

胶体金标记抗体技术

韩刚毅

(济南军区军事医学研究所, 济南)

提 要

胶体金标记抗体技术是近十多年来免疫组织(或细胞)化学迅速发展起来的一项免疫标记技术。在国外许多研究领域已经得到发展,并逐渐受到国内同行的重视。本文介绍了胶体金标记抗体技术的原理、方法及其发展概况。

1962年 Feldherr^[1]等报道了用胶体金标记细胞进行电子显微镜的研究。九年后, Faulk (1971)^[2]利用胶体金标记抗血清,开创了用于电镜研究的免疫金染色法,简称“胶金法”(IGS: Immuno-Gold Staining method)。随着免疫组织化学和免疫细胞化学的发展,在荧光物质、放射性同位素、铁蛋白等标记物被广泛应用的同时,胶体金标记物也因其具有种种优点而越来越受到重视。

一、胶体金标记技术原理^[3,4]

胶体金是指分散相粒子直径在1—100nm的金溶胶。处于这种状态下的溶胶粒子能透过滤纸,但不能透过半透膜,属于多相不均匀体系。

溶胶的制备通常采用分散法(将较大粒子进一步粉碎成直径为1—100nm范围内的小粒子)和凝聚法(使溶液中的溶质分子聚集成直径在1—100nm范围内的多分子聚集体)。制备金溶胶主要是采用凝聚法。其原理是利用某些还原剂对金离子的还原作用使氯金酸水溶液中的金离子还原成金原子,进而再凝集成所需直

径的多分子聚集体粒子。“胶体金”就是指这种处于溶胶状态的金颗粒。

胶体金的颗粒表面带有较多的电荷,能够对蛋白质等高分子物质进行吸附结合。利用这种表面吸附作用,使蛋白质吸附在金溶胶颗粒表面就得到胶体金“标记”的蛋白质(或简称“金标蛋白质”)。由于在免疫组化研究中常用胶体金来标记抗体或葡萄球菌A蛋白(SPA)等,因此也称为“胶体金标记抗体技术”(Colloidal gold labelled antibody technique)。

金标抗体用于免疫组化研究时,吸附在胶体金表面的抗体能够象“向导”一样将胶体金颗粒载运到组织或细胞中的相应抗原位置。在光学显微镜下胶体金呈现的颜色可以显示抗原抗体性质和进行组织学定位研究。同时胶体金在电子显微镜下能呈现很高的电子密度,因此利用金标抗体也能在电镜下进行组织或细胞的免疫学定位、定性和定量研究。

二、金溶胶的制备方法

制备金标抗体可分为:金溶胶的制备、胶体金标记抗体及金标抗体的纯化和鉴定等几个

[20] Pogo, A. S. et al.: *The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix*, Alan R. Liss, Inc., NY, 1982, 233—33.

[21] Chen, J. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 825, 161.

[本文于1987年10月23日收到]

基本过程。其中制备金溶胶的方法直接关系到金标抗体的质量、使用和保存。通常是采用如下几种还原法制备胶金。

1. 白磷还原法

用白磷的饱和乙醚溶液在中性条件下加入沸腾的氯金酸水溶液，可以制备橙红色的胶体金。这种方法已建立 80 多年，在实际应用中得到了不断的发展，直到目前仍是制备 5—6nm 直径胶体金的主要方法^[4]。最近 Van Bergen 等(1986)^[5]利用白磷做还原剂进行重复多次还原，能够制备出直径较为均一的 5.6—12.1nm 胶体金，扩展了本方法的使用范围。

2. 柠檬酸钠还原法

Frens (1973)^[6]报道向沸腾的氯金酸水溶液中迅速加入柠檬酸三钠盐溶液能得到 15—150nm 直径的金颗粒。适当变换柠檬酸三钠的加入量，可选择控制金溶胶颗粒的大小(见表 1)^[7]。

