



医药学院 610 2 12018213

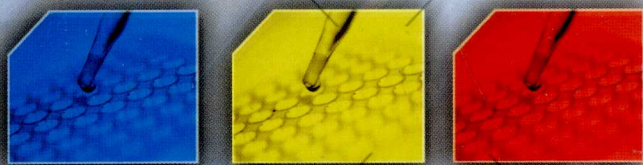
国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

JIAOTIJINBIAOJITANZHEN YU

胶体金标记探针与 酶联免疫斑点技术

MEILIANMIANYIBANDIAN JISHU

主编◎张贺秋





ISBN 7-309-04888-2
I · 1100

中国矿业大学北京图书馆藏

固体金标记材料与 微束电镜扫描电技术

中国矿业大学北京地质研究所 王德顺 王德顺 著

地质出版社



地质出版社



国家十一五重点图书出版项目
生物医学实验技术丛书

胶体金标记探针与 酶联免疫斑点技术

主 编:张贺秋

副主编:冯晓燕 王国华 靳 鹏

编 委:(以姓氏笔画为序)

何 竞 刘 颖 刘殿荣 修冰水

陈 坤 宋晓国 黄 睿 杨锡琴



军事医学科学出版社

·北 京·

图书在版编目(CIP)数据

胶体金标记探针与酶联免疫斑点技术/张贺秋主编.

—北京:军事医学科学出版社,2008.06

(生物医学实验技术丛书)

ISBN 978-7-80245-070-7

I. ①免… II. 张… III. ①免疫测定—医学检验 IV. ①R446.62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 020324 号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路 27 号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)66931051,66931049

81858195

编辑部:(010)66931127,66931039,66931038,

86702759,86703183

传 真:(010)63801284

网 址:<http://www.mmisp.cn>

印 装:中煤涿州制图印刷厂北京分厂

发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:4.5

字 数:170千字

版 次:2012年1月第1版

印 次:2012年1月第1次

定 价:15.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

利其器，善其事

(代丛书总序)

人类对世界本质和规律的探求，集中体现在探求“物质之理”、“生命之理”和“心灵之理”等三个方面。对“理”(科学)的探求，离不开对“器”(技术)的掌握。在普遍意义上，技术^[1]是在一定的自然和社会环境中，用于实现输入集和目标集之间有向转换的可操作程序。简言之，技术是人类知识积累的自然过程和必由之路，是人类生存与文明进步的台阶与扶梯。人类历史表明，技术的发展常常是理论突破的先导。

在生命科学领域，生物技术起着同样重要的作用。1665年，Robert Hook(罗伯特·虎克)之所以能够发现细胞，正是凭借着鹤立鸡群的光学显微镜技术。诺贝尔奖获得者 Linus Pauling(刘易斯·鲍林)所完善的 X 射线晶体衍射技术，帮助 Watson(沃森)和 Crick(克里克)发现了 DNA 双螺旋结构，从而奠定了现代分子生物学的坚实基础，而该技术成功地标识出了构成核糖体的成千上万个原子，在半个世纪以后，将 Venkatraman Ramakrishnan(文卡特拉曼·拉马克里斯南)等三人送上了诺贝尔奖的领奖台。自 1973 年 S. Cohen(科恩)等人首次实现 DNA 的体外重组以来，基因工程技术为人类认识“生命之理”提供了一把“金钥匙”。基于对生物技术重要性的认识，在 2006 年发布的《国家中长期科学和技术发展纲要(2006—2020 年)》中，将生物技术作为科学技术发展的战略重点。


工欲善其事，必先利其器。所谓“事”，在科学研究上讲就是工作、目标(科学发现)；所谓“器”，就是成此事的工具(技术)。因此，非常有必要认真学习和掌握先进的生物技术，并准确、熟练的运用以揭示“生命之理”。然而，许多学者为了保持技术的领先和垄断，在文章和论著中

[1] 李喜先. 技术系统论. 北京:科学出版社,2005:1-4

对自己的成功经验有所保留，只写理论不写经验，客观存在的学术壁垒现象使得一些新的生物技术不能得到很好的普及和应用。

本套丛书的编者均来自科研一线，在研究实践中积累了丰富的经验。他们毫无保留地将当前生物医学领域重要的蛋白质分离与纯化技术、抗体技术、胶体金制备技术、酶联免疫斑点技术、噬菌体表面展示技术、SELEX 技术、计算机辅助实验设计等的技术诀窍奉献给了读者。

