

• 论 著 •

甲胎蛋白纳米金侧流免疫层析快速检测试纸的研制*

方立超¹, 程平¹, 蒋丽莉¹, 黄辉¹, 李艳¹, 贺娟¹, 邓均¹, 郑峻松^{1△}, 桂忆南², 杨聚²

(1. 第三军医大学医学检验系暨药学院临床检验学教研室, 重庆 400038;

2. 第三军医大学学员旅 15 队, 重庆 400038)

摘要:目的 建立本教研室纳米金侧流免疫快速检测试纸研发的技术平台。方法 通过柠檬酸三钠还原法制备纳米金颗粒。以免疫纳米金(A520—A580)为纵坐标, 相应的金标记参数(pH 值、抗体量)为横坐标绘制曲线, 曲线拐点为选择参数。标记缓冲体系的选择主要依据标记过程中纳米金聚沉与否确定。根据免疫金的释放程度和速度, 选择合适的硝酸纤维素膜和作为结合垫和样品垫的玻璃纤维素膜、结合垫及样品垫预处理液配方。依据点加抗体的硝酸纤维素膜和结合垫在不同条件下干燥后组装试纸, 免疫金的释放程度和速度确定干燥条件。组装试纸检测临床血清标本, 比较与 ELISA 检测法的阳性符合率。结果 成功制备了 40 nm 的纳米金。甲胎蛋白(AFP)抗体 I 最适标记 pH 值为 8.5, 最适抗体标记量为 78 mg/mL 纳米金, 标记缓冲体系为 pH 值 8.5 10mM Tris-HCl 溶液。硝酸纤维素膜为 whatman Immunopore RP, 以玻璃纤维素膜 Ahlstrom8964 作为结合垫和样品垫。结合垫选择 pH 值 8.5 的处理液预处理, 样品垫选择 pH 值 9.5 的处理液预处理。硝酸纤维素膜封闭洗涤后在 26 ℃ 湿度 26% 条件下干燥 1 h, 结合垫在 26 ℃ 湿度 26% 条件下干燥 2 h。当 AFP 含量大于 10 ng/mL 时, 组装试纸检测临床血清标本的阳性检出率与 ELISA 法符合率为 100%。结论 成功建立了本组纳米金侧流免疫快速检测试纸研发的技术平台, 适用于病原微生物感染及肿瘤特异性标志物的现场快速检测。

关键词: 甲胎蛋白类; 纳米金; 侧流免疫; 试纸; 技术平台

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)07-0736-03

Preparation of the lateral-flow-immunoassay Point of care testing strip of AFP*

Fang Lichao¹, Cheng Ping¹, Jiang Lili¹, Huang Hui¹, Li Yan¹, He Juan¹, Deng Jun¹, Zheng Junsong^{1△}, Gui Yinan², Yang Ju²

(1. Department of Clinical Laboratory Medicine, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. 15th Student Team, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To set up the technique flat roof of nanogold lateral-flow-immunoassay for our department. **Methods** Nanogold colloid was prepared with a reduction of chloroauric acid by sodium citrate. Optimal conditions of pH and antibody concentration for the coating can be determined by comparing the absorption between 520 and 580 nm(A520—A580)(Eg. a curve was made with the value of (A520—A580)y-axis and the pH and antibody concentration x-axis respectively.) The biocojugation of buffer solution was selected according to the level of aggregation. The proper pyroxylin membrane and glass cellulose membrane and the pretreatment solution of the conjugation pad and sample pad along with the desiccation conditions of the membranes were choosed according to the releasing speed and degree of the conjugated nano-ptarticles. Strips were made and the positive results agreement of detecting results was compared with that of the ELISA kit. **Results** 40nm nanoparticles were made successfully. The proper pH and antibody concentration and the conjugation buffer solution of antibody I were 8.5 and 78mg/ml nanogold and 10mM Tris-HCl (pH8.5) respectively. The proper pyroxylin membrane was what man Immunopore RP. The glass cellulose membrane Ahlstrom8964 was selected as conjugation pad and sample pad. The pretreatment solution of conjugation pad and sample pad was pH 8.5 and pH9.5 respectively. After the pyroxylin membrane added with antibody II was blocked and washed it was desiccated for 1h under the condition of temperature 26 ℃ and humidity 26% while the conjugation pad added with immunogold was desiccated for 2h under the same conditions. When the content of AFP in serum was higher than 10ng/ml the positive accordance rate was 100%. **Conclusion** A lateral-flow-immunoassay point-of care testing technique flat roof in our department is set up successfully, which could be used for the detection of infection of pathogenic bacteria and special marker of tumors.