表 1 柠檬酸三钠盐用量与金溶胶颗粒大小的关系

1%柠檬酸三钠 (ml)	2	1.5	1.0	0.6	0.42	0.32
0.01%氯金酸 (ml)	100	100	100	100	100	100
胶体金直径 (nm)	16	24.5	41	71.5	97.5	147

3. 柠檬酸-鞣酸还原法

Slot (1985)^[8]将氯金酸水溶液与柠檬酸和鞣酸的碱性溶液在 60℃ 条件下剧烈搅拌混合，得到直径为 5nm 左右的胶体金。调节鞣酸的加入量可将金溶胶颗粒直径控制到 3.3nm。此方法采用鞣酸作为附加还原剂，克服了柠檬酸钠还原法不适用于制备直径在 15nm 以下胶体金的不足。由于鞣酸的用量与胶体金直径相关，所以也称“鞣酸法”(Tannic acid method)。

4. 抗坏血酸还原法

Stathis (1958)^[9]报道的抗坏血酸还原法，在目前主要用于制备颗粒直径为 12nm 左右的金溶胶。此方法要控制反应在冰浴条件下进行，温度增高会使溶胶颗粒增大和不均匀。将氯金酸溶液与碳酸钾溶液先混合，再加入抗坏血酸水溶液后，溶液颜色立即变为紫红色。补

加足够量的双蒸水后加热搅拌至沸腾，待反应液颜色变为红色，用碳酸盐调节 pH 到 9 左右就可用于标记抗体(如用于标记 SPA 则应将 pH 调到 6 左右为宜)^[7]。

5. 四氢硼钠还原法

四氢硼钠是化学合成中应用较多的醛酮还原剂，具有还原反应温和、选择性好、易溶于水溶剂等优点。Tschopp 等(1982)^[10]将四氢硼钠作为还原剂，在冰冷却条件下将 0.6ml 1% 氯金酸和 0.2ml 0.2mol/L K_2CO_3 加入 40ml 双蒸水中。边搅拌边快速加入新配制的 0.05% 四氢硼钠溶液，直到溶液颜色由紫变为橙红色，得到颗粒直径为 2—5nm 的金溶胶。

6. 硫氰酸盐还原法

1985 年 Baschong^[11]等人报道 NaSCN 或 KSCN 作为还原剂，在室温下还原氯金酸能制备直径 2.6nm 左右的胶体金。这种方法制备的胶体金颗粒均一性好，不需进一步分离纯化就能用于电镜标记。由于金溶胶的颗粒较小，其结合蛋白质 (SPA) 后用于免疫标记，能得到较高的标记密度。可增强电镜下免疫细胞化学研究的分辨力。

7. 乙醇-超声还原法

Baigent (1980)^[12]曾提出在中性的氯金酸溶液中加入乙醇，再经超声波振荡可制备直径 6—10nm 的金溶胶。

制备金溶胶，除上述几种还原剂以外，采用过氧化氢、氢、一氧化碳、硫化氢、醛类、肼类以及甘油、糖等具有还原能力的物质，也都能还原氯金酸得到金溶胶。然而在免疫组织化学中用于免疫标记的胶体金要求颗粒均匀、外形一致和稳定性好。并非所有方法都能满足这些要求。上述几种还原方法中，应用较多的是前 4 种方法^[3]。

在制备金溶胶的过程中，保持所有玻璃仪器绝对清洁，是实验成功的关键。很微量的杂质污染就有可能导致制备的溶胶混浊或颗粒大小不均匀。实验所用的各种试剂都必须采用全玻璃重蒸馏水配制。试剂配制好后要用微孔滤器或滤膜过滤并保存在 4℃ 或尽快地用于标

记,以免在放置过程中颗粒聚集或生长细菌^[7]。

三、胶体金标记蛋白质

1. 标记条件和影响因素

胶体金标记蛋白质的最大特点是,在金标蛋白质中金颗粒与蛋白质分子之间并无共价键联系,二者是通过异性电荷之间存在的范德瓦尔斯引力相结合的。胶体金的整个标记过程对蛋白质的生物活性影响很小,且易获得较高的标记率。由于胶体金标记蛋白质主要属于物理过程,因此标记体系的 pH 值、电解质浓度,以及被标蛋白质用量等因素相对来说更为重要。^[3]

