

学校编码: 10384
学号: 200326092

分类号_____密级_____
UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

胶体金免疫层析法在快速检测尿液CK19及血
浆D-二聚体中的应用

Application of colloidal gold-based immunochromatographic
assay in the rapid detection of Urinary CK19 and
Plasma D-dimer

葛金梅

指导教师姓名: 彭宣宪教授

张忠英教授

专业名称: 生化与分子生物学

论文提交日期: 2006年7月日

论文答辩时间: 2006年7月6日

学位授予日期: 年 月 日

答辩委员会主席: 陈清西教授

评阅人:

2006年7月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：葛金梅

2006年7月8日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（），在 2007 年解密后适用本授权书。

2、不保密（）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：葛金梅

日期：2006 年 7 月 8 日

导师签名：彭宣宪 张忠英

日期：2006 年 7 月 8 日

摘要

血浆 D-二聚体是交联纤维蛋白的特异性降解产物,是继发性纤溶亢进的敏感和特异指标。在各种单层上皮细胞中广泛分布的细胞角蛋白(cytokeratin, CK) 19 片段,已经成为膀胱移行细胞癌诊断和预后的指标。

本课题将胶体金免疫层析法应用于尿液CK19及血浆D-二聚体的检测,探索研制了两种试剂盒:一种适用于膀胱癌高危患者的廉价、快速、简便的初筛,另一种适用于排除疑为血栓性疾病(如肺栓塞)患者进一步做静脉造影或超声检查的快速、简便、有效的筛查诊断。为了达到理想效果,本课题从胶体金的制备、胶体金溶液 pH 值调节、标金抗体和包膜抗体的选择、标金抗体用量、标金抗体的浓度以及包膜抗体和二抗的浓度等方面对胶体金免疫层析法的条件进行了优化。

应用双抗体夹心法,以标金单抗 Ks19.2(BM19.21)为检测试剂,以包膜单抗 A53-B/A2 作检测线,以羊抗鼠 IgG 为质控线,制备检测尿液 CK19 的胶体金免疫层析试纸条。收集 60 例临床尿液 CK19 样本,以 4.0ng/ml 为临界值,阳性样本 32 例,阴性样本 28 例,用本课题研制的胶体金免疫层析试纸条(检测临界阈值为 4.0ng/ml)与电化学发光免疫分析仪(对尿液 CK19 定量分析)作对照检测,并分析结果。临床验证结果显示,本课题研制的胶体金免疫层析试纸检测尿液 CK19 灵敏度/特异性为 96.9%/94.0%,阴性预测值/阳性预测值为 96.3%/94.0%,与电化学发光免疫分析仪有很好的相关性。较高的灵敏度和阴性预测值以及操作快速、简便、结果直观、不需贵重仪器等特点,使它适用于临床对高危膀胱癌患者的初筛。

应用双抗体夹心法,以标金单抗 M01102704 为检测试剂,以包膜单抗 M01102703 作检测线,以羊抗鼠 IgG 为质控线,制备检测血浆 D-二聚体的胶体金免疫层析试纸条。收集了 300 例临床血浆 D-二聚体样本,以 500ng/ml 为临界值,其

中阳性样本 178 例，阴性样本 122 例，用本课题研制的胶体金免疫层析试条(检测临界阈值为 480ng/ml) 与基于免疫比浊原理的 ACL FUTURA 凝血仪做对照检测，并分析结果。临床验证结果显示，本课题研制的胶体金免疫层析试纸检测血浆 D-二聚体灵敏度/特异性为 96.4%/93.6%，阴性预测值/阳性预测值为 95.3%/93.6%，与 ACL FUTURA 凝血仪有较好的相关性，较高的灵敏度和阴性预测值以及操作快速、简便、不需特殊仪器等特点，使它适用于临床对血栓性疾病诊断的初筛。

本研究将胶体金免疫层析法应用于尿液CK19及血浆D-二聚体的检测，为二者的临床检验提供了一个操作简便、价格合理、快速且有效的检测方法。

关键词：胶体金免疫层析法；细胞角蛋白19；D-二聚体

ABSTRACT

Plasma D-dimer generated from the degradation of cross-linked fibrin, are specific markers of the activation of coagulation. Cytokeratin 19 (CK19) are widely distributed in various epithelial cells. Urinary CK19 has become a prognostic and diagnostic marker for transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder.