Key words: alpha-fetoproteins; nanogold; lateral-flow-immunoassay; strip; technique flat roof

纳米金是指分散粒子直径在 1~150 nm 之间的金溶胶, 属于多相不均匀体系, 颜色呈橘红色到紫红色^[1]。目前在医学检验中的应用主要是免疫层析法(immunochromatography, IC)和快速免疫金渗滤法(dot-immuogold filtration assay, DIGFA), 用于检测 HBsAg、HCG 和抗双链 DNA 抗体等, 具有简单、快速、准确和无污染等优点^[2]。AFP 的纳米金快速检测试纸国内已有多家公司生产, 本组以甲胎蛋白(AFP)相对低廉的抗

原、抗体为研究材料, 建立本教研室的纳米金侧流免疫层析快速检测试纸的研究平台, 为后期研发传染病类或肿瘤特异性标志物的纳米金快速诊断试纸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 ZQ2000 微电脑自动斩切机(上海金标生物科技有限公司), ALPHA1-2LD 冷冻干燥机(德国), SPX-150B 生化培养箱(上海佳胜实验设备有限公司)。甲胎蛋白(AFP)

* 基金项目: 第三军医大学科技成果转化基金项目(2009XZH04)。△ 通讯作者, E-mail: zhengalpha@yahoo.com。

测定试剂盒(酶联免疫法)(批号:20050810,郑州安图绿科生物工程有 限公司),羊抗小鼠 IgG,AFP 单抗 I (货号:220-1011)、II (货号:220-1013)[均为天健生物制药(天津)有限公司产品];氯金酸(上海国药集团化学试剂有限公司),小牛血清清蛋白(Roche 公司),其他常规试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 烧金 用柠檬酸钠还原法制备 40 nm 的纳米金溶液^[3]。

1.2.2 标金 确定最适抗体标记 pH 用 0.1 M K₂CO₃ 将纳米金溶液 pH 值分别调为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0。1 mL 不同 pH 值的纳米金溶液各标记 10 mg AFP 单抗 I,加入 100 μL 10% NaCl 后测定各管在 520、580 nm 的吸光度值。以 A₅₂₀~A₅₈₀ 为纵坐标,pH 值为横坐标,绘制曲线,曲线拐点即为最适 pH 值。每个 pH 值重复 3 次实验。

确定最适抗体标记量 1 mL pH 值 8.5 的纳米金溶液分别标记抗体量为 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45 mg,加入 100 μL 10% NaCl 溶液后测定各管在 520、580 nm 的吸光度值。以 A₅₂₀~A₅₈₀ 为纵坐标,各抗体量为横坐标,绘制曲线,曲线拐点即为最小抗体标记量,该量的 130% 即为最适抗体标记量。每个抗体量重复 3 次实验。