制备金溶胶通常选用中性 pH 条件。对于 SPA 的标记,可选在 pH5.9—6.2 之间,标记抗体则要求标记体系的 pH 值略高于抗体分子的等电点。对于混有多种大分子的样品,如多价免疫球蛋白或抗血清的标记,实际上很难满足体系中各种蛋白质分子的等电点要求。为了取得较好的标记条件,可将待标蛋白质(如亲合层析纯化的抗体)用 pH9 的低离子强度缓冲液透析,同时将胶体金的酸碱度也用碳酸盐调到 pH9 进行标记^[3]。

影响标记是否成功的另一个重要因素是金溶胶与被标蛋白质的用量比例。通常蛋白质的用量决定于金溶胶的颗粒大小。当氯金酸用量恒定时,金颗粒的直径越小,颗粒所具有的总表面积就越大,能被标记的蛋白质量也越大。由于制备金溶胶过程的操作误差会造成胶体金颗粒的不均匀性,也由于不同蛋白质之间稳定点浓度的差异,因此在从事标记工作时,最好每次标记实验都测定出具体的稳定点,以保证能获得最佳标记率^[3]。

测定稳定点可采用如下方法:在一排小试管内各加入 0.25ml 胶体金,然后加入逐级稀释的蛋白质(待标抗体或 SPA)。1 分钟后各加入 0.25ml 10% NaCl,混匀后观察各管颜色变化。临近颜色由红变蓝的最低蛋白质浓度就是其稳定点。该稳定点的蛋白质浓度就是标记时蛋白质与金溶胶的最小标记比。只有满足这个标记比,才能够较好地保持标记物的稳定性^[44]。

2. 金标蛋白质的分离纯化

上述各种制备胶体金的方法所得到的金颗粒直径,是指大多数颗粒的平均直径。实际制备时得到的,是各种近似直径颗粒的混合物,同时还混有未参与标记的过量抗体等成分。因此,若要取得颗粒直径较为均一纯正的金标蛋白质,除严格控制金溶胶的制备工艺外,在标记后选择合适的纯化方法也是十分关键的。这对于用电镜进行双、多重免疫组化研究尤其重要^[43]。

金标蛋白质的分离纯化与同位素、荧光素、发光剂及酶标抗体的纯化方法不同。其主要特点是金标抗体的质量大,并且以溶胶形式存在,对纯化过程中的 pH 值和强电解质浓度的变化,以及某些杂质的存在等因素较为敏感。不易采用硫酸铵盐析、离子交换层析、亲和层析等常规方法进行分离。目前主要是应用超速离心和凝胶过滤两种纯化方法。

(1) 超速离心法^[43] 先采用低速离心去除较大的金颗粒,再经超速离心将金标蛋白质的溶胶颗粒沉降下来,体系中未与金溶胶结合的蛋白质残留在上清液中被弃去。用含牛血清白蛋白或聚乙二醇的磷酸盐缓冲液重复离心,再洗涤几次就得到了较纯的金标蛋白质。不同方法制备的胶体金,根据其颗粒大小需采用不同的离心力和离心时间。

在超速离心过程中,沉降于离心管底部的溶胶由于局部浓度过高,并由于较大离心力的作用,易发生胶金颗粒相互凝集而导致纯化回收率的下降。Slot 等(1984)^[43] 建议采用 10—30% 蔗糖或甘油连续浓度梯度离心纯化金标抗体。采用此方法不仅制备量大、操作简便、得率高,而且纯化的金标蛋白质颗粒直径均一性好,能够适应电镜水平的双重或多重胶体金标记的需要。

(2) 凝胶过滤法^[44] 将制备的金标蛋白质混合物经过初步浓缩后,用丙烯葡聚糖 S-400 柱层析(Sephacyl S-400 或 S-300, Pharmacia)。按颜色深浅,分部收集流出组分。较大颗粒的聚合物或一些杂质先流出,中间流出的是