The objective of the study is to establish a colloid gold-based immunochromatographic assay (GICA) for detecting the urinary CK19, which will make the screening of bladder cancer sensitive, cheap, rapid, simple and convenient; and to establish a GICA for detecting the plasma D-dimer, which can be used as a sensitive, rapid and simple screening reagent for excluding the patients with suspected VTE(DVT or PE) from further performing phlebography or ultrasound examination. The negative D-dimer test in selected patients could be helpful in reducing the number of sonograms performed for diagnosis of DVT or PE.

Methods: Colloidal gold with a serial of sizes of particle were prepared. To enhance the sensitivity, optimization of the labeling was achieved by selecting the best PH of colloidal gold solution, combination of antibody labelled with colloidal gold and the antibody immobilized on the nitrocellulose membrane was optimized, the concentration and content of antibody labelled with colloidal gold and the concentration of antibodies immobilized on the nitrocellulose membrane as test line and control line were optimized. Thus the conditions were determined.

Results : On the basis of the sandwich format, the monoclonal antibody Ks19.2(BM19.21) against CK19 labelled with colloidal gold was used as detector, the monoclonal antibody A53-B/A2 against CK19 was used as test line, and the goat anti-mouse IgG was used as control line.60 clinical urinary CK19 samples were collected (with 4.0ng/ml as the cut-off value,32 positive and 28 negative). With

electrochemiluminescent immunoassay (quantitative analysis) examination of the 60 clinical urinary CK19 samples as control, the GICA strip (with a detection limit of 4.0ng/ml) had the sensitivity of 96.9%, the specificity of 94.0%, the negative predictive value of 96.3%, and the positive predictive value of 94%, which were closely correlated with those of electrochemiluminescent immunoassay. GICA established in this study is simple, rapid, sensitive and specific for detecting urinary CK19 and is potentially useful in developing reagent kits as screening method for clinical use.

On the basis of the sandwich format, the monoclonal antibody M01102704 against D-dimer labelled with colloidal gold was used as detector, and the monoclonal antibody M01102703 against D-dimer was used as test line, and the goat anti-mouse IgG was used as control line. 300 clinical plasma D-dimer samples were collected (with 500ng/ml as the cut-off value, 166 positive and 134 negative). With ACL FUTURA (quantitative analysis) examination of the 300 clinical plasma D-dimer samples as control, the GICA strip (with a detection limit of 480ng/ml) had the sensitivity of 96.4%, the specificity of 91.8%, the negative predictive value of 95.3%, and the positive predictive value of 93.6%, which were closely correlated with those of immunoturbidimetry. GICA established in this study is simple, rapid, sensitive for detecting plasma D-dimer and is potentially useful for instant diagnosis in emergency department.

Conclusion: The GICA for detecting urinary CK19 was established. The dipstick assay based on the strip is rapid (<10min) and easy to perform with no requirement of special skill, reagent or equipment. The high sensitivity (96.9%) and negative predictive value (96.3%) suggest the GICA strip is an acceptable alternative to be used in clinical laboratories lacking specialized equipment as well as for screening diagnosis. The high sensitivity and negative predictive value of GICA strip for detecting plasma D-dimer are useful in screening patients with suspected DVT or PE.