我相信，这套生物技术丛书一定能够为推动我国生命科学发展做出大的贡献。



军事医学科学院 院长

中国科学院 院士

序

胶体金标记技术在生物医学实验中已得到了广泛的应用。胶体金标记不同蛋白作为探针可对活体和经固定的组织细胞内生物大分子如糖蛋白、受体、抗原、抗体、激素和核酸进行精确定位。本技术主要应用于免疫组织细胞化学、分子生物学、病毒学及诊断病理学。实践证明,胶体金标记探针技术具有独特的优点和广阔的应用前景。

酶联免疫斑点技术可用于检测并计数单个抗体的形成细胞,并在同一孔内可同时检测两种或两种以上的细胞因子,该技术成功应用于生物医学领域的基础研究、疫苗研制及临床应用。

本书大部分内容是编者多年科研工作的经验积累,为生物医学领域实验技术人员提供了详细的技术程序,可操作性强。

目前我国专门介绍胶体金标记技术和酶联免疫斑点技术的书还很少,本书为实验室工作人员、生物医学专业学生提供了一个很好的选择。同时希望本书的出版对于推动胶体金标记和酶联免疫斑点技术的不断发展产生积极作用。

马贤凯

军事医学科学院基础医学研究所

内 容 简 介

本书为生物医学实验技术系列丛书之一,全书共包含上下 2 篇(共 10 章,包括 2 个技术应用实例及 4 个附录)。

上篇介绍了胶体金的制备和探针标记与纯化技术、胶体金标记探针在光镜水平的免疫金银染色、电镜水平的免疫金染色、核酸原位杂交应用技术。

下篇介绍了酶联免疫斑点技术及在基础医学、疫苗研究、临床应用及技术应用实例。

本书对生物医学实验技术的标准操作和提高实验的成功率具有一定的借鉴,可供生物医学实验技术人员参考阅读,也可作为在校本科生、研究生学习生物医学实验技术的入门参考书。

目 录

上篇 胶体金标记技术

第 1 章 胶体金标记技术的概述	(3)
第 2 章 胶体金标记探针的制备技术原理、特点及应用	(7)
一、技术原理	(7)
二、胶体金标记探针特点及应用	(7)
三、胶体金在免疫快速诊断技术中的应用	(8)
第 3 章 胶体金的制备方法与流程	(10)
一、仪器与设备	(10)
二、试剂	(10)
三、胶体金制备的标准操作程序	(10)
第 4 章 胶体金标记蛋白探针的制备	(13)
一、胶体金标记蛋白	(13)
二、胶体金标记免疫球蛋白	(17)
三、胶体金的稳定性及标记胶体金的贮存	(19)
第 5 章 光镜水平免疫金银染色技术	(20)
一、基本原理	(20)
二、仪器与设备	(20)
三、试剂	(20)
四、标准操作程序	(21)
五、免疫金银染色(IGSS)法的评价及注意事项	(23)
第 6 章 电镜水平的免疫金染色技术	(24)
一、基本原理	(24)
二、仪器与设备	(25)
三、试剂	(25)

四、标准操作程序	(25)
参考文献	(31)

下篇 酶联免疫斑点检测技术

第1章 ELISPOT 技术发展历史	(35)
一、底板材料的改进,提高方法灵敏度	(36)
二、检测内容的多样化,拓展应用领域	(36)
三、单细胞因子到多细胞因子的检测	(37)
四、数据处理,从手工到自动	(38)
第2章 ELISPOT 技术的基本原理与特点	(39)
一、ELISPOT 技术的基本原理	(39)
二、ELISPOT 技术的特点	(40)
第3章 ELISPOT 检测的基本操作步骤	(43)
一、仪器与设备	(43)
二、试剂配制	(43)
三、ELISPOT 标准操作程序	(45)
第4章 ELISPOT 技术应用与实例	(48)
一、ELISPOT 技术的应用领域	(48)
二、ELISPOT 技术应用实例	(49)
参考文献	(56)
附录	(57)
一、免疫胶体金技术常用试剂的配制	(57)
二、电镜中常用的各种固定液、染色液的配方	(58)
三、免疫电镜样品制备中包埋剂的使用	(59)
四、小鼠脾脏淋巴细胞的分离技术	(62)