清彻透明的深红色区带,这就是纯化的金标蛋白质。未被标记的蛋白质成分最后流出。为了能够准确地收集柱内流出组分,可在样品中混入少量的标有异硫氰酸荧光素的蛋白质,使它们与金标蛋白质一起过柱分离。根据荧光素-蛋白质在层析时的存在部位,确定能分离开金标抗体与未标抗体的最佳收集组分。由于凝胶过滤时,样品中所含的聚乙二醇可将胶体金吸附在柱内,而不容易洗脱,所以采用凝胶过滤的方法纯化金标蛋白质时,最好选用牛血清白蛋白作为金溶胶的稳定剂。

凝胶过滤法的优点是,在整个纯化过程中,金标蛋白质颗粒始终以较低浓度存在于柱内,不易形成聚集体。但是凝胶过滤法纯化过程对颗粒直径的筛选能力差,采用这种方法纯化的金标蛋白质颗粒直径主要取决于金溶胶的制备方法。为了取得较好的纯化结果,也可以将凝胶过滤法与超速离心法配合使用。

3. 金标蛋白质的鉴定

纯化的金标蛋白质,主要鉴定其吸收光谱、颗粒均匀程度和平均直径等指标,以及进行免疫标记的特异性和敏感性实验。

(1) 吸收光谱性质^[7] 金溶胶颜色与其颗粒直径的大小有关。扫描测定金溶胶在 360—700nm 波长范围内的吸收光谱特征,也是质量鉴定的一种方法。直径为 5—18nm 的金溶胶,主要吸收波长为 520—550nm 左右的绿色光,溶胶呈橙红色。金溶胶颗粒直径增加,则吸收峰波长增加。直径为 60nm 的金溶胶吸收波长为 600nm 的橙黄色光、溶胶呈现蓝紫色。胶体金颗粒直径不均匀则光谱吸收峰变宽。当其中所含的较大颗粒被离心去除后,则吸收峰又变狭。

金标抗体与组织切片中的相应抗原结合后,所得到的阳性结果在普通光镜下多数呈现橙红色。采用暗视野显微镜观察时,有胶体金存在的组织部位呈现金黄色。

(2) 颗粒直径和均一性^[7] 金标蛋白质的颗粒直径是指 100 个颗粒的平均直径。测定时可将纯化好的金标蛋白质滴在有支持膜的镍网上,在空气中自然干燥后,于电镜下观察并计算

颗粒的大小及其均匀程度。

(3) 生物学性质^[4] 金标抗体的特异性和敏感性测定,可用已知结果为阳性和阴性的组织切片进行染色对照。也可采用免疫组化滤纸模型代替组织切片进行检测。后者效率高且操作更为方便。

4. 金标蛋白质的保存^[43]

影响金标蛋白质保存的重要因素之一是体系中所含强电解质的浓度。少量的电解质能够对金溶胶起稳定作用,但电解质浓度略高则可能破坏胶体颗粒表面的扩散层,导致溶胶失去稳定性而很快凝集。所以在标记时应预先将蛋白质溶液进行透析,去除多余的电解质。经纯化后的金标蛋白质,除加入必要的缓冲液外,也应尽量减少其中电解质的含量,以免引起胶体凝集。

按照胶体化学理论,溶胶中含有高分子物质能够增加胶体的稳定性。因此在制备好的金标蛋白质中再加入一定量的牛血清白蛋白或聚乙二醇作为稳定剂,可以对保存中的金标蛋白质试剂起到相应的稳定作用。通常以牛血清白蛋白稳定金标抗体而用聚乙二醇稳定金标 SPA。

金标蛋白质的保存浓度与保存时间有一定关系。浓度过高易引起胶体凝集。在不影响使用的情况下,浓度略低些有利于溶胶的长期保存。

在 4℃ 并有 0.02% 叠氮钠存在时,金标抗体可保存数月。如经过 45% 甘油/磷酸盐缓冲液透析后置 -18℃ 保存或采用 100 μ l 量封装于低浓度甘油中置 -70℃ 条件下,则保存时间会更长。