Keywords: colloidal gold-based immunochromatographic assay; cytokeratin 19; D-dimer

目 录

摘要.....	i
英文摘要.....	iii
缩略词.....	viii
第一章 前言	1
1 胶体金.....	1
2 胶体金标记及其应用.....	2
3 免疫胶体金技术及其在临床检测中的应用.....	3
4 D-二聚体.....	7
5 CK19.....	15
6 研究目的及主要内容.....	17
第二章 快速检测血浆D-二聚体胶体金免疫层析法的建立	
及其应用的研究	18
1 材料.....	18
2 方法.....	19
3 结果.....	23
4 讨论.....	34
第三章 快速检测尿液CK19胶体金免疫层析法的建立	
及其应用的研究	37
1 材料.....	37
2 方法.....	38
3 结果.....	40
4 讨论.....	45
小结.....	48
参考文献.....	49

CONTENTS

Abstract in Chinese	i
Abstract	iii
Abbreviations	Viii
Chapter 1 Introduction	1
1 Colloidal gold.....	1
2 Colloidal gold labeling and its application.....	2
3 Immuno-collidal gold techniques and their application in clinical laboratory.....	3
4 D-dimer.....	7
5 CK19.....	15
6 Popose of this thesis.....	17
Chapter 2 Establishment of GICA for rapid detecting plasma D-dimer and its application	18
1 Materials.....	18
2 Methods.....	19
3 Results.....	23
4 Discussion.....	34
Chapter 3 Establishment of GICA for rapid detecting urinary CK19 and its application	37
1 Materials.....	37
2 Methods.....	38
3 Results.....	40
4 Discussion.....	45
Conclusion	48
References	49

缩略词

英文缩写	英文全称
GIFA	gold immunofiltration assay
GICA	gold immunochromatography assay
FDP	fibrinogen degradation products
PE	pulmonary embolism
DVT	deep vein thrombosis
VTE	venous thrombo-embolism
AMI	Acute Myocardial Infarction
DIC	disseminated intravascular coagulation
ECLIA	electrochemiluminescent immunoassay
CK	cytokeratin

第一章 前言

1 胶体金

胶体金的发现及基本特征

1857年, 法拉第用还原法从氯金酸溶液制备胶体金(colloidal gold), 并发现在其中加入少量电解质后, 可使胶体金由红色变为蓝色, 终至凝集为无色; 而加入明胶或其它大分子物质便可阻止这种变化, 他的重大发现奠定了胶体金制备和应用的科学基础。

胶体金^[1-13]是指金的一种存在状态, 也称金溶胶, 是氯金酸(HAuCl_4)被还原成原金后形成的金颗粒悬液, 属多相不均匀体系。胶体金颗粒由一个基础金核(原子金Au)及包围在外的双离子层构成。紧联在表面的是内层负离子(AuCl_2^-), 外层离子层 H^+ 则分散在胶体间溶液中, 以维持胶体金游离于胶体间的悬液状态。胶体金颗粒大多在1-150nm之间, 微小金颗粒稳定地、均匀地、呈单一分散状态浮悬在液体中, 形成金溶胶。根据不同直径的金颗粒, 胶体金溶液呈现出橙红色、红色、酒红色、紫红色、紫色等各种颜色, 并在可见光范围内有一单一光吸收峰, 该吸收峰随金颗粒大小而发生变化。因此, 在评价金颗粒质量好坏的时候, 不仅可以通过在透射电镜下观察, 拍片放大后测量的方法, 而且可以根据吸收峰波长查表后, 直接得出颗粒直径的具体数值, 通过其峰形直观了解颗粒的均一程度。

胶体金的制备

胶体金制备主要有分散法与凝聚法。还原法是最常用的一种化学凝聚法, 即在氯金酸水溶液中加入各种还原剂, 如白磷、柠檬酸、鞣酸等, 使之还原并聚集形成不同直径金颗粒的胶体金溶液。还原剂种类和剂量的不同, 可以控制所产生的胶体

金粒子的大小。即粒子的大小取决于反应溶液中最初还原剂和还原核的数量。还原剂浓度越高，核浓度也越高，氯金酸的还原也就从更多的还原中心开始，因此产生的胶体金粒子数量越多，但体积也越小。粒子直径每增加一倍，数量减少为原来的1/80。

