]．结合3种策略下抗体结合总量与无干扰环境下有效抗体量的检测结果，进一步整合得到单颗纳米颗粒的抗体结合总量-有效抗体量-血清复杂环境下有效抗体量的变化趋势图[图4(C)]．无干扰实验条件下，3种不同固定策略制备的纳米探针，其表面活性抗体分子数存在显著差异，呈现物理吸附法＞SPA定向固定法＞MPA共价偶联法的趋势．其中，物理吸附法制备的纳米探针未经过化学修饰，可最大程度保留抗体的天然构象与抗原结合本征活性，因此活性抗体分子数最多；SPA介导定向固定的纳米探针虽通过特异性结合实现了抗体结合取向的优化，有效减少了抗原结合位点的遮蔽，但由于初始偶联的抗体分子基数相对较低，使得其活性抗体分子数略低于物理吸附法；而MPA共价偶联的纳米探针，其化学修饰过程会对抗体空间构象造成一定影响，同时偶联后部分抗原结合位点会被随机遮蔽，最终导致其活性抗体分子数最少．

将3种纳米探针与血清共孵育后，其抗体活性均出现不同程度的下降，但活性强弱的整体趋势保持不变，仍为物理吸附法＞SPA定向固定法＞MPA共价偶联法．抗体活性下降的根本原因是，血清中的杂蛋白会在纳米颗粒表面自发形成蛋白冠，会通过静电作用、疏水作用等非特异性方式吸附于纳米颗粒表面，不仅会占据部分抗体结合位点，还会遮蔽已固定抗体的抗原结合片段(Fab段)，使这部分抗体丧失与抗原结合的能力，无法被计入有效抗体数量．由于3种固定策略对抗体空间排布状态和构象稳定性的调控作用存在差异，蛋白冠对抗体结合位点的遮蔽效应程度也有所不同．具体而言，物理吸

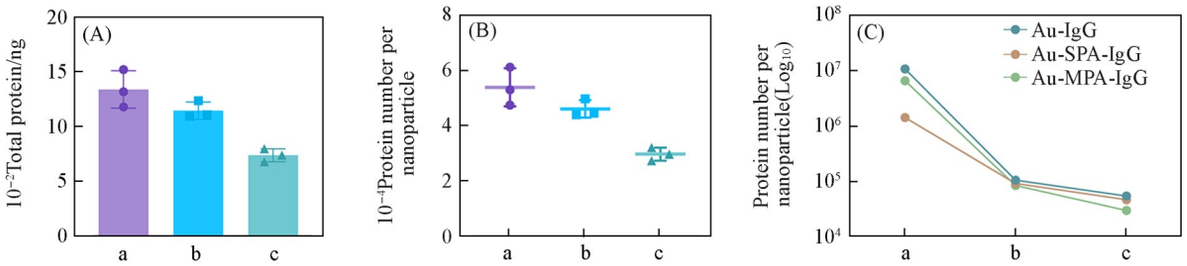


Fig. 4 Bioactive antibody binding amount under different immobilization strategies(A, *n*=3), number of bioactive antibody molecules bound per nanoparticle(B, *n*=3) and variation trend of antibody amount under different conditions(C)

(A, B) a. Au-IgG; b. Au-SPA-IgG; c. Au-MPA-IgG.

(C) a. Total antibody binding amount; b. Number of bioactive antibody molecules in normal environment; c. Number of bioactive antibody molecules in serum environment.

附法制备的纳米探针依靠非共价作用固定抗体，虽无取向调控优势，但最大限度保留了抗体的天然构象与抗原结合本征活性，血清杂蛋白虽可吸附于其表面，却难以完全覆盖所有抗原结合位点，因此其活性抗体数量下降幅度最小；SPA定向固定法通过SPA与抗体Fc段的特异性结合，使抗体空间排布更为有序，有效优化了结合取向，但同时也略微降低了抗体的构象灵活性，使得蛋白冠的空间遮蔽效应更为明显，因此其活性抗体数量低于物理吸附法，但仍优于MPA共价偶联法；MPA共价偶联法则通过稳定的共价键将抗体固定于纳米颗粒表面，其化学修饰过程本身可能引起抗体构象的部分改变，导致抗体在复杂生物环境中的耐受性相对较弱，血清杂蛋白形成的蛋白冠更易对其抗原结合位点产生有效遮蔽，最终导致其活性抗体数量下降幅度最大，始终维持在三者最低水平.

