



胶体金的制备及其应用

胶体金溶液是指分散相粒子直径在 1—150 nm 之间的金溶胶，属于多相不均匀体系，颜色呈桔红色到紫红色。胶体金作为标记物用于免疫组织化学始于 1971 年，Faulk 等应用电镜免疫胶体金染色法 (IGS) 观察沙门氏菌，此后他们把胶体金与多种蛋白质结合。1974 年 Romano 等将胶体金标记在第二抗体（马抗人 IgG）上，建立了间接免疫胶体金染色法。1978 年 geoghega 发现了胶体金标记物在光镜水平的应用。胶体金在免疫化学中的这种应用，又被称为免疫金。之后，许多学者进一步证实胶体金能稳定又迅速地吸附蛋白质，而蛋白质的生物活性无明显改变。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，也可以用于日常的免疫诊断，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的应用已受到广泛的重视。目前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日益成为科学研究和临床诊断的有力工具。

一、免疫胶体金技术的基本原理

氯金酸(HAuCl_4)在还原剂作用下，可聚合成一定大小的金颗粒，形成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，故称胶体金。胶体金颗粒由一个基础金核（原子金 Au）及包围在外的双离子层构成，紧连在金核表面的是内层负离子（ AuCl_2^- ），外层离子层 H^+ 则分散在胶体间溶液中，以维持胶体金游离于溶胶间的悬液状态。

胶体金颗粒的基础金核并非是理想的圆球核，较小的胶体金颗粒基本是圆球形的，较大的胶体金颗粒（一般指大于 30nm 以上的）多呈椭圆形。在电子显微镜下可观察胶体金的颗粒形态。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。吸附机理可能是胶体金颗粒表面负电荷，与蛋白质的正电荷基团因静电吸附而形成牢固结合。用还原法可以方便地从氯金酸制备各种不同粒径、也就是不同颜色的胶体金颗粒。这种球形的粒子对蛋白质有很强的吸附功能，可以与葡萄球菌 A 蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酶、抗生素、激素、牛血清白蛋白多肽缀合物等非共价结合，因而在基础研究和临床实验中成为非常有用的工具。

免疫金标记技术 (Immunogold labelling technique) 主要利用了金颗粒具有高电子密度的特性，在金标蛋白结合处，在显微镜下可见黑褐色颗粒，当这些标记物在相应的配体处大量聚集时，肉眼可见红色或粉红色斑点，因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中，这一反应也可以通过银颗粒的沉积被放大，称之为免疫金银染色。

二、胶体金的特性



1、胶体性质胶体金颗粒大小多在 1~100nm，微小金颗粒稳定地、均匀地、呈单一分散状态悬浮在液体中，成为胶体金溶液。胶体金因而具有胶体的多种特性，特别是对电解质的敏感性。电解质能破坏胶体金颗粒的外周水化层，从而打破胶体的稳定状态，使分散的单一金颗粒凝聚成大颗粒，而从液体中沉淀下来。某些蛋白质等大分子物质有保护胶体金、加强其稳定性的作用。

2、呈色性微小颗粒胶体呈红色，但不同大小的胶体呈色有一定的差别。最小的胶体金（2~5nm）是橙黄色的，中等大小的胶体金（10~20nm）是酒红色的，较大颗粒的胶体金（30~80nm）则是紫红色的。根据这一特点，用肉眼观察胶体金的颜色可粗略估计金颗粒的大小。3.近 10 多年来胶体金标记已经发展为一项重要的免疫标记技术。胶体金免疫分析在药物检测、生物医学等许多领域的研究已经得到发展，并越来越受到相关研究领域的重视。光吸收性胶体金在可见光范围内有一单一光吸收峰，这个光吸收峰的波长（ λ_{\max} ）在 510~550nm 范围内，随胶体金颗粒大小而变化，大颗粒胶体金的 λ_{\max} 偏向长波长，反之，小颗粒胶体金的 λ_{\max} 则偏于短波长。

3、胶体金的稳定性及免疫胶体金的贮存

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。

三、胶体金的制备方法

胶体金的制备一般采用还原法，常用的还原剂有柠檬酸钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷、硼氢化钠等。下面介绍最常用的制备方法及注意事项。