目前，制备胶体金的方法有Stathis和Fabrikanos建立的抗坏血酸还原法、Frens建立的柠檬酸三钠还原法、Baigent和Muller建立的乙醛超声波还原法、Kent和Allen建立的放射性胶体金的制备方法、Tschopp等建立了硼氢化钠还原法、Slot和Gueeze建立的柠檬酸三钠-鞣酸还原法、Henegoumen建立的白磷还原法及白磷还原法的改良法等。这些制备方法可以制备出直径1-500nm的胶体金粒子，但作为免疫标记探针，其直径要求一般在3-50nm的范围内。

一般认为柠檬酸三钠法制备各种不同直径的胶体金颗粒，其分散性及均匀度优于抗坏血酸法或白磷法，并且可以获得较好的标记效果。因此，制备10-50nm胶体金颗粒时多采用柠檬酸还原法。有文献报道，金颗粒大小在5-20nm时，为标记抗体和肉眼观测的最佳值，如金颗粒直径大于20nm，易造成金颗粒与标记物的分离，金颗粒小于5nm，肉眼不易观察到检测结果。因此本文采用柠檬酸三钠法制备胶体金溶液，本研究选用其中颗粒大小为15nm的胶体金溶液制备胶体金层析试纸条。

2 胶体金标记及其应用

胶体金作为标记物的特点

胶体金标记，实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的过程。吸附机理可能是胶体金颗粒表面负电荷，与蛋白质的正电荷基团因静电吸附而形成牢固结合。

胶体金具有胶体的多种特性，特别是对电解质的敏感性，电解质能够破坏胶体金的外部水化层，从而打破胶体的稳定状态，使分散的单一金颗粒凝聚成大颗粒，从而从溶液中沉淀下来。因此，在标记的过程中，体系的离子强度、pH值和被标记

蛋白的量是决定标记是否成功的关键。

胶体金标记具有许多其它标记物所不可替代的优点：电子密度高，形状规则，在电镜下易于识别；对蛋白质有很强的结合能力，并且不影响蛋白质分子的生物活性；根据还原剂类型及还原剂作用的强弱，可制备不同粒径的金颗粒，且还可以用作双重甚至多重标记，使定位更加准确；不存在内源酶干扰及放射同位素污染等问题。因此，胶体金已成为基础研究和临床检验中非常有用的工具，胶体金标记技术已成为继荧光素、酶、同位素及胶乳标记技术之后的又一新型标记技术。

胶体金标记的应用

胶体金标记技术问世二十多年来发展十分迅速，现已广泛的应用于电镜、流式细胞仪、分子生物学以至生物芯片、免疫印迹、蛋白染色、体外诊断试剂盒的制造等领域。1971年Faullk 和Taytor^[7]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。

3 胶体金技术及其在临床检测中的应用

免疫胶体金

在特定条件下，使胶体金溶液和某种蛋白质溶液相混合，胶体金颗粒便可吸附在蛋白质分子表面上，若包被的蛋白为分子量较大的抗体，则胶体金颗粒便布满抗体表面，形成一种示踪物或探针，用此胶体金粒子可以检测其包被抗体对应的抗原；反之，若以胶体金颗粒包被抗原，则可用其检测该抗原对应的抗体。上述两类包被胶体金统称为免疫胶体金。

胶体金免疫检测技术的两种主要模式

以微孔膜为固相载体，包被已知抗原或抗体，加入待测样本后，经微孔膜的渗透作用或毛细管虹吸作用使标本中的抗体或抗原与膜上包被的抗原或抗体结合，再通过胶体金标记物与之反应形成红色的可为肉眼观察到的结果。这为不需要特殊仪

器的试纸条或试剂盒的免疫检测提供了可能。

目前，胶体金免疫检测技术中使用最广泛的有两种主要模式：穿流形式 (Flowthrough)，又称斑点免疫金渗滤试验 (Dot immuno-gold filtration assay, DIGFA) 或胶体金免疫渗滤试验 (gold immunofiltration assay, GIFA); 另一种为侧向横流形式 (Lateral flow)，又称为胶体金免疫层析试验 (colloidal gold-based Immunochromatographic assay, GICA)。