2.5 血清环境下不同抗体固定策略的抗体可及性及抗干扰能力对比

为探究不同固定策略所得纳米探针在血清环境中的实际捕获性能，将Au-IgG，Au-SPA-IgG和Au-MPA-IgG与含mouse-IgG的血清共孵育后，采用BCA蛋白定量法检测了纳米颗粒表面结合的IgG总量. 结果显示，3种策略对应的IgG蛋白量分别为8.6×10^2，4.6×10^2和3.3×10^2 ng[图5(A)和(B)]，计算

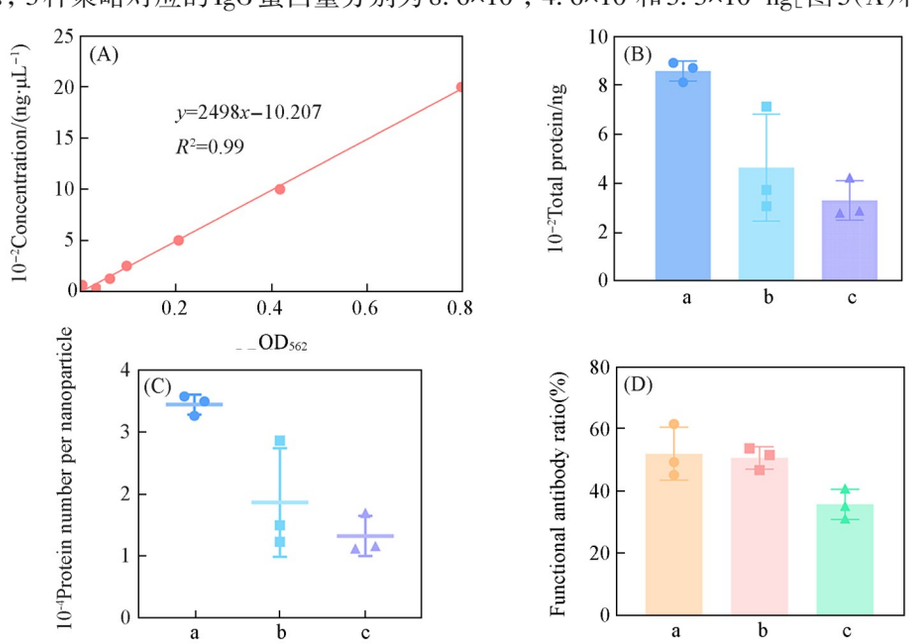


Fig. 5 Standard curve(A), total IgG protein bound under different strategies in serum environment (B, *n*=3), number of IgG protein molecules per nanoparticle(C, *n*=3) and Functional antibody ratio(D, *n*=3) of BCA protein

(B—D) a. Au-IgG; b. Au-SPA-IgG; c. Au-MPA-IgG.

得出单个纳米粒子上结合的IgG分子数分别为3.4×10⁴，1.9×10⁴和1.3×10⁴个[图5(C)]. 这表明其对mouse-IgG的捕获能力依次为物理吸附法(Au-IgG)>定向固定法(Au-SPA-IgG)>共价偶联法(Au-MPA-IgG)，该趋势与复杂环境中抗体暴露程度的变化一致.

