

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.19.008

两种方法制备纳米金原位增敏金标免疫层析试验的比较^{*}

孙卫民,康嘉乐,邓 聪,林 敏,任鹏丽

广州医科大学附属第二医院检验科,广东广州 510260

摘 要:**目的** 比较两种化学方法制备纳米金的增敏效果,找出相对合适的制备纳米金增敏金标免疫层析试验的方法。**方法** 以金标免疫层析试验检测血浆绒毛膜促性腺激素(HCG)为基础,用盐酸羟胺和抗坏血酸还原氯金酸制备纳米金颗粒,判断纳米金原位所形成的纳米颗粒颜色,检测其灵敏度。**结果** 盐酸羟胺还原法增敏血浆 HCG 金标免疫层析试验,相对增敏前检测灵敏度提高约 16 倍,且重复性较好。抗坏血酸还原法增敏血浆 HCG 金标免疫层析试验,相对增敏前检测灵敏度提高约 4 倍。**结论** 盐酸羟胺还原法制备纳米金对血浆 HCG 金标免疫层析试验增敏倍数较高,重复性较好,试验结果可靠,可推广使用。

关键词: 纳米金; 金标免疫层析试验; 增敏

中图法分类号: R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)19-2777-03

Comparison of two methods for preparing gold nanoparticles in situ sensitization gold label immunochromatographic test^{*}

SUN Weimin, KANG Jiale, DENG Chong, LIN Min, REN Pengli

Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China

Abstract: Objective To compare the sensitizing effects of two chemical methods for preparing gold nanoparticles, and to find a relatively suitable method for preparing gold nanoparticles to enhance the sensitization gold label immunochromatographic test. **Methods** Based on the gold-labeled immunochromatographic test to detect plasma chorionic gonadotropin (HCG), gold nanoparticles were prepared by reducing chloroauric acid with hydroxylamine hydrochloride and ascorbic acid, and the color of nanoparticles formed by gold nanoparticles in situ was determined and its sensitivity was detected. **Results** Hydroxylamine hydrochloride reduction method sensitized the plasma HCG gold-labeled immunochromatographic test. The detection sensitivity was about 16 times higher than that before sensitization, and the repeatability was good. Ascorbic acid reduction method sensitized the plasma HCG gold-labeled immunochromatographic test, and the detection sensitivity was about 4 times higher than that before sensitization. **Conclusion** Hydroxylamine hydrochloride reduction method which prepare gold nanoparticles has a higher sensitivity to plasma HCG gold-labeled immunochromatographic test, good repeatability, and reliable test results, which can be widely used.

Key words: nano gold; gold label immunochromatographic test; sensitization

金标免疫层析试验作为一种临床快速检测技术,因其省去了标本预处理步骤,以及大型仪器设备检测、数据处理和传输等大量繁琐的过程,可直接快速地得到可靠的结果,广泛应用于临床。目前床旁金标免疫层析试纸条大多采用肉眼直接判读,结果易受标本中的水或血、标记物纳米金等渗透不均的干扰,且大多适用于定性或半定量检测,使其应用范围受到一定限制^[1-2]。由于纳米金颗粒直径偏小,影响肉眼观察的灵敏度。因此,该技术虽然操作简便、成本低,但其灵敏度不够高,易导致误检和漏检,留下安全隐患。为提高金标免疫层析试验的灵敏度,有研究通过生物

素亲和素系统,免疫金银染色法进行银加强试验,对膜进行化学修饰和对二抗进行修饰制作增敏剂等技术,在一定程度上提高了试验的灵敏度^[3-5]。但这些方案操作复杂、试验时间较长、成本高,不太适合实时快速的临床床边检测。因此,构建既灵敏又快速的检测技术成为亟待攻克的技术难题。本研究以血浆绒毛膜促性腺激素(HCG)金标免疫层析试验为基础,以改性溶液做预处理,盐酸羟胺和抗坏血酸两种还原剂还原氯金酸制备纳米金颗粒,在原位上增大纳米金的粒径,以期提高金标免疫层析试验灵敏度。比较这两种化学方法制备纳米金的增敏效果,找出相对合适制