上 篇

胶体金标记技术

土 篇

宋 姓 引 符 金 淋 湖

第 1 章

胶体金标记技术的概述

1905 年 Isigmondy 用白磷还原法制备出胶体金, 1971 年 Faulk 和 Taylor 将胶体金引入免疫化学, 此后免疫胶体金技术作为一种新的免疫学方法, 在生物医学各领域得到了日益广泛的应用。

在过去的 20 年中, 有多种不同的胶体金合成方法。其中应用较为广泛的是还原法, 还原法的基本原理是在所生成的氯化金溶液中加入一定量的还原剂使金离子还原为金原子。不同粒径的分散胶体金的关键在于控制四氯化金水溶液的量。不同的还原剂可用于合成不同粒径的胶体金, 如用硫氰酸盐合成 2.6 nm 的胶体金; 白磷, 3~12 nm; 硼氰化钠, 4.2 nm; 枸橼酸钠, 3~17 nm 或 12~64 nm; 乙醇, 10 nm。Slot 和 Geuze 所改进的枸橼酸钠加鞣酸还原法可以通过改变 1% 鞣酸的用量, 合成从粒径 17 nm 递减至 3.5 nm 的金颗粒, 国内不少实验室选用此简便而实用的方法。为增加胶体金的穿透性, 近来国外用硼氰酸钠还原化复合物, 合成 0.82 nm 的十一边形金原子团和 1.4 nm 金原子团, 与 IgG 或 Fab/片断共价结合制成最小的金探针。

在大多数情况下, 蛋白质(如抗体、蛋白 A、植物凝集素或酶)吸附胶体金的最适 pH 与蛋白质的等电点相关。蛋白质保持溶解状态, 最适于偶联产生稳定的金探针。在此 pH 区间, 蛋白质的两性离子型占优势, 界面强力最大, 生物大分子与金颗粒外周之间的接触点也最多, 吸附最佳而且是不可逆的。这里指的是蛋白 A 而不是抗血清和单克隆抗体, 因为无论是柱层析、亲和层析纯化的免疫球蛋白均存在着等电点较宽和低离子浓度形成聚集物的倾向。当粒径大小合适的胶体金选定后, 必须确定用来稳定胶体金以防止絮状凝集所需的蛋白量。胶体金的 pH 应调整到偶联蛋白质的等电点或略偏碱性。蛋白质通常要经过蒸馏水或 5 mmol/L 的氯化钠透析。在使用前胶体金标记物经微孔滤膜过滤或离心除去聚集物是很重要的。通过离心还可以除去蛋白质-胶体金制剂中的不稳定的标记物(游离的或结合不牢固的

胶体金 (Colloidal Gold): 氯金酸在还原剂作用下聚合成一定大小的金颗粒, 由于静电作用形成稳定的胶体状态, 故称胶体金

纳米金: 因胶体金粒径在 1~100 nm 之间, 故胶体金也称纳米金

金探针: 利用胶体金与蛋白质结合形成牢固的胶体金蛋白复合物, 称为金探针, 用于免疫标记技术

蛋白质),纯化金探针。离心管底部较疏松的红色沉淀为标记的探针,加入稳定剂(PEG 或 BSA)的等渗缓冲液再悬浮,最终制剂即金探针通常贮存在 4℃冰箱内,有效期为 6 个月。

一般说来,胶体金颗粒越小在细胞标记方面的敏感性越高,分辨率也高。直径在 3~8 nm 的金颗粒比 10~12 nm 者所构成的位阻现象少,获得的标记亲和力高。3~8 nm 大小胶体金的均一性,特别是在双重标记和多重标记实验中也是重要的标准。12~30 nm 大小的胶体金是 TEM 最常用的,它虽然在超微结构水平容易见到,但因为它颗粒大,有可能影响受体的结合部位、细胞生物活性的定量和定性检查。二次电子和 BEI 常用 15~40 nm 大小的胶体金,它也可用于光镜水平的偏振光显微技术、明场显微技术或颗粒影像超微技术。

