

免疫胶体金技术

* 以胶体金为标记物应用在免疫组织化学研究中，对细胞表面或细胞内的多糖、糖蛋白、蛋白质、多肽、激素和核酸等生物大分子进行定位研究

胶体金的基本概念

胶体金（金溶胶）---

指一种物质以 1 - 100 nm 大小的粒子分散在另一物质中所形成的体系。

被分散的物质--- 分散相

容纳分散相的另一种物质 --- 分散介质

按分散相的粒子大小不同，分三类：

分散系的分类

粗分散体系：分散相粒子直径>100nm

不稳定，显微镜下可见

*胶体分散体系：分散相粒子直径1—100nm

外观透明不浑浊，显微镜下不可见

分子-离子分散体系：分散相粒子直径<1nm

具有高度稳定性

胶体金的一般性状

1. 颜色

小颗粒 2 - 5 nm 橙黄色

中等颗粒 10 - 20 nm 红葡萄酒色

较大颗粒 21 -29 nm 深红色

大颗粒 30 - 80 nm 蓝紫色

2. 稳定性

介于分子离子分散体系和粗分散体系之间

相对稳定，又易出现聚沉

胶体金的制备

分散法:包括机械分散法、超声波法、电分散法和胶溶法等

凝聚法:包括物理凝聚法、化学凝聚法（氧化法、水解法和还原法）

化学还原法

【基本原理】在氯化金水溶液中加入一定量的还原剂，使金离子还原为金原子。在适当条件下，还原的金原子凝聚成一定大小的金颗粒，形成金溶胶。

【常用还原剂】柠檬酸钠、鞣酸、白磷等

柠檬酸钠还原制备的金颗粒直径较大，15~150nm

白磷还原制备的金颗粒直径较小，3~12nm

影响溶胶稳定性的因素

- 电解质
- 胶体金浓度
- 温度
- 大分子物质

胶体金的鉴定

【鉴定方法】在电镜下观察金颗粒的大小及金颗粒的均匀程度

【鉴定方法】将胶体金滴在覆有Formvar膜或碳-Formvar膜的镍网上，空气干燥，透射电镜下观察，拍照，测量金颗粒的直径，并计算100个以上胶体金颗粒直径的平均值及标准差

制备胶体金的注意事项

1. 玻璃器皿的清洁

玻璃器皿清洗→清洁液浸泡24h →流水冲→蒸馏水反复洗涤→晾干

2. 试剂配制

应尽量使用分析纯试剂

各种水溶液必须用三蒸水或去离子水配制

3. 影响胶体金颗粒大小的因素

加入还原剂的速度

搅拌是否均匀

制备胶体金所用的烧瓶大小

加热至100° C时间超过15min或保存时间太长

胶体金探针的制备

胶体金与蛋白质结合的原理

胶体金标记蛋白质的过程，实际上是蛋白质在等电点或稍偏碱时，被吸附于胶体金颗粒表面。

胶体金的预处理

标记之前将胶体金的PH值调至待标蛋白质的等电点或略偏碱

调节PH的方法：

当需要提高胶体金的PH值时，用0.2mol/L K₂CO₃或0.1mol/L KOH

当需要降低胶体金的PH值时，用0.1M HCL或醋酸

待标记蛋白质的处理

1. 透析除盐：将蛋白质溶液装入透析袋中，放在蒸馏水中透析，4℃过夜

2. 离心：10000 r/min, 4℃, 1h, 去除蛋白质聚合物等沉淀

胶体金蛋白质最佳结合率测定

不同直径的金颗粒，及不同分子量大小的蛋白质，其结合的比例是不同的
常用的检测二者结合量的方法有目测法和光电比色法

目测法

- 先将待标记蛋白质逐级稀释
- 取一批小试管，编号，每管内加已调好PH的胶体金100ul
- 按从低→高的浓度，将已稀释好的蛋白溶液，分别加入已编号的试管中，对照管只加不含蛋白的稀释液，混匀，静置5~10 min
- 各管分别加10%NaCl 10 μ l, 混匀，静置2hr，观察结果

光电比色法

利用分光光度计测各管580nm的OD值，然后以OD值为纵坐标，蛋白质浓度为横坐标作一曲线，取曲线

最先与横轴相接近的那一点的蛋白质浓度，即为最适稳定量

标记

1. 计算所需待标记蛋白质的总量

根据用以标记的胶体金溶液总体积及所测定的最适蛋白质稳定量,计算出所需待标记蛋白质的总量

2. 调节PH: 根据所标记蛋白质的等电点来调节胶体金的 P
3. 磁力搅拌下, 逐滴加入蛋白质溶液, 作用 5~15min
4. 继续磁力搅拌, 加入5%牛血清白蛋白, 使其终浓度为1%, 搅拌10min; 也可加3%聚乙二醇, 使其终浓度为0.05%

标记探针的纯化

* 纯化的目的

* 去除溶液中未标记的蛋白质, 未充分稳定的胶体金, 以及在标记过程中可能产生的各种聚合物

* 纯化的方法

超速离心法和凝胶过

标记探针的鉴定

1. 负染色检查: 将胶体金溶液滴在覆有Formavar膜(支持膜) 的镍网上, 空气中干燥, 醋酸铀负染, 透射电镜下观察
2. 生物活性鉴定: 可用直接或间接法放射免疫测定, 凝聚试验及免疫组化染色进行鉴定

免疫胶体金染色方法

免疫金染色法

【基本原理】

1. 直接法---将胶体金标记的一抗直接对标本进行染色,然后在光镜或电镜下观察
方法简单, 但一种探针仅限于检测一种抗原, 较局限
2. 间接法---先将未标记的特异性一抗与标本中的抗原结合, 然后加金标二抗或SPA与一抗结合, 在光镜或电镜下对抗原的分布进行定位研

【特点】

- * 阳性部位显红色
- * 染色程序简便, 不需显色或显影过程
- * 但一般要求金颗粒的直径>20nm, 并要求用高浓度的免疫金溶液

免疫金银染色法

<基本原理> 经免疫反应沉积在抗原位点处的胶体金颗粒作为一种催化剂, 在对苯二酚存在的情况下, 将显影液中的银离子催化还原成银原子, 可将抗原位点清楚显示出

光镜免疫金银法

在免疫金染色的基础上增加物理显影的步骤

显影液的配制及显影过程应在暗处进行

阳性部位呈黑色颗粒状

【IGSS法优点】

可被用于光镜和电镜观察

敏感性高

定位准确

背景清晰, 对比度好

方法简便, 安全

成本较低, 标本可长期保

彩色免疫金银染色法

【基本原理】

组织切片经IGSS染色后，抗原抗体反应部位生成的银颗粒通过铁氰化钾和溴化钾的作用，使银原子被氧化生成金属银；而彩色显影剂本身则被氧化，其氧化产物使显影剂由无色变为有色染料，并沉积在银颗粒的部位，而银颗粒被溶解

【优点】 特异性高，彩色影象鲜明，应用范围广

免疫胶体金技术的特点

1. 胶体金制备简便
2. 标记简单
3. 特异性强
4. 敏感性高
5. 定位准确
6. 适应性广
7. 易于双重和多重标记

免疫胶体金技术要点

胶体金概念及制备原理

影响溶胶稳定性的因素

制备胶体金的注意事项

胶体金标记前的准备工作

免疫胶体金染色方法的基本原理及特点