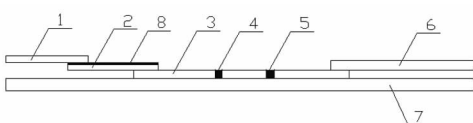
确定最适抗体标记缓冲体系^[4],分别配制 pH 值 8.5 的 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲溶液,0.02 mol/L 磷酸氢二钠缓冲溶液,0.01 mol/L 磷酸氢二钠缓冲溶液,0.01 mol/L 磷酸二氢钠缓冲溶液,0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液,所有缓冲溶液配制好后 0.22 μm 滤膜过滤后备用。1 mL 纳米金溶液 10 803 g 离心 10 min 后将沉淀重悬于各缓冲溶液中,1 mL 纳米金溶液标记 AFP 单抗 I 78 mg,加入 100 μL 10% NaCl 溶液后通过肉眼观察颜色变化来判断纳米金的聚沉。每种缓冲溶液重复 3 次。抗体金标记参照文献^[4-5]。

1.3 硝酸纤维素膜和结合垫及样品垫的选择 从上海捷宁生物科技有限公司购回 Immunopore FP、Sartorius CN140、Whatman AE99、whatman Immunopore RP、Millipore B5 硝酸纤维素膜,分别用玻璃纤维素膜 Ahlstrom8964、AF-06、聚酯膜 78# 作为结合垫、样品垫,组装纸条后观察免疫金的释放程度和速度。

1.4 结合垫、样品垫预处理液的选择 结合垫和样品垫均用 Ahlstrom 8964 玻璃纤维素膜,预处理液浸泡后烘干,密封放于干燥器中备用。将各处理的结合垫、样品垫分别组装试纸,检测三蒸水,根据免疫金的释放程度和速度选择结合垫和样品垫预处理液配方。

1.5 结合垫和硝酸纤维素膜的干燥条件 点加了抗体的硝酸纤维素膜于 37℃ 以 3% BSA 封闭,洗涤后冷冻干燥 1 h,或是 26℃/37℃ 干燥 1 h,点加了免疫纳米金的结合垫冷冻干燥 2 h,或是 26℃/37℃ 干燥 2 h,湿度 26%。组装试纸,检测三蒸水,根据免疫金的释放程度和速度选择合适的干燥条件。

1.6 试纸组装 见图 1。



1. 样品垫;2. 结合垫;3. 硝酸纤维素膜;4. 检测线;5. 对照线;6. 吸水纸;7. 底板;8. 免疫胶体金。

图 1 试纸组装示意图

1.7 方法学比较 共 3 次从西南医院检验科免疫室取回用化学发光法检测了 AFP 的临床患者血清标本共计 59 份,分别用本室设计的试纸、ELISA 试剂盒检测 AFP,比较试纸与 ELISA 法检测结果的阳性符合率。

1.8 试纸检测程序 将待检样品 100 μL 点加在试纸样品垫上或者将试纸浸入待测样品中(液面不要浸湿结合垫)30 s,平放试纸,5 min 内观察结果,硝酸纤维素膜上出现两条红色线表示检测结果阳性,只在质控位置出现一条红色线表示检测结果阴性,不出现红色线表明试纸失效。

1.9 统计学处理 实验所得数据用($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析采用 SPSS 13.0 软件,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 所制备纳米金颗粒的质量 透射电镜结果表明,所制备的纳米金颗粒大小较均匀,为(40.7±2.2)nm,见图 2。

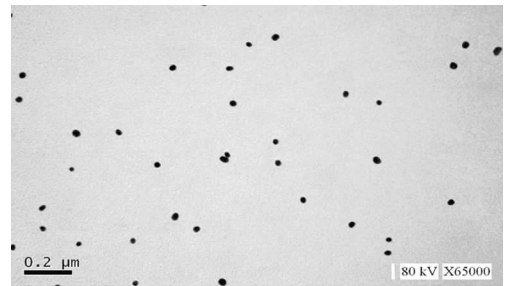


图 2 纳米金的透射电镜照片

2.2 抗体金标记结果 最适标记的 pH 值为 8.5,最小标记的抗体量为 60 mg/mL 纳米金,最适标记抗体量为 78 mg/mL。根据 NaCl 肉眼观察法,除 pH 值 8.5 10 mM Tris-HCl 缓冲液外,其他缓冲液都发生了不同程度的聚沉。

