

免疫胶体金测试原理

免疫胶体金技术是指以胶体金为标记物，应用于免疫组织化学及免疫分析中，对细胞或某些标本中的多糖、糖蛋白、蛋白质、多肽、激素和核酸等生物大分子进行定位及定性检测的一种免疫学技术。虽然免疫胶体金呈现多种多样的应用形式，但以免疫胶体金为基础研发生产的用于疾病检测和诊断的快速检测试剂主要分两大类，一类是渗滤法 (Flow Through immunodiagnostic test), 或称为滴金免疫渗滤实验 (Dot immunogold filtration assay), 它可以理解为一种以免疫胶体金代替酶标抗体的斑点 ELISA。另一类是免疫层析法 (immunochromatographic assay), 是一种侧向横流形式的免疫实验 (lateral flow immunodiagnostic test)。这两类所涉及的原理基本是相同的，但前者操作稍为复杂，目前在研究、开发、生产及使用领域占主导地位的，主要是层析法检测试剂，本文仅就层析法免疫胶体金检测试剂的原理作一总结。

免疫胶体金的制备原理

胶体金是氯金酸 (HAuCl_4) 在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸等作用下，金离子还原后聚合成的一定大小的金颗粒，它由一个基础的晶核 (11 个金原子形成的二十面体) 和包围在外的双离子层构成 (内层为负离子层 AuCl_2^- ，外层是带正电荷的 H^+)。由于静电作用，金颗粒之间相互排斥而悬浮成为一种稳定的胶体状态，形成带负电的疏水胶溶液，故称胶体金。

胶体金在弱碱环境下带负电荷，可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合，由于这种结合是静电结合，所以不影响蛋白质的生物特性。除了与蛋白质结合以外，它还可以与许多其它生物大分子结合，如 SPA、PHA、ConA 等。根据胶体金的一些物理性状，如高电子密度、颗粒大小、形状及颜色反应，加上结合物的免疫和生物学特性，因而使胶体金广泛地应用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学等领域。

胶体金标记，实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。用于胶体金标记的蛋白必须要经过前处理，其目的在于 (1) 去除高浓度的盐分，高浓度的盐分往往干扰蛋白与胶体金的吸附结合，或导致胶体金粒子的凝聚，这一步往往采用低浓度缓冲液中进行。(2) 使蛋白分子尽量分散为单体，冻干蛋白或高浓度蛋白溶液中蛋白分子往往凝聚为多聚体大分子，可同时与多个胶体金粒子结合，影响标记的灵敏度和定量分析。(3) 使蛋白具有适当的分子量。蛋白分子量过小 (30 kD)，形成的蛋白复合体往往是不稳定，可短时间内失活。而分子量过大时，被认为影响探针的灵敏度，特别是已知蛋白的结构与活性中心的情况下，去除对活性影响的结构部分是提高标记灵敏度，延长探针寿命 (防止凝集) 的有效办法。把分子量过小的蛋白与其它蛋白 (如牛

当蛋白前处理完成后，接着要确定胶体金与蛋白结合的最佳 pH 值。对于理化性质不确定的蛋白这一步尤为重要。过量的蛋白与不同 pH 值得胶体金结合后，只有某一特定 pH 值能够形成结合最稳定的探针。在高浓度电解质（如 NaCl）作用下不会凝聚。不同蛋白的适宜 pH 范围的宽窄大不相同。一般选择最小适宜 pH 值为最佳 pH 值。但有些探针的实际情况并不完全如此，最稳定的探针并不完全代表活性最好，这要靠实验验证。

在确定最佳 pH 值后，最后要确定最小蛋白量，即能够形成稳定探针的蛋白的最小量。如果在制备探针时加入太多的蛋白，不仅造成浪费，而且更为严重的是容易造成探针凝聚，并严重影响标记活性。因为探针溶液中的游离蛋白容易抢先与标记位点结合，起到“封闭”（Blocking）作用，而胶体金探针标记不上。在标记位点稀少、被标记物含量较少的情况下要特别注意。