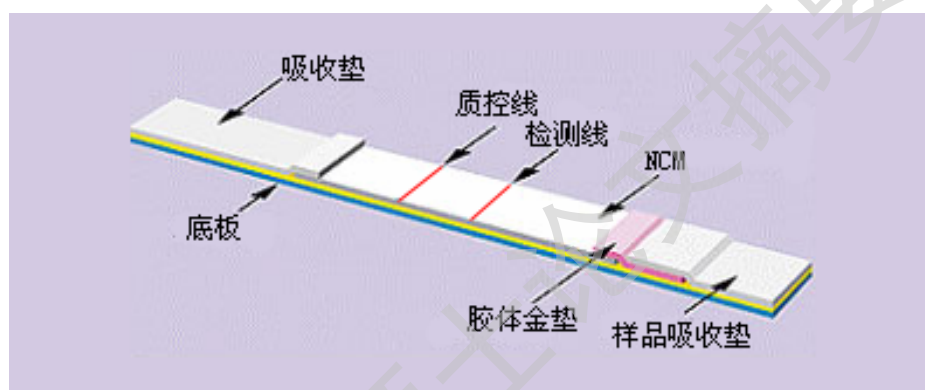
GIFA 始建于 1985 年^[8]，以酶作为被标记物。1989 年发展了以胶体金为标记物用于检测艾滋病病毒抗体的渗滤试验^[9]，确立了 GIFA 的基本技术。GIFA 充分利用了微孔滤膜吸附蛋白质的优良特性、渗滤装置独特的设计以及胶体金作为标记物种优点，使得抗原或抗体不仅能与膜上的抗体或抗原快速结合，还能有效地浓集于膜上加快免疫反应，胶体金瞬时显色报告检测结果。反应根据待测物的不同，可选择不同的试验方法，该方法特别适合于抗体的检测。

GICA 是 20 世纪 90 年代初在免疫渗滤技术的基础上建立的一种简易快速的免疫学检测技术^[10-11]。GICA 所用的免疫层析条主要由玻璃纤维膜(吸收垫)、金标垫、硝酸纤维膜(反应垫)、吸水垫(手柄纸)组成，将四种膜从底部向上按顺序粘在支持物上并切成条即成(图 1.1A)。检测时，只需将测试条插入待测液中，平放在桌面上，5 分钟后观察结果即可。

GICA 技术主要有：双抗体夹心法和竞争法。竞争法适用于检测具有单一抗原表位的小分子抗原(如吗啡和苯丙胺等)，常用于违禁药物的检测。而双抗体夹心法通常用于检测具有多个抗原位点、分子质量大的抗原物质的分析，如绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG)、人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、D-二聚体和 CK19 等。双抗体夹心法的原理以 HCG 为例：当测试条插入待测尿液或血清中进行检测时，含有一定量 HCG 的液体从免疫层析条的底部被吸收并通过层析作用到达金标抗体位置，HCG 的 β 链和单抗 β -HCG (金标抗体) 发生免疫反应(图 1.1B)，形成的抗原抗体复合物运行到上面的硝酸

纤维膜（硝酸纤维膜）上，该复合物中 HCG 的 α 链与硝酸纤维膜上的多抗 α -HCG（包膜抗体）发生反应，形成双抗体夹心复合物并在此滞留、富集，由于胶体金自身显色而形成红色的检测线（图 1. 1A）；剩余的金标抗体越过检测线继续上移，与预先包被好的羊抗鼠 IgG（抗抗体，二抗）反应（图 1. 1B），形成红色的质控线（图 1. 1A）。