无论是在光镜水平还是电镜水平,胶体金探针对悬浮细胞和单层培养细胞表面抗原的标记都比较容易获得成功。而由于特异抗体和胶体金探针大分子难以穿透细胞膜进入细胞进行反应,以及常规电镜的锇酸后固定和环氧树脂高温聚合对抗原的影响,组织细胞内抗原和其他生物大分子的标记常受到限制。最近, Berryman 和 Phend 等报告,用鞣酸代替锇酸后固定和醋酸铀块染进行环氧树脂 812 包埋后的免疫金染色取得非常满意的标记效果和良好的细胞超微结构的保存。电镜低温包埋和冷冻超薄技术的不断改进也部分地解决了上述问题。低温包埋剂中有亲水性丙烯酸树脂 L. R. White 和 Lowicryl(K₄M 和 HM₂₀)。这两种包埋剂所包埋的组织 and 细胞需用很低浓度的戊二醛(<0.1%, 15 min)固定,不经过锇酸后固定,在室温(L. R. White, 加催化剂)或低温(Lowicryl K₄M, -35℃或-20℃, 0℃)紫外线下聚合,对抗原活性的保存较好,但存在着由于丙烯酸树脂类包埋剂在聚合过程中产生人工损伤影响超微结构保存的缺点。最近又有两种新的冷冻置换用的低温包埋剂 Lowicryl K₁₁M 和 HM₂₃,要在非常低的温度(分别为-60℃和-70℃)紫外线下聚合,样品无需任何化学固定和冷冻保护剂,可能是研究生物膜结构、膜受体定位和蛋白介导的膜功能的新方法。微波辐射亦已用于金标记样品的制备,它不仅大大缩短制样时间,而且对抗原的保存与复原有显著效果。

1 nm 左右超小胶体金探针具有高分辨、穿透性能好和可以更精确地定位及定量的优点。但因为探针太小一般在普通 TEM 下不易查见,需要经银增强放大。原来 Danscher 最早介绍的 IGSS 技术中所用的银增强液,由于它的 pH 为 3.4,对细胞超微结构的保存影响较大。最近改用 10 mmol/L 的

TEM (Transmission electron microscopy): 透射电子显微镜

胶体金标记蛋白机理:利用胶体金颗粒表面带负电荷,与蛋白质的正电荷基团因静电吸附而形成牢固结合

BEI (Backscattered Electron Image): 背散射电子像

IGSS (ImmunoGold Silver Staining): 免疫金银染色

HEPES 缓冲液配制中性乳酸银液,不仅显影效果好,颗粒较均匀,而且对细胞形态结构的保存有明显改善。免疫金标记后的半薄切片或石蜡切片经上述乳酸银显影后在偏振光显微镜下可清晰地查见强阳性标记信号。其次,硝酸纤维膜进行免疫印迹的实验结果也证实,1.4 nm 免疫金探针反应物经银增强放大后具有更高的敏感性,其最小抗原检测量为 0.2 pg。

当前,令人感兴趣的是将胶体金标记技术用于电镜水平的 ISH。ISH 可检测组织细胞内或染色体内的特异性核酸序列,精确定位 DNA 和 RNA。有报道 Lowicryl 和 L. R. White 包埋的电镜样品很适合 ISH,切片不需预处理,而且地高辛或生物素标记的核酸探针都可以用 0.8~10 nm 金颗粒标记的抗体或 Fab 片段进行直接或间接免疫检测。不同于光镜的 ISH,包埋后电镜 ISH 的各个步骤是在金载网的超薄切片上进行。用 1 nm 左右的金探针最好用银增强放大后更容易在普通光镜下查见。电镜 ISH 设相应的对照尤为重要。电镜 ISH 还可以与免疫电镜联合使用实现双标记。原位缺口翻译也适合于在电镜下检测细胞内 DNA 酶的敏感区,借以区分核分裂间期染色质的活性区和非活性区。包埋前电镜 ISH 在感染病毒(巨细胞病毒和疱疹病毒等)的体外培养细胞样品中曾获得成功。适当地使用表面活性剂(如 Triton X-100)和蛋白酶预处理已固定的细胞,可以让核酸探针标志物穿透细胞膜进入细胞浆和核内,而且细微、超微结构还能完好地保存。