1、玻璃容器的清洁：

玻璃表面少量的污染会干扰胶体金颗粒的生成，一切玻璃容器应绝对清洁，用前经过酸洗、硅化。硅化过程一般是将玻璃容器浸泡于 5% 二氯二甲硅烷的氯仿溶液中 1 分钟，室温干燥

后蒸馏水冲洗，再干燥备用。专用的清洁器皿以第一次生成的胶体金稳定其表面，弃去后以双蒸馏水淋洗，可代替硅化处理。

2、试剂、水质和环境：

氯金酸极易吸潮，对金属有强烈的腐蚀性，不能使用金属药匙，避免接触天平称盘。其 1% 水溶液在 4℃ 可稳定数月不变。实验用水一般用双蒸馏水。实验室中的尘粒要尽量减少，否则实验的结果将缺乏重复性。

金颗粒容易吸附于电极上使之堵塞，故不能用 pH 电极测定金溶液的 pH 值。为了使溶液 pH 值不发生改变，应选用缓冲容量足够大的缓冲系统，一般采用柠檬酸磷酸盐 (pH3~5.8)、Tris-HCl (pH5.8~8.3) 和硼酸氢氧化钠 (pH8.5~10.3) 等缓冲系统。但应注意不应使缓冲液浓度过高而使金溶胶自凝。

3、柠檬酸三钠还原法制备金溶胶：

取 0.01% 氯金酸水溶液 100ml 加热至沸，搅动下准确加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.7ml，金黄色的氯金酸水溶液在 2 分钟内变为紫红色，继续煮沸 15 分钟，冷却后以蒸馏水恢复到原体积，如此制备的金溶胶其可见光区最高吸收峰在 535nm， $A_{1cm/535}=1.12$ 。金溶胶的光散射性与溶胶颗粒的大小密切相关，一旦颗粒大小发生变化，光散射也随之发生变异，产生肉眼可见的显著的颜色变化，这就是金溶胶用于免疫沉淀或称免疫凝集试验的基础。金溶胶颗粒的直径和制备时加入的柠檬酸三钠量是密切相关的，保持其他条件恒定，仅改变加入的柠檬酸三钠量，可制得不同颜色的金溶胶，也就是不同粒径的金溶胶，见附表。

表 1 四种粒径胶体金的制备及特性

| 胶体金粒径 (nm) | 1%柠檬酸三钠 加入量 (ml) * | 胶体金特性 | |
|---------------|-----------------------|-------|-----------------|
| | | 呈色 | λ_{max} |
| 16 | 2.00 | 橙色 | 518nm |
| 24.5 | 1.50 | 橙红 | 522nm |
| 41 | 1.00 | 红色 | 525nm |
| 71.5 | 0.70 | 紫色 | 535nm |

4、柠檬酸三钠—鞣酸混合还原剂：

用此混合还原剂可以得到比较满意的金溶胶，操作方法如下：取 4ml 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，加入 0~5ml 1% 鞣酸，0~5ml 25mmol/L K_2CO_3 (体积与鞣酸加入量相等)，以双蒸馏水补至溶液最终体积为 20ml，加热至 60℃ 取 1ml 1% 的 HAuCl_4 ，加于 79ml 双蒸馏水中，水浴加热至 60℃，然后迅速将上述柠檬酸-鞣酸溶液加入，于此温度下保持一定时间，待溶液颜色变成深红色(约需 0.5~1 小时)后，将溶液加热至沸腾，保持沸腾 5 分钟即可。改变鞣酸的加入量，制得的胶体颗粒大小不同。

5、白磷还原法：在 120ml 双蒸馏水中加入 1.5ml 1% 氯金酸和 1.4ml 0.1mol/L K_2CO_3 ，然后加入 1ml 五分之一饱和度的白磷乙醚溶液，混匀后室温放置 15 分钟，在回流下煮沸直至红褐色转变为红色。此法制得的胶体金直径约 6nm，并有很好的均匀度，但白磷和乙醚均易燃易爆，一般实验室不宜采用。要得到大小更均匀的胶体金颗粒，可采用甘油或蔗糖密度梯度离心，经分级后制得胶体金颗粒直径的变异系数 (CV) 可小于 15%。