2.3 结合垫和样品垫预处理液配方 根据免疫金的释放程度和速度,结合垫选择 pH 值 8.5 的预处理液处理,样品垫选择 pH 值 9.5 的预处理液处理。

2.4 硝酸纤维素膜和样品垫及结合垫的选择 根据组装试纸后免疫纳米金的释放程度和速度,选择硝酸纤维素膜 whatman Immunopore RP,选择 Ahlstrom8964 玻璃纤维素膜作为样品垫和结合垫。

2.5 硝酸纤维素膜和结合垫干燥条件 冷冻干燥处理的硝酸纤维素膜和结合垫组装试纸后,免疫金释放快,检测线和质控线成色清晰,但冻干的膜和垫在室温下容易潮解。膜和垫在 26℃ 和 37℃,湿度 26% 条件下干燥处理,组装试纸免疫金的释放前者较后者好。

硝酸纤维素膜 26℃ 干燥 1 h,点加了免疫纳米金的结合垫 26℃ 干燥 2 h,湿度 26%。

2.6 方法学比较 试纸检测的质控线和检测线在 5 min 内呈现,无假阳性。与 ELISA 检测法比较,AFP<10 ng/mL 检测阳性率差异有统计学意义($P<0.01$),AFP≥10 ng/mL 时,检测阳性率达 100%。

3 讨论

纳米金与蛋白质的结合是通过正负电荷间的静电力所吸附,两者之间当达到范德华引力范围内而形成牢固的结合,本结合是一种物理过程^[6]。因此,标记体系的 pH 值、离子浓度以及两者的比例均影响胶体金对蛋白质的吸附。一般而言,当 pH 值接近和稍高于蛋白质的等电点时,胶体金对蛋白质的吸附力最强。反之,当胶体金的 pH 值低于蛋白质的等电点时,

则会聚集而失去结合能力。静电排斥和范德华引力的相互作用的平衡使纳米金溶液保持稳定的胶体状态。然而,当额外的离子物质使范德华引力大于静电排斥力时,纳米金发生聚沉,颜色由红色($\lambda_{\max}\approx 520\text{ nm}$, A520)变为蓝色($\lambda_{\max}\approx 580\text{ nm}$, A580)^[6]。纳米金表面包被蛋白质分子,如抗体能阻止这种不稳定。金标抗体的最适 pH 值和最适抗体量可以通过比较(A520—A580)值确定。本实验 pH 值在 8.5 时出现拐点,因此 8.5 是最适标记 pH 值。60 mg/mL 纳米金时抗体曲线图出现拐点,则最小抗体稳定量为 60 mg/mL 纳米金,最适抗体标记量是 60 mg/mL 纳米金 $\times 130\% = 78\text{ mg/mL}$ 纳米金。

虽然点加了抗体的硝酸纤维素膜和结合垫冷冻干燥条件下组装的试纸免疫金的释放速度和程度最好,但膜和垫很容易在室温下潮解,而且在工业化生产时成本增加。26℃和 37℃、湿度 26%条件下干燥,免疫金的释放程度和速度,前者较后者好,从温度对抗体活性的影响及工业生产成本等角度考虑,选择 26℃、湿度 26%的干燥条件较为合理。

本法与 ELISA 法同时检测,用化学发光法测定了 AFP 含量的血清标本的阳性符合率结果显示,AFP<10 ng/mL 时两者阳性率差异有统计学意义($P<0.01$),当 AFP $\geq 10\text{ ng/mL}$ 时,两者的阳性符合率为 100%。当血清中 AFP=2 912 ng/mL 时,只出现了检测线未出现质控线,即出现明显的后带现象,与理论相符。临床上用化学发光法检测 AFP 含量时,通常将 AFP $\geq 20\text{ ng/mL}$ 作为临床阳性筛检的标准,表明本法研制的 AFP 侧流免疫快速检测试纸,在检测 10 ng/mL 以上的 AFP 含量时是可信的,其检测结果能满足临床筛检的需要。有学者也认为免疫层析法是一种简便、快速的检测分析法,而且无需特殊仪器设备,值得在各级医院推广,因此建立这样的研究平台对于开发病原微生物感染及肿瘤特异标志物的快速检测有重要意义^[7-9]。但纳米金试纸的关键就是要解决灵敏度低的问题,这方面可以考虑选择特异性好的抗体及优化试纸研制的各项工艺参数^[10-12]。