超微结构免疫标记可以提供任何其他技术所不能获得的信息,它不仅可作为肿瘤和非肿瘤组织细胞中各种抗原及其组分表达的客观指征,而且可以对某些含激素的神经内分泌颗粒实现双重标记或多重标记,以阐明肿瘤的性质和明确诊断。最突出的范例是用金探针标记恶性肿瘤细胞内不同的中丝和其他细丝,还有标记垂体瘤和 APUD 肿瘤中的各种多肽激素和神经内分泌颗粒,以明确病理诊断。应用超微结构免疫标记结合图像分析测定不同肿瘤组织细胞中某种特异抗原的浓度,评估和预测肿瘤的行为并借以指导临床治疗,无疑是一项很有开发前景的应用研究课题。免疫金标记在肾病的研究和诊断中也有独特的作用,它可以在超微结构水平明确区分和进一步证实免疫复合物沉积区,而且免疫复合物可被一种或多种不同的轻链或重链(IgG、IgM、IgA)及补体 C₃、C₄ 金探针特异地标记。在某些肾病,形态标志尚未出现以前就可以检出和明确免疫复合物的性质。

电镜负染可以实现某些病毒性疾病的快速诊断。但当病毒浓度低,病毒颗粒小,形态不能确定时也难以与其他非病毒颗粒进行鉴别。IEM 的应用虽然能增加病毒的检出率,但有时也受到非特异染色的干扰。免疫金标

ISH (In Situ hybridization): 原位杂交

利用不同粒径纳米金在超微结构水平进行分子双重标记

IEM: (Immuno-electron microscope 免疫电镜)

记可以显著地提高液体样品中待检病毒的检出率,灵敏度高,可广泛用于常见病毒性感染,特别是球形小病毒的鉴别诊断。粪便悬液中轮状病毒的 IEM 比较研究证实,免疫蛋白 A 标记法最为敏感,其中反应物混合法优于悬浮标记法。用 15~20 nm 金探针作为常规免疫金标记较易分辨,可以放大 3 000 倍,但其信杂比 5 nm 金探针要高得多,后者更适用于研究单克隆抗体与病毒特异抗原位点的关系。金探针-ISH 技术的日趋成熟为在超微结构水平定位病毒的 DNA 或 RNA 基因和研究病毒在细胞内基因复制、转录和翻译过程成为可能。特别感兴趣的是细胞骨架中丝网在病毒和细胞 RNA 传递和转录中的作用。光镜水平 ISH 在医学科研与临床的应用主要有三个方面:检测病原体核酸进行传染病病因诊断、检测病原体核酸(mRNA)在疾病中的异常和检测遗传物质的异常。肿瘤的基因分析是电镜金标记-ISH 的潜在应用范围。

胶体金探针作为电镜免疫细胞化学和光镜免疫组织化学技术极为灵敏的多能性标志物已引起生物医学界的日益浓厚兴趣,并得到了充分的证明,胶体金制剂的商品化有助于在生物医学尚待探索研究的领域去应用与评价。胶体金探针作为电镜水平核酸原位杂交的标志物是非常新的,为传染性疾病、遗传性疾病和恶性肿瘤的基因检测和研究提供了更精确的手段。应该强调胶体金探针在分析电镜中的应用,例如扫描电镜(SEM),透射电镜(TEM)、背散成像(BEI)和能量色散光谱(EDS)分析,为不远的将来设计自动检测和定量装置提供了新思路。实践证明,胶体金探针确实具有许多独特的优点,其开发应用前景是广阔的。

胶体金标记技术迅速发展,应用范围逐渐扩大,不仅用于光镜和电镜水平研究抗原物质在组织、细胞及亚细胞结构的定位,还应用于流式细胞术,液相免疫测定,基因、蛋白芯片等。

第 2 章

胶体金标记探针的制备 技术原理、特点及应用

一、技术原理

胶体金的基本概念:氯金酸在还原剂作用下,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。

胶体金具有一般溶胶的特性。溶胶是指一种物质以或大或小的微小粒子分散在另一种物质中所形成的体系。被分散的物质叫分散相,容纳分散相的另一种物质称为分散介质。

胶体金技术是以胶体金作为一种标志物。将大分子蛋白吸附到胶体金的过程。吸附机制可能是胶体金颗粒表面的负电荷与蛋白质的正电荷基因因静电吸附而形成牢固结合。氯金酸还原法可以方便制备各种不同粒径、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、牛血清白蛋白及多肽化合物等非共价结合,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,主要利用金颗粒具有高电子密度的特性,金标蛋白结合处在显微镜下可见黑褐色颗粒,当这些标志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。

胶体金是一种常用的标记技术,有其独特的优点,可与多种蛋白质形成牢固结合

二、胶体金标记探针特点及应用

1. 胶体金可标记各种不同生物大分子,并保持其原有的生物学活性。
2. 胶体金标记物易于制备,在免疫金和免疫金银染色程序中不需要用