四、胶体金的鉴定

胶体金的制备并不难，但要制好高质量的胶体金却也并非易事。因此对每次制好的胶体金应加以检定，主要检查指标有颗粒大小，粒径的均一程度及有无凝集颗粒等。

肉眼观察是最基本也是最简单和方便的检定方法，但需要一定的经验。良好的胶体金应该是清亮透明的，若制备的胶体金混浊或液体表面有漂浮物，提示此次制备的胶体金有较多的凝集颗粒。在日光下仔细观察比较胶体金的颜色，可以粗略估计制得的金颗粒的大小。当然也可用分光光度计扫描 λ_{max} 来估计金颗粒的粒径。制备的胶体金最好作电镜观察，并选一些代表性的作显微摄影，可以比较精确地测定胶体金的平均粒径。

五、免疫胶体金制备

1、蛋白质的处理：由于盐类成分能影响金溶胶对蛋白质的吸附，并可使溶胶聚沉，故致敏前应先对低离子强度的水透析。必须注意，蛋白质溶液应绝对澄清无细小微粒，否则应先用微孔滤膜或超速离心除去。

一般情况下应避免磷酸根离子和硼酸根离子的存在，因为它们都可吸附于颗粒表面而减弱胶体金对蛋白质的吸附。

2、蛋白质最适用量的选择：将待标记的蛋白质储存液作系列稀释后，分别取 0.1ml (含蛋白质 5~40ug) 加到 1ml 胶体金溶液中，另设一管不加蛋白质的对照管，5 分钟后加入 0.1ml 10%

NaCl 溶液，混匀后静置 2 小时，不稳定的金溶胶将发生聚沉，能使胶体金稳定的最适蛋白量再加 10% 即为最佳标记蛋白量。

3、标记：在接近并略为高于蛋白质等电点的条件下标记是比较合适的，在此情况下蛋白质分子在金颗粒表面的吸附量最大。

下述标记步骤最为常见：

①用 0.1mol/L K₂CO₃ 或 0.1mol/L HCl 调节金溶胶至所需 pH(标记 S P A 时调到 pH6.0)。

②于 100ml 金溶胶中加入最佳标记量的蛋白质溶液（体积为 2~3 ml），搅拌 2~3 分钟。

③加入 5ml 1% PEG20000 溶液。

④于 10000~100000g 离心 30~60 分钟（根据粒径大小选择不同离心条件），小心吸去上清液（切忌倾倒）。

⑤将沉淀悬浮于一定体积分含 0.2~0.5mg/ml PEG20000 的缓冲液中，离心沉淀后，再用同一缓冲液恢复，浓度以 $A_{1cm/540nm}=1.5$ 左右为宜，以 0.5mg/ml 叠氮钠防腐，置 4℃ 保存。

⑥包被后的金溶胶也可浓缩后于 Sephadex G-200 柱进行凝胶层析分离纯化，以含 0.1% BSA 的缓冲溶液洗脱。通常用 IgG 包被的金溶胶洗脱液 pH 为 8.2，以 A 蛋白包被的金溶胶洗脱液为 pH7.0。

以上操作中应注意，一切溶液中不应含杂质微粒，可用高速离心或微孔滤膜预处理。

六、免疫胶体金的应用

1、胶体金在电镜水平的应用

胶体金应用电镜水平的研究最早，发展最快，应用最广泛。其最大优点是可以通过应用不同大小的颗粒或结合酶标进行双重或多重标记。直径为 3~15nm 胶体金均可用作电镜水平的标记物。3~15nm 的胶体金多用于单一抗原颗粒的检测，而直径 15nm 多用于检测量较多的感染细胞。

胶体金用于电镜水平的研究，主要包括：①细胞悬液或单层培养中细胞表面抗原的观察。②单层培养中细胞内抗原的检测。③组织抗原的检测。

金标记在电镜水平的应用，主要方法包括：包埋前染色、包埋后染色、免疫负染色、双标记技术和原位杂交技术等。

实验证明，该法样本用量少、检测速度快、对比明显、操作简单、敏感性和特异性高，既可用于抗原检测，也可用于抗体检测，因此，可同时适用于科研和诊断。

2、胶体金在光镜水平的应用

胶体金同样可用做光镜水平的标记物，取代传统的荧光素、酶等。各种细胞涂片、切片均可应用。主要用于：①用单克隆抗体或抗血清检测细胞悬液或培养的单层细胞的膜表面抗原。②检测培养的单层细胞胞内抗原，③组织中或亚薄切片中抗原的检测。