以往曾认为胶体金标记物无法制成冰干品。而最近 Baschong 和 Roth (1986)^[42] 报道将 8nm 和 14nm 直径的胶体金标记物经甘油的连续密度梯度离心纯化后,加入 Carbowar-20000 和吐温 20,经透析后,能够用干冰-乙醇冰冻干燥成冻干品。采用这种方法冻干的金标-SPA、金标-Lectin 和金标辣根过氧化物酶在 4℃ 的干燥状态,可保存原活性半年之久。

5. 金溶胶的标记范围^[3,4]

胶体金除能够标记抗体和 SPA 外,还能用来标记酶、激素、毒素、多糖、糖蛋白、脂蛋白、刀豆球蛋白 A 和植物凝血素 (Lectin) 等大分子物质。而用胶体金标记小分子物质得到的标记物稳定性较差。因此,曾有人采用先将小分子物质偶联到牛血清白蛋白分子上,然后再用胶体金进行标记的方法,得到了较稳定的胶金标记物^[3]。

6. 金标抗体的商品化^[4,6]

在国外已有商品化的金标抗体供应。需要订购时应注意商品试剂所含抗体的动物种属和胶金颗粒直径等有关指标。例如:标明规格为“GAHu G15”的药盒意为 15nm 直径的胶体金标记羊抗人抗体 (Goat Anti-Human/IgG Gold granular size 15nm),又如金颗粒直径为 20nm 的羊抗兔抗体应写成“GAR G20” (Goat Anti-Rabbit/IgG Gold Granular size 20nm)。由于金标抗体保存期限较短,所以订货时还应慎重考虑试剂的生产和使用时间,以免造成不必要的浪费。

四、应 用

1. 光镜水平的应用^[17,18]

IGS 在光镜水平的应用较电镜晚。一般都采用“间接法”进行,即先用高特异性的“一抗”与抗原反应,再用胶金标记的“二抗”与“一抗”结合,然后观察组织中胶体金的分布情况。此方法用于免疫组化研究,具有操作程序少、染色深浅易控制、制片稳定、呈色鲜明、结果保存时间长、试剂无毒害以及能够用于暗视野显微镜观察等优点。但由于金标“二抗”用量大、成本较高,因此又在 IGS 法的基础上发展出“免疫金银染色法”(IGSS: Immuno-Gold-Silver Staining method)。IGSS 是利用金溶胶中的金能催化银离子还原的原理,在用免疫金染色后,再用银显技术增强金标抗体在光镜下的可见性。IGSS 方法除具有上述 IGS 的优点外,还具有非特异性着色低,节省抗体等特点。其灵敏度较 PAP 方法高 200 倍。是目前最敏感的免疫

组化方法。在临床病理诊断中,IGSS 属于一项非常有发展前途的检测技术。

2. 电镜水平应用^[19]

免疫胶金技术已在电镜水平的免疫组化研究中得到广泛应用。其所以能成为电镜下较为理想的免疫标志物主要是有如下几方面的优点:

(1) 胶体金颗粒在电镜下具有很高的电子密度,大小颗粒都清晰可辨,且不影响对原有超微结构的观察。在进行适当衬染后,可对被检抗原或抗体进行组织或细胞的定位观察。

(2) 通过计量被检部位的金颗粒,可以对被检抗原或抗体的存在情况进行细胞学超微结构免疫定量研究。

(3) 采用不同直径的金标抗体进行免疫组化的双重或多重标记染色,能在一张电镜图片上同时显示出两种或多种被检物质的组织或细胞学超微结构分布状况。还可以配合 PAP 或铁蛋白等染色法进行双重或多重标记研究。