^{*} 基金项目:广东省医学科研基金项目(A2017050)。

作者简介:孙卫民,男,副主任技师,主要从事生化免疫技术相关研究。

备纳米金增敏金标免疫层析试验的方法,为提高金标免疫层析试验灵敏度,扩大临床应用范围提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Precisa240A 电子分析天平、金标免疫层析试纸条购自北京蓝十字生物药业有限公司;盐酸羟胺(分析纯)购自广州化学试剂公司;抗坏血酸购自湖南省娄底市化学品有限公司;氯金酸(分析纯)购自北京化学试剂公司;磷酸盐缓冲液购自苏州赛默飞世尔仪器有限公司;吐温 20 购自美国 Sigma 公司;壬基酚聚氧乙烯醚购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 改性溶液的配制 100 mL 的磷酸盐缓冲液加入 CaCl_2 和 MgCl_2 使终浓度分别为 1.0 mmol/L 和 0.5 mmol/L,同时加入 1 mL 吐温 20 和 1 mL 壬基酚聚氧乙烯醚,充分混匀备用。

1.2.2 盐酸羟胺增敏法 A 液:用去离子水配制 1% 的氯金酸;B 液:用磷酸盐缓冲液配制 0.4 mol/L 盐酸羟胺。

1.2.3 抗坏血酸增敏法 A 液:用去离子水配制 1% 的氯金酸;B 液:用磷酸盐缓冲液配制 0.5% 抗坏血酸。

1.2.4 标本制备 将患者血浆(HCG 浓度为 256.800 0 mIU/mL)用生理盐水倍比稀释为:未稀释、1:2.5、1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320(浓度依次约:256.800 0 mIU/mL、102.720 0 mIU/mL、51.360 0 mIU/mL、25.680 0 mIU/mL、15.840 0 mIU/mL、6.420 0 mIU/mL、3.210 0 mIU/mL、1.605 0 mIU/mL、0.802 5 mIU/mL),再以雅培 I2000 全自动化学发光免疫分析仪检测结果为阴性的血浆作为阴性对照。按金标免疫层析试纸条说明书操作检测,检测完毕后用照相机拍照存档。

1.2.5 HCG 测定增敏下限的确定 待试纸条按 1.2.4 检测完毕,将样品垫、金标垫和上端的吸水纸剪掉,注意不要损伤硝酸纤维素膜。将各试纸条分别放入改性溶液浸泡 5 min,取出用去离子水冲洗干净,用吸水纸吸去多余的水分,让试纸条保持一定的倾斜角度,先加 A 液 10 μL 氯金酸溶液,再加 B 液 80 μL 盐酸羟胺溶液或 80 μL 抗坏血酸溶液,使其沿试纸条依次通过测试线和控制线,10 min 内读取结果。

1.3 统计学处理 采用 EXCEL 软件对数据进行处理分析。

2 结果

2.1 HCG 测定增敏下限的确定试验 结果表明抗坏血酸组:未增敏前以 >25.000 0 mIU/mL 为阳性,256.800 0 mIU/mL、102.720 0 mIU/mL、51.360 0 mIU/mL、25.680 0 mIU/mL 为弱阳性,其余均为阴

性。增敏后以 >6.400 0 mIU/mL 为阳性,256.800 0 mIU/mL、102.720 0 mIU/mL、51.360 0 mIU/mL、25.680 0 mIU/mL、15.840 0 mIU/mL、6.420 0 mIU/mL 均出现阳性带,且颜色逐渐偏低,3.210 0 mIU/mL、1.605 0 mIU/mL 和阴性对照显示阴性结果。两次检测结果比较显示基于纳米金增敏 HCG 检测下限可达 6.420 0 mIU/mL,相对增敏前,灵敏度提高约 4 倍。