胶体金具有很高的动力学稳定性，在稳定因素不受破坏时自身凝聚极慢，可放置数年不发生凝聚。影响稳定的因素主要有电解质、溶胶浓度、温度、非电解质等。金溶胶必须有少量电解质作稳定剂，但浓度不宜过高。高浓度亲水性非电解质能剥去胶粒外面的水化膜使其凝聚。少量的高分子物质促使溶胶凝聚，但一定量的高分子物质反而可增加溶胶稳定性，如蛋白质、葡萄糖、PEG20000 等的加入有良好的稳定效果。

当金溶胶吸附蛋白质后，溶胶的稳定性随溶液 pH 而变化，而这种变化又取决于吸附蛋白质的等电点，如 ConA，过氧化物酶等，当 pH 较低时保持稳定，提高 pH 则显得不稳定，接近等电点或略高时又变得稳定了。标记后的胶体金溶液可用 0.2~0.5mg/ml PEG20000 作为稳定剂。在 4~10℃ 贮存数月有效，不宜冰冻。贮存中可能会发生程度不同的凝聚，可离心除去。

层析法免疫胶体金检测试剂的组成和结构

胶体金作为免疫标记物始于 1971 年，由 Faulk 和 Taylor 将其引入免疫化学。Faulk 和 Taylor 首先将兔抗沙门氏菌抗血清与胶体金颗粒结合，用直接免疫细胞化学技术检测沙门氏菌的表面抗原。此后，他们还把胶体金与抗胶原血清，植物血凝素，卵白蛋白，人免疫球蛋白轻链、牛血清白蛋白结合应用。1974 年 Romano 和他的同事们将胶体金标记在马抗人的 IgG 上，实现了间接免疫金染色法。层析法检测试剂最早出现于 1988 年，是 Unipath 公司利用染料颗粒开发生产的一种非常方便使用的怀孕检测试剂。1989 年，Spielberg F 等发展了以胶体金为标记物用于检测艾滋病毒抗体的渗滤法检测试剂，此后，免疫胶体金在快速检测试剂中得到了广泛的应用和发展，相伴随的层析法检测试剂在组成结构、生产用的材料等方面也取得了长足的进步。

目前市场上见到的典型的层析法检测试剂的组成成份可分为三个部分，其一是多孔材料，包括样品垫、吸水垫、结合垫及硝酸纤维素膜；其二是试剂，如抗体、金标结合物等；其三是层压结构及卡盒，如 PVC 板、双面胶、盒等（见表 1 及图 1）。

图 1 层析法免疫胶体金检测试剂的组成成分



图 1 层析法免疫胶体金检测试剂结构示意图

层析法检测试剂的各组分，并非简单的相互叠加，改变其中的任一组分，都可能引起产品整体性能的变化。以最常见的早早孕检测试剂为例，影响其产品敏感度的因素可能有：

- 硝酸纤维素膜的特性，主要反应在其流速上。
- 胶体金颗粒的大小，浓度等
- 结合垫的性能，金标结合物的量
- 样品垫的特性
- 检测线的位置及宽度

- 硝酸纤维膜和结合垫的叠压强度
- 捕获抗体的亲合力
- 检测线包被捕获抗体的量
- 结合抗体的特性

层析法免疫胶体金检测试剂的测试原理

层析法免疫胶体金检测试剂实际上是免疫金标记技术和抗原抗体反应相结合而形成的一种应用形式，相比 ELISA 试剂，除标记物不同外，同样服从于抗原抗体反应的特性。此种检测方法具有明显的优点：

- 方便使用，体现在操作简单，不需经过特殊培训。
- 短时间获得检测结果，一般 10—15 分钟即可得出结论。
- 不同环境下的稳定性好，不需冷藏。
- 相比而言，其生产成本和检测成本均较低。
- 检测标本种类多：可用于查血、尿液或粪便，因而适合各种检查