A



B

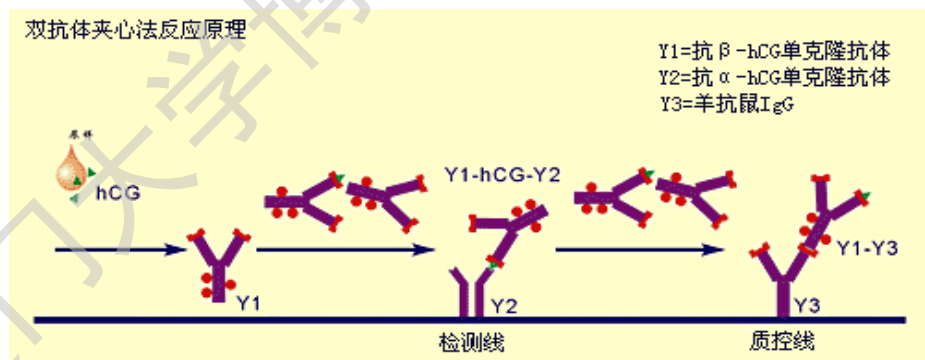


图1.1 胶体金免疫层析试纸条和双抗体夹心法反应原理的模式图 A. 胶体金免疫层析试纸条的模式图 硝酸纤维膜：硝酸纤维素膜； B. 双抗体夹心法反应原理的模式图

Fig.1.2 Schematic diagrams of GICA strip and the sandwich format of GICA. A. Schematic diagram of GICA strip. 硝酸纤维膜：nitrocellulose membrane. B. Schematic diagram of the sandwich format. （引自 http://www.aconlabs.com.cn/product/yuanli_mianyi2.asp^[12]）

与GICA原理相似的ELISA法在临床实验室已得到普遍的应用，特别是用于各型肝炎标志物的检测。但ELISA法由于操作程序复杂，时间较长，给实验室带来不便。因此出现一步法快速检测试剂盒，虽可提高检测速度，但有出现假阴性结果的弊端。ELISA法需时较长的主要原因，是由于液相中的抗原（或抗体）需经扩散才能与固相上的抗原或抗体反应不适当地缩短反应时间，将使灵敏度降至临床要求以下。与ELISA法相比较，GICA具有快速、简单、特异性和敏感性好，结果直观等优点，另外，与GIFA相比较，GICA为单一试剂，无须洗涤，大大减少了污染机会；一步操作，不需仪器设备，易于操作，整个过程在20min内即可完成；并且全部试剂可在室温长期保存，GICA这些特点将胶体金免疫检测试验推进到一个崭新的阶段。

胶体金免疫检测技术在临床检测中的应用

胶体金可应用于免疫学检测的所有方面。但主要用于检测正常体液中不存在的抗原性物质(如诊断传染病中的抗原或抗体)，以及正常含量极低而在特殊情况下异常升高的物质(如HCG、甲胎蛋白、C-反应蛋白等)。近年来由于制备技术的改进和试剂原料质量的提高，应用范围更加广阔。目前，综合国内、国外的文献以及基于胶体金技术的专利产品的总结，GIFA法的双抗原夹心法，在测乙肝表面抗体、乙肝核心抗体、甲肝抗体^[13-15]、丙肝抗体^[16]，梅毒抗体^[17-18]等方面都有了成熟的产品，具有很好的特异性、敏感性；GIFA法的间接法测抗体，主要应用在优生优育四项（弓形虫抗体、风疹病毒抗体^[19]、巨细胞病毒抗体^[20]和单纯疱疹病毒抗体）、自身抗体（抗双链DNA抗体、抗单链DNA抗体）、消化道系列（胃幽门螺杆菌抗体、轮状病毒检测、柯萨奇病毒抗体、伤寒杆菌抗体）、传染病检测（解脲支原体抗体、沙眼衣原体抗体、淋球菌抗体、乳头瘤病毒抗体）、呼吸道系列（结核杆菌抗体、肺炎支原体抗体、肺炎衣原体抗体、呼吸道合胞病毒抗体和腺病毒抗体）、免疫不育（抗精子抗体、抗子宫内膜抗体、抗心磷脂抗体、和抗卵巢抗体）、寄生虫病引起的抗体^[21-25]等^[26-43]

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库