(4) IGS 的制片技术可略去 H_2O_2 等试剂的蚀刻处理过程。因此能较好地保持组织和细胞的原有细微结构。且操作过程也较 PAP 法简便。

五、结 语

80 年代初,胶体金标记技术在国外就已受到广泛的重视,而国内至今仅偶有少数几篇文章报道^[20]。其主要原因之一,就是目前国内缺少商品化的金标抗体或药盒供应,而且胶体金的制备和标记技术尚未被广泛掌握,以至许多期望从事此项技术研究的学者因缺少试剂而无法顺利开展工作。本文概略地介绍了胶体金标记物的制备技术,以期开展此项工作的同行提供信息。随着胶体金标记技术在我国的不普及,势必为免疫组织化学和细胞化学的研究工作带来新的起色。

参 考 文 献

- [1] Feldherr, CM. et al.: *J. Cell Biol.*, 1962, 12, 649.
- [2] Faulk, WP. et al.: *Immunochemistry*, 1971, 8, 1021.

大肠杆菌系统中外源蛋白分泌的研究

陈永青 刘 坚

(复旦大学生物系,上海)

提 要

要使基因工程产物达到工业化生产的规模,不仅要解决基因的高表达,还需要解决产物的分泌问题。

大肠杆菌系统中外源蛋白分泌的主要障碍是外膜,从遗传和生化两方面研究入手,通过定点突变、基因融合、构建分泌型载体等方法将可能阐明分泌的机制并找到有效的应用途径。

基因工程技术,除了解决外源基因的克隆和表达以外,还有一个外源蛋白的分泌问题需要解决。这是关系到能不能有效地投入工业化生产的问题。

一、生物工程研究中的新课题

基因工程技术的发展,为用微生物合成和生产外源蛋白展示出广阔的前景。商业生产已开始瞄准医药、食品、化工等重要的生物工程产品市场。用基因工程手段生产的蛋白,每年将创造出几十亿美元的财富。

重组 DNA 技术的深入研究表明,许多真核生物的蛋白可以由细菌产生(表1)。

表1 用基因工程手段由大肠杆菌产生的有经济价值的某些外源蛋白^[1]

蛋 白	占细胞总蛋白的百分率(%)
人白细胞介素-2 (human interleukin-2)	10
人的生长激素 (human growth hormone)	16—27
人 γ -干扰素 (human γ -interferon)	16
小牛前凝乳酶 (calf prochymosin)	5
牛生长激素 (bovine growth hormone)	30

表达的高低固然是一个重要的问题,而能

[3] Romano, EL. et al.: *Immunolabelling For Electron Microscopy*, Acad. Press, New York, 1984, 3—15.

[4] Handley, DA. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1983, 174, 1.

[5] Van Bergen, H. et al.: *Histochemistry*, 1986, 85, 81.

[6] Frens, G.: *Nature Phys. Sci.*, 1973, 241, 20.

[7] Hodges, GM. et al.: *Immunolabelling For Electron Microscopy*, Acad. Press, New York, 1984, 190—233.

[8] Slot, JW. et al.: *Ultramicroscopy*, 1985, 15, 383.

[9] Stathis, EC. et al.: *Chem. Ind (London)*, 1958, 27, 860.

[10] Tschopp, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 7474.

[11] Baschong, W. et al.: *Histochemistry*, 1985, 83, 409.

[12] Baigent, CL. et al.: *Experientia*, 1980, 36, 472.

[13] Slot, JW. et al.: *Immunolabelling For Electron Microscopy*, Acad. Press, New York, 1984, 129—142.

[14] Wang, BL. et al.: *Histochemistry*, 1985, 83, 109.

[15] Baschong, W. et al.: *Histochem. J.*, 1986, 17, 1147.

[16] Paatero, GIL. et al.: *Cell Mol. Biol.*, 1987, 33, 13.

[17] Handley, DA. et al.: *Eur. J. Cell Biol.*, 1987, 43, 163.

[18] Birrell, GB. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 1986, 34, 339.

[19] Singer, SJ. et al.: *J. Electron Microsc.*, 1987, 36, 63.

[20] 夏诗茂等:《中国医学科学院学报》,1987,9(1), 50.

[本文于1987年10月12日收到]