胶体金用于光镜水平的研究，可以弥补其它标记物不可避免的本底过高和内部酶活性干扰等缺点。

3、胶体金在流式细胞仪中的应用：

应用荧光素标记的抗体，通过流式细胞仪计数分析细胞表面抗原，是免疫学研究中的重要技术之一。但由于不同荧光素的光谱相互重叠，区分不同的标记困难，因此必须寻找一种非荧光素标记物，用于流式细胞计数。这样可以同时进行几种标记。该标记物必须能够改变散射角，胶体金可以明显地改变红激光散射角，因而可以作为流式细胞仪的标记物之一。

4、凝集试验：单分散的免疫金溶胶呈清澈透明的溶液，其颜色随溶胶颗粒大小而变化，当与相应抗原或抗体发生专一性反应后出现凝聚，溶胶颗粒极度增大，光散射随之发生变化，颗粒也会沉降，溶液的颜色变淡甚至变成无色，这一原理可定性或定量地应用于免疫反应。

5、免疫印迹技术(immunoblotting)：免疫印迹是一种较新的免疫化学技术。用聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白质分离，得到的区带转移至硝酸纤维素膜，然后用酶免疫法（或免疫荧光、R I A）进行定量。

免疫胶体金也可用于该法的定量。转移后的硝酸纤维素膜与某特异性的抗体保温后，再与经葡萄球菌 A 蛋白致敏的胶体金温育，彻底洗去多余的胶体金，根据膜上胶体金颗粒颜色深浅可测知样品中的特异性抗原。

利用金颗粒可催化银离子还原成金属银这一原理，采用银显影剂增强金颗粒的可见性，更可大大提高测定灵敏度，检测下限可低至 0.1ng，这种免疫金银染色法应用已日趋广泛。

由于胶体金免疫印迹技术简便、快速，且有相当的高的灵敏度，在临床免疫诊断上有很大的应用潜力。

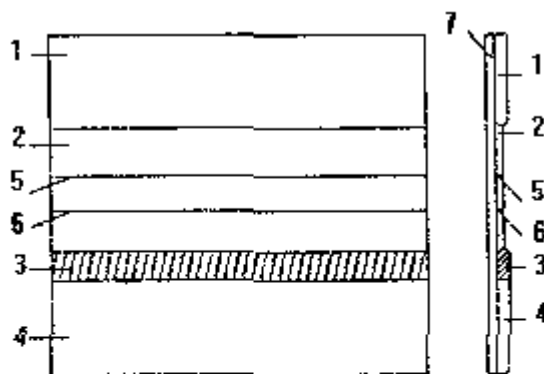
6、胶体金在肉眼水平的应用

胶体金取代传统三大标记物，用于肉眼水平的免疫检测中。除了胶体金本身具有的特点外，还有以下优点：①试剂和样本用量极小，样本量可低至 1~2ul；②不需 γ -计数器、荧光显微镜、酶标检测仪等贵重仪器，更适于现场应用；③没有诸如放射性同位素、邻苯二胺等有害物质参与；④实验结果可以长期保存；⑤时间大大缩短，提高了检测速度。金标过程中，无共价键形成，是一定离子浓度下的物理吸附。因此几乎所有的大分子物质都可被金标记，标记后大分子物质活性不发生改变。实验结果表明，胶体金的敏感性可达到 ELISA 的水平。而结合银染色时，检测的敏感性更大大提高。

七、胶体金在免疫层析快速诊断技术中的应用

免疫层析法 (immunochromatography) 是近几年来国外兴起的一种快速诊断技术，其原理是将特异的抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带，当该干燥的硝酸纤维素一端浸入样品（尿液或血清）后，由于毛细管作用，样品将沿着该膜向前移动，当移动至固定有抗体的区域时，样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合，若用免疫胶体金或免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色，从而实现特异性的免疫诊断。

早孕诊断用的免疫层析试纸条（通常又叫尿妊娠试纸条）的装配结构见图一。



图一、 左：正视图 右：纵切图

1、吸水滤纸 2、固定有抗 β -HCG抗体的NC膜 3、冻干金标记抗 α -HCG玻璃纤维 4、吸尿玻璃纤维 5、试剂质控区带 6、固定的抗 β -HCG抗体区带 7、硬质塑料底板