参考文献

[1] 孙大治,徐云庆,史蕾,等. 新型免疫标记技术研究进展及在免疫

(上接第 735 页)
外均未见报道,故本组考虑作为介绍和报道,以为临床提供一个新的检测方法。

参考文献

[1] 张莉,李小捷. HPV 基因分型检测在女性生殖道感染中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(5):452.
[2] de Villier EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses[J]. Virology, 2004, 324(63):17-27.
[3] 江川清文. いぼ(疣贅)の生涯[J]. The 69 Annual Meeting of the Tokyo Division of JDA, 2009, 14(6):142-146.
[4] Ola F, Annika A, Peter N, et al. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin[J]. Journal of General Virology, 1999, 80(26):2473-2443.
[5] Smith EM, Ritchie JM, Summersgil KF, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers[J]. Int J Cancer, 2004, 108(5):766-772.

检测中的应用[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2010, 33(4):276-278.
[2] 熊勇华,陈雪岚,陈媛. 甲基苯丙胺的胶体金免疫层析检测卡的研制[J]. 卫生研究, 2010, 39(1):120-122.
[3] Xiulan S, Xiaolian Z, Jian T, et al. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1[J]. Int J Food Microbiol, 2005, 99(2):185-194.
[4] Thobhani S, Attree S, Boyd R, et al. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins[J]. Journal of Immunological Methods, 2010, 356(2):60-69.
[5] Oku Y, Kamiya K, Kamiya H, et al. Development of oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multi-parameter detection[J]. J Immunol Methods, 2001, 258(2):73-84.
[6] Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK. Immobilized Affinity Ligand Techniques[M]. San Diego, USA: Academic Press, 1992.
[7] 李光迪,陈淑萍. 胶体金免疫层析法初筛乙型肝炎表面抗原[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(9):849-851.
[8] 邱忠平,吴丽娟. 胶体金试纸条快速检测结核抗体的临床意义探讨[J]. 国外医学·临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(3):209-210.
[9] 宋鹏,刘陶,杨浩,韩锋产,等. CMV 抗体免疫金快速检测试剂盒的开发与初步应用[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(20):1871-1873.
[10] Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of chlamydia trachomatis infection[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(21):160-184.
[11] 刘仁沿,梁玉波,陈媛,等. 胶体金免疫层析法快速检测腹泻性中毒软海绵酸的研究[J]. 分析科学学报, 2010, 26(1):31-34.
[12] 郝建秀,张春明,王沂,等. 人心肌钙蛋白 I 胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 生物医学工程与临床, 2010, 14(6):546-549.

(收稿日期:2011-03-10)

[6] Syanen KJ. HPV infections and esophageal cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(10):721-728.
[7] 王瑜敏,陶志华. 人乳头瘤病毒和前列腺癌的关系研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(1):49-50.
[8] Iftner A, Klug SJ, Garbe C, et al. The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors[J]. Cancer Res, 2003, 63(12):7515-7519.
[9] Hagiwara K, Uezato H, Arakaki H, et al. A genotype distribution of human papillomaviruses detected by polymerase chain reaction and direct sequencing analysis in a large sample of common warts in Japan[J]. J Med Virol, 2005, 77(2):107-112.
[10] Porro AM, Alchorne MM, Mota GR, et al. Detection and typing of human papillomavirus in cutaneous warts of patients infected with human immunodeficiency virus type 1[J]. Bri J Dermatol, 2003, 149(22):1192-1199.

(收稿日期:2011-02-06)