盐酸羟胺组:未增敏前以 >25.0000 mIU/mL 为阳性,256.800 0 mIU/mL、102.720 0 mIU/mL、51.360 0 mIU/mL、25.680 0 mIU/mL 为弱阳性,其余均为阴性。增敏后以 >6.400 0 mIU/mL 为阳性,256.800 0 mIU/mL、102.720 0 mIU/mL、51.360 0 mIU/mL、25.680 0 mIU/mL、15.840 0 mIU/mL、6.420 0 mIU/mL、3.210 0 mIU/mL、1.605 0 mIU/mL 均出现阳性带,且颜色逐渐偏低,0.802 5 mIU/mL 和阴性对照显示阴性结果。两次检测结果比较显示基于纳米金增敏 HCG 检测下限可达 1.605 0 mIU/mL,相对增敏前,灵敏度提高约 16 倍。

2.2 重复性试验 将 6.420 0 mIU/mL、1.605 0 mIU/mL 溶液按盐酸羟胺还原法继续用同一批次的金标免疫层析试纸条分别作 4 份检测,连续 5 d,检测结果均稳定不变,表明该技术增敏结果重复性较满意。

3 讨论

金标免疫层析试验以纳米金作为示踪标记物,把纳米金颗粒光学检测的灵敏度及免疫反应的特异度相结合,应用于抗原抗体反应。因其简便、快速、安全,在急诊医学、输血医学、现场诊断及个体自我体检等方面广泛应用,是床旁检验的主要技术手段。金标免疫层析试纸条的吸水垫处加待测液体样品,液流向试纸条的测试区移动,液流经过结合释放区时,膜上预固的金标特异性抗体(或抗原)被溶解,与待测物反应而形成金标抗原抗体复合物。液流前移至检测区,其上的抗体(或抗原)结合并固定纳米金标记的复合物,通过纳米金标记物浓集呈现紫红色,为阳性反应^[6]。该检测技术虽优势很突出,但因依靠其自身所具有的颜色进行结果判断,需颗粒大量聚集达到肉眼可见的效果。临床中部分标本因水平低,结合的金标抗体少,肉眼观察时呈现很浅的颜色甚至无法识别,因此判断为阴性,实则是假阴性结果。因此,该方法检测灵敏度较低,从而限制了金标免疫层析试纸条在临床对检测灵敏度要求较高项目中的应用^[7]。

为提高金标免疫层析试纸条的灵敏度,研究人员进行了多方面的尝试,通过研制产生特定光、电或磁信号的纳米材料,增强反应信号,提高增敏效果^[8-12]。本研究采用已在临床使用成熟的 HCG 试剂为基础作增敏研究。试验中未增敏时 HCG 浓度为 15.840 0 mIU/mL、6.420 0 mIU/mL、3.210 0 mIU/mL、

1.605 0 mIU/mL 均表现为阴性。当使用改性溶液处理金标免疫层析试纸条表面,分别采用盐酸羟胺与氯金酸和抗坏血酸与氯金酸两种方式在试纸条原位制备纳米金,试纸条检测区原本少量的纳米金结合新产生的纳米金,呈黑褐色,从而放大检测信号,肉眼可判断,其中抗坏血酸还原法检测灵敏度提高约 4 倍,盐酸羟胺还原法检测灵敏度提高约 16 倍。结果进一步证实了笔者前期原位增敏的推断^[13]。氯金酸水溶液中的金离子在不同还原剂的作用下还原成金原子,并聚集成微小的金核,在其表面吸附负离子(AuCl_2^-)和部分正离子(H^+)形成吸附层,依靠静电作用形成稳定的胶体溶液。使用改性溶液破坏金核表面的吸附层,使新制备的金核与标记单克隆抗体的胶体金颗粒结合,在试纸条的检测区形成更大的“金壳”,随着胶体金粒径的增大,胶体金颜色加深,表现为黑褐色,从而放大检测信号,提高肉眼的判读能力,达到增敏的效果。