装配方法：在塑料底板上分别将吸尿用玻璃纤维、冻干金标记抗 α -HCG玻璃纤维、已固定有抗 β -HCG抗体的NC膜及硬质吸水滤纸按图装配，配件与塑料底板的结合可用双面胶或其它粘性材料粘接。装配好的纸板按纵向剪切，裁成宽度为4mm的条状，即为尿妊用纸条。

本法检测速度快，一般一两分钟可出结果；灵敏度高，可达50IU/L；好的试纸条结果也是准确可靠的，这是其所以能在尿妊诊断中得到广泛应用的主要原因。尿妊试纸条的快速特性来源于胶体金免疫层析法的固有特性，但与原材料选择特别是NC膜的孔径大小密切相关，准确性取决于抗 β -HCG的特异性。

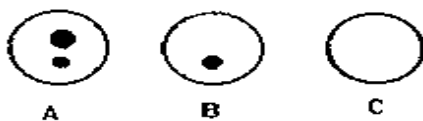
金标尿妊纸条虽然好用，但在使用中也必须注意以下几个方面：一是温度，试纸条虽然可在室温保存，但大批暂时不用的试纸条还是应该放在4℃保存，以免抗体失效，从冰箱刚取出的试纸条则应待其恢复至室温，然后才打开密封，可避免反应线模糊不清。二是正确操作，一般的操作方法是在试纸条的吸尿玻璃端滴入2滴（约100微升）尿液，或将吸尿端直接插入标本中，深度约10~15毫米20秒，取出后平放，这种方法比较麻烦且容易造成污染。我们的方法是取尿标本约0.5ml加入小试管中，然后插入试纸条，待1~2分钟反应带清晰后观察结果。

八、胶体金在快速斑点渗滤技术中的应用

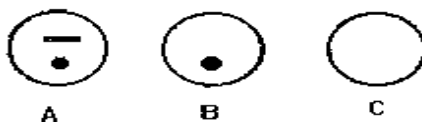
ELISA法在临床实验室已得到普遍的应用，特别是用于各型肝炎标志物的检测。但ELISA法由于操作程序复杂，时间较长，给实验室带来不便。因此出现一步法快速检测试剂盒，虽可提高检测速度，但有出现假阴性结果的弊端。ELISA法需时较长的主要原因，是由于液相中的抗原（或抗体）需经扩散才能与固相上的抗原或抗体反应不适当缩短反应时间，将使灵敏度降至临床要求以下。为满足临床快速检测的需要，近年来发展了多种简便、快速的免疫学检测方法，快速斑点渗滤法即为其中一种，其标记物质用胶体金即称为快速斑点免疫金渗滤法(Dot-immunogold filtration assay)，又称滴金免疫法。

快速斑点渗滤法的基本原理仍是间接法或夹心法。间接法测抗体：固定于膜上的特异性抗原+标本中的相应抗体+金标记的抗抗体或SPA显色。夹心法测抗原：固定于膜上的多克隆抗体+标本中待测抗原+金标记的特异性单克隆抗体显色。

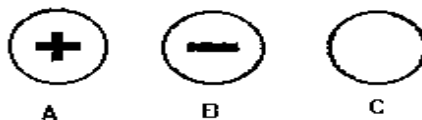
结果判断：快速斑点免疫金渗滤法在操作完成后即可直接观察结果。根据测定模式的不同可有以下不同的判定结果。



图二、 双点模式



图三、 点横模式



图四、 加减号模式



图五、 双项目模式

图二中大点为检测结果，小点为试剂质控点。图中A为阳性结果，B为阴性结果，C为试剂失效。图三中横杠为检测结果，小点为试剂质控点。图中A为阳性结果，B为阴性结果，C为试剂失效。图四中竖杠为检测结果，横杠为试剂质控点。图中A为阳性结果，B为阴性结果，C为试剂失效。图五中左大点为甲项目检测结果，右大点为乙项目检测结果，小点为试剂质控点。图中A为甲乙两个项目都阳性，B为甲项目阳性，C为乙项目阳性，D为两个项目都是阴性，E为试剂失效。

快速斑点免疫金渗滤法检测速度快，结果观察一目了然，已应用于多种临床检测项目。

以上分析可以看出，胶体金标记技术是继三大标记技术之后，又一较为成熟且已得到广泛应用的免疫标记技术。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：5446 0832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