进一步比较了3种策略的功能性抗体比率，该比率定义为纳米颗粒表面实际结合抗原的抗体数量占其表面具有活性的抗体总量的百分比. 图5(D)结果显示，物理吸附法与定向固定法的比率接近，分别为51.99%和50.65%，均显著高于共价偶联法的35.75%. 这一差异表明，在抗体已具备良好活性与可及性的前提下，物理吸附与定向固定策略能使约半数有效抗体成功捕获抗原，而共价偶联策略的实际抗原结合效率较低. 物理吸附与定向固定策略比功能性抗体比率更高(约51%)，归因于其温和的固定方式：它们不涉及化学修饰，可最大程度保留抗体的天然构象，确保抗原结合区(CDR区)的完整与柔性. 这种完整的天然构象也赋予了抗体抗遮蔽优势，在复杂环境中能与蛋白冠形成有序的协同稳定效应，进一步保护其活性位点. 相比之下，共价偶联策略(35.75%)因化学修饰破坏了CDR区附近的分子间作用力，导致构象扭曲；同时其刚性束缚限制了CDR区必要的构象调整，且异常形成的蛋白冠无法提供保护，反而加剧了活性位点的遮蔽，因此实际抗原结合效率显著降低.

综上，物理吸附法在提升抗体可及性与抗血清干扰方面表现最优；SPA介导的定向固定在取向上具有理论优势，但其在实际血清环境中的活性保持与抗干扰能力仍不及物理吸附法；而MPA共价偶联因化学修饰引入的结构与界面负面影响，在维持抗体活性与稳定性方面表现最弱.

3 结　论

针对纳米探针在血清等复杂生物基质中因易形成蛋白冠遮蔽识别分子、导致检测失效的关键问题，以金纳米粒子为载体，系统比较了直接物理吸附、MPA共价偶联和SPA定向固定3种兔抗鼠IgG固定策略的效果. 通过纳米颗粒追踪分析、BCA蛋白定量及斑点印迹实验，从抗体载量、可结合取向、抗血清干扰能力及抗原结合容量多维度开展评估. 实验结果显示，直接物理吸附法制备的纳米探针有效抗体载量高于MPA共价偶联与SPA定向固定，综合表现最优. 模拟血清环境后，3种纳米颗粒表面活性抗体分子数均因形成蛋白冠、产生空间位阻遮蔽效应而下降，但直接物理吸附法制备的纳米探针活性保留程度与抗干扰能力仍显著优于MPA共价偶联与SPA定向固定，维持了最高的抗体活性与抗原结合容量. 综上，直接物理吸附法无需化学修饰，既能保留抗体天然构象与本征活性，又能提升其在复杂血清环境中的功能稳定性，综合性能优于MPA共价偶联与SPA定向固定两种化学修饰方法. 该研究明确了简单直接的物理吸附法在制备复杂生物样本检测用纳米探针中的独特优势，不仅为解析蛋白冠对纳米探针识别性能的影响机制提供了实验支撑，也为优化纳米探针设计、提升体外诊断的可靠性与实用性提供了新的技术思路和数据依据. 物理吸附法也存在一定局限，未来可通过调控载体表面性质、引入温和定向锚定策略、结合亲水界面修饰等方式优化物理吸附体系，在不破坏抗体构象的前提下增强结合稳定性与位点暴露率，从而实现更可靠的生物应用.

参　考　文　献

[1] Bai H. T., *Alex. Eng. J.*, **2025**, *128*, 42—51
[2] Bao W. J., Aodeng G. R., Ga L., Ai J., *Microchem. J.*, **2025**, *214*, 113894
[3] Gaba S., Jain U., *Talanta Open*, **2025**, *12*, 100590
[4] Chen Q. A., Zhou Y. W., Huang G. B., Lin C. C., Lin X. C., *Anal. Chim. Acta*, **2026**, *1388*, 345082
[5] Zheng H. R., Zhang H., Wu J. Y., Jiao Z., Chen Y., *Biosens. Bioelectron.*, **2025**, *288*, 117849
[6] Su J., Liu W. H., Chen S. X., Deng W. P., Dou Y. Z., Zhao Z. H., Li J. Y., Li Z. H., Yin H., Ding X. T., Song S. P., *ACS sensors*, **2020**, *5*(12), 3979—3987
[7] Di Marzo E., Ferrando R. M., Polito L., Ragona L., Pagano K., D'Orazio G., Lay L., *Carbohydr. Res.*, **2025**, *553*, 109508
[8] Patil T. P., Vibhute A. A., Vinu A., Pandey-Tiwari A., *World J. Microb. Bio.*, **2025**, *41*(7), 219
[9] Pathan A., Nayak T., Alshahrani S., Tripathi R., Tripathi P., *Chem. Pap.*, **2025**, *79*(6), 3421—3442
[10] Ahn C., Park Y., Shin S., Ahn J. G., Song I., An Y., Jung J., Kim C. S., Kim J. H., Bang J., Kim D., Baik J., Lim H., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, *13*(5), 6805—6812