本研究提高了肉眼判读金标结果的灵敏度,但不同判读者肉眼判读的主观性差异较大,判读结果的误差也较大,仍存在一些局限性。因此将该增敏方案联合特定的免疫检测仪器,对结果进行判读,避免肉眼判读的主观误差,以及这两类增敏方法在不同项目或不同厂家的金标免疫层析技术上的普遍适用性等方面作进一步研究,将更有助于提高其实际应用价值。

综上所述,快速氧化还原法制备纳米金对金标免疫层析试验有一定增敏效果,不同的还原剂增敏效果不同。其中盐酸羟胺还原法制备纳米金对血浆 HCG 金标免疫层析试验相对抗坏血酸还原法增敏倍数较高,重复性较好,试验结果可靠,更加适合于制备纳米金以达到增敏金标免疫层析试验的目的,为扩大金标免疫层析试验的应用范围提供一定的基础。

参考文献

- [1] TANAKA R, YUHI T, NAGATANI N, et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 385(8):1414-1420.
- [2] YAGER P, EDWARDS T, FU E, et al. Microfluidic diag-

nostic technologies for global public health[J]. Nature, 2006, 442(711):412-418.

- [3] WANG X J, ZHAN W B. Development of an immunochromatographic test to detect white spot syndrome virus of shrimp[J]. Aquaculture, 2006, 255(1/4):196-200.
- [4] CHIAO D J, SHYU R H, HU C S, et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 809(1):37-41.
- [5] NAOKI N, RYOU T, TERUKO Y, et al. Gold nanoparticle-based novel enhancement method for the development of highly sensitive immunochromatographic test strips[J]. Sci Technol Adv Mater, 2006, 7(2):270-275.
- [6] 曾念寅, 李玉榕, 杜民. 纳米金免疫层析试条定量检测的研究[J]. 生物医学工程研究, 2015, 34(4):259-264.
- [7] GAO X F, XU L P, ZHOU S F, et al. Recent advances in nanoparticles-based lateral flow biosensors[J]. J Biomed Sci, 2014, 6(1):41-57.
- [8] QUESADA-GONZÁLEZ D, SENA-TORRALBA A, WICAKSONO W P, et al. Iridium oxide (IV) nanoparticle-based lateral flow immunoassay[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 132(1):132-135.
- [9] SHEN M, CHEN Y, ZHU Y, et al. Enhancing the sensitivity of lateral flow immunoassay by centrifugation-assisted flow control[J]. Anal Chem, 2019, 91(7):4814-4820.
- [10] YANG W, LI X B, LIU G W, et al. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(8):3710-3713.
- [11] CHO I H, SEO S M, PAK E H, et al. Immunogold-silver staining-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography's[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(2):271-277.
- [12] PAROLO C, ESCOSURA-MUNIZ A, MERKOCI A. Enhanced lateral flow immunoassay using Gold nanoparticles loaded with enzymes[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 40(1):412-416.
- [13] 孙卫民, 黄远苟, 邓小燕, 等. 纳米金快速增敏免疫层析试验的研究[J]. 现代预防医学, 2013, 39(14):2683-2685.

(收稿日期:2020-01-09 修回日期:2020-05-08)

(上接第 2776 页)

- [10] WANG H, FANG L, JIANG J, et al. The cisplatin-induced lncRNA PANDAR dictates the chemoresistance of ovarian cancer via regulating SFRS2-mediated p53 phosphorylation[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(11):1103.
- [11] LIU J, BEN Q, LU E, et al. Long noncoding RNA PANDAR blocks CDKN1A gene transcription by competitive interaction with p53 protein in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2):168.
- [12] RIVANDI M, PASDAR A, HAMZEZADEH L, et al. The prognostic and therapeutic values of long noncoding RNA

PANDAR in colorectal cancer[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(2):1230-1236.

- [13] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of Bcl-2 family proteins[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3):175-193.
- [14] YAMAGUCHI R, LARTIGUE L, PERKINS G. Targeting Mcl-1 and other Bcl-2 family member proteins in cancer therapy[J]. Pharmacol Ther, 2019, 195(1):13-20.

(收稿日期:2020-01-12 修回日期:2020-05-11)