免疫层析实验以微孔膜为固相载体。通过对现有产品的分析，我们可以从抗原抗体反应的原理上把层析法免疫胶体金检测试剂分为以下几个类型：

双抗体夹心法

首先将已知的特异性抗体（单抗或多抗）以一定的量包被于膜上作为检测带，可与金标物结合的二抗作为质控带。与包被抗体相配对的另一单抗金标结合物则吸附于金标垫上并进行干燥。干燥的金标垫一端与膜相接，一端与样品垫相连。膜的另一侧粘贴吸水垫。检测时，于样品垫加入一定量的液体样本，借助毛细管作用，样本沿样品垫到吸水垫的方向移动。它首先经过干燥金标垫，使金标结合物复溶，如标本中有待测抗原，则发生抗原抗体反应，形成复合物 A（金颗粒—抗体—抗原）；样本继续移动到达检测带位置，则与包被抗体再次发生抗原抗体反应，形成复合物 B（金颗粒—抗体—抗原—包被抗体），并于检测带的部位聚集，最终达到肉眼可见的程度，如样本中无待检抗原，则不能形成肉眼可见的红色条带。游离的金标结合物或复合物 A 越过检测带到达质控带，与二抗发生反应，形成复合物 C（金颗粒—抗体—二抗），聚集并产生肉眼可见的红色条带。无论样本中是否含有待检物质，质控带都会呈现红色条带。

双抗体夹心法（double antibody sandwich format）主要用于检测比较大的生物分子及颗粒性抗原（细菌和、病毒、蛋白质、LPS 等）。大的抗原分子有多个抗原位点，根据不同情况可以采用单抗和多抗配对或单抗和单抗配对检测。单抗配对时应对两株单抗进行位点分析，位点相距越远的单抗，其配对检测效果越好。有人认为在某些情况下，可用同一株单抗制备双抗体夹心试剂，前提是抗原拥有多个相同的位点用于结合抗体。

双抗原夹心法

双抗原夹心法的特点在于包被和标记均为抗原，检测时，样品中的待检抗体首先与标记抗原结合，再与包被抗原结合。其质控线应包被标记抗原的多抗，但实际检测中，质控线的效果往往不好。

双抗原夹心法检测抗体的优点在于它检测的是总抗体，即样本中的 IgG、IgM、IgA 等特异性抗体均可作为搭桥抗体产生阳性结果，其对人兽共患病的检测更有价值，既可检测人血清抗体，亦可检测动物血清抗体，从而实现用同一种检测试剂检测不同种属的抗体。另外，双抗原夹心法的特异性和敏感度易于控制，并且可达到很高的水准。

捕获法检测特异性的人 IgG 和 IgM

此种方法主要用于检测某些病原微生物感染人体后产生的特异性抗体，因这些病原微生物主要寄生于细胞内，难于直接检测其特异性抗原，例如丙肝病毒、艾滋病毒、乙脑病毒、麻疹、风疹病毒等大部分的病毒的检测均采用此法。对于标本比较难采取的病源体，亦可采用此方法。人 IgG 的检测主要用于流行病学调查抗、感染性疾病的恢复期诊断或疫苗接种后免疫效果的观察，抗人 IgM 则可用于感染性疾病的期诊断。

捕获法胶体金检测试剂的制备原理是胶体金颗粒包被抗人 IgG 或抗人 IgM 的单抗或多抗，硝酸纤维素膜上的检测线包被特异性抗原，检测时，血清中的抗体首先被金标抗人 IgG 或 IgM 捕获，上行至检测线，再与相应的特异性抗原结合，形成肉眼可见的红色条带。

另外，金标结合物亦可采用 ProteinA, 因其与各种动物 IgG 抗体均有较高的亲合力，可用于检测人和各种动物血清中的 IgG 抗体。质控线包被抗 ProteinA 的多抗。

竞争抑制法检测小分子物质

对于小分子抗原的检测，采用竞争抑制法能取得良好的效果。因小分子只有一个抗原位点，不能同时结合两个抗体，因此不能采用双抗体夹心法检测。目前滥用药物、农药残留、体液中小分子肽的检测等采用此方法。其检测原理与上述的其它方法有所不同：胶体金颗粒标记单克隆抗体，而检测线包被小分子抗原，质控线包被抗鼠 IgG。检测时，样本中的待检抗原首先与金标抗体结合，上行到达检测带时，如待检抗原把一定量的抗体完全饱和，则金标抗体将不能与检测带的抗原结合，不会出现肉眼可见的红色条带，为阳性结果。如标本中无待检抗原，则金标抗体与检测带的抗原结合，形成红色条带，为阴性结果。

选用该方法应特别注意胶体金颗粒的抗体吸附量及包被抗原量。