[11] Hu P. G., Chen L. M., Kang X. W., Chen S. W., *Acc. Chem. Res.*, **2016**, *49*(10), 2251—2260
[12] Yang Q. Y., Liu Z. W., Xu X. R., Zhao Z. H., Fan Z., Du B., Xu J. J., Xu J. W., Wang J., Liu B., Mu X. H., Tong Z. Y., *Biosensors*, **2025**, *15*(11), 747
[13] Dietz L., Oberländer J., Mateos-Maroto A., Schunke J., Fichter M., Krämer-Albers E. M., Landfester K., Mailänder V., *J. Extracell. Vesicles*, **2023**, *12*(12), e12399
[14] Böhmert L., Voß L., Stock V., *Nanoscale Adv.*, **2020**, *2*(2), 563—582
[15] Wang J. L., Xu Y. H., Zhou Y., Zhang J., Jia J. B., Jiao P. F., Liu Y., Su G. X., *Sci. Total Environ.*, **2024**, *914*, 169590
[16] Zhang Z. H., Jiang H., Miao W. B., Lin Q. Z., Li X. J., Sang S. Y., McClements D. J., Jiao A. Q., Jin Z. Y., Qiu C., *Trends Food Sci. Tech.*, **2024**, *146*, 104418
[17] García-Álvarez R., Vallet-Regí M., Zille A., *Nanomaterials*, **2021**, *11*(4), 888
[18] Marques R., Hüppe N., Speth K. R., Oberländer J., Lieberwirth I., Landfester K., Mailänder V., *Acta Biomater.*, **2023**, *172*, 355—368
[19] Böhmert L., Voß L., Stock V., Braeuning A., Lampen A., Sieg H., *Bioconjugate Chem.*, **2022**, *33*(3), 429—443
[20] Joshi R. M., Telang B., Soni G., Khalife A., *Oncology and Translational Medicine*, **2024**, *10*(3), 105—109
[21] Di Nardo F., Cavalera S., Baggiani C., Giovannoli C., Anfossi L., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2019**, *11*(36), 32758—32768
[22] Quan X. B., Zhao D. H., Zhou J., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2021**, *23*(41), 23526—23536
[23] Ta-Aithuak S., Loedsapchinda N., Houngkamhang N., *Key Engineering Materials*, **2020**, *853*, 92—96
[24] Arcos Rosero W. A., Bueno Barbezan A., de Souza C. D., Rostelato M. E. C. M., *Pharmaceutics*, **2024**, *16*(2), 255
[25] Lou D. D., Fan L., Cui Y., Zhu Y. F., Gu N., Zhang Y., *Anal. Chem.*, **2018**, *90*(11), 6502—6508
[26] Treerattrakoon K., Chanthima W., Chayachon A., Dharakul T., Bamrungsap S., *Microchim. Acta*, **2017**, 184(7), 1941—1950
[27] Makaraviciute A., Ramanaviciene A., *Biosensors & Bioelectronics*, **2013**, *864*, 460—471
[28] Zhang Q. Y., Liang J. Y., Bongers A., Richardson J. J., Liang K., Gu Z., *Adv. Sci.*, **2023**, *10*(9), e2206546

(Ed.: F, K)