doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.12.037

胶体金免疫层析技术的研究进展

张 莹[1] 冯 海[1△] 吴秋平[1] 谈 增[1] 贺加贝[2]

（1 浙江工业大学药学院 浙江 杭州 310014；2 天津大学药物科学与技术学院 天津 300072）

摘要：胶体金免疫层析技术是一种常用的免疫层析检测方法，由于其操作简单、省时、制造成本较低、结果易判读等特点，非常适合于现场检测，广泛用于生物、医药、食品等领域。但该技术也存在一些不足，如质量控制困难、灵敏度低、不易定量等，在一定程度上限制了其应用。本文，简述了该技术的原理、特点和国内外研究进展，重点综述了该方法的不足及改进的可能性，为拓宽其应用范围提供帮助。

关键词：胶体金；免疫层析；灵敏度；定量检测；多项检测

中图分类号：R392-33 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2015)12-2349-03

Progress of the Colloidal Gold-based Immunochromatographic Assay

ZHANG Ying[1], FENG Hai[1△], WU Qiu-ping[1], TAN Zeng[1], HE Jia-bei[2]

(1 College of pharmacy, Zhejing University of Technology, Hangzhou, Zhejiang, 310014, China;

2 The School of Pharmaceutical Science and Technology, TianJin University, Tianjin, 300072, China)

ABSTRACT: Colloidal gold-based immunochromatographic assay is a common used lateral flow immunoassay, which offers the advantage of simplicity, rapidity, relatively low manufacturing costs and easy evaluation, and it is ideally suited for on site testing, and widely used in biology, medicine, food and other fields. But there are some disadvantages, such as, low sensitivity, being difficult to quality control hard to quantitative detection and so on. The shortcomings limit its application in a certain extent. This paper describes the principle, characteristics and domestic and foreign progress of the method, and emphasizes on its lacks and the possibilities for improvement, so as to help to broaden its array of new application areas.

Key words: Colloidal gold; GICA; Sensitivity; Quantitative detection; Multiple detection

Chinese Library Classification(CLC): R392-33 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2015)12-2349-03

前言

胶体金免疫层析 (Colloidal gold-based immunochromatographic assay, GICA)技术是一种将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术[1]，具有简便、省时、样本用量少、结果易判读等特点，常在资源匮乏或非实验室环境中进行目标物的定性、半定量和定量检测。应用范围包括生物医学中的病原体、药物、激素和代谢物检测，植物检疫，兽医，饲料 / 食品和环境指标的测试[2]。虽然该技术有众多优点，但其检测限较高、假阳性、假阴性、不易定量等问题仍然困扰着使用者和研究者们。因此需要对该技术进行改进，以期得到灵敏度更高、重复性更好的 GICA 试纸。

1 胶体金免疫层析及其原理

胶体金免疫层析就是以胶体金为标记物对目标物进行定性或定量测定的侧向免疫层析方法。最适合免疫检测的胶体金粒径在 20~40 nm[3]，该粒径范围的胶体金呈现红宝石色。其在碱性条件下带负电，可与蛋白质通过静电和疏水作用相互结合，并且不影响结合物的生物活性。应用胶体金的这些特点，人们建立了 GICA 方法。

GICA 试纸由样品垫、胶体金结合垫、层析膜、吸收垫组成，通过压敏粘合剂被组装在背衬底板上。检测时，将样品加到试纸端的样品垫上，通过毛细管作用前移，样品中的分析物与结合垫上的免疫胶体金相互作用并形成复合物。复合物移至检测线，与其上的抗体(或抗原)特异性结合而被截留，在检测线上聚集，当复合物积聚到一定数量便显示出胶体金特征的红色。而未结合分析物的免疫胶体金则不被检测线捕获，迁移至质控线并与其上的抗体结合而显示红色，达到与复合物分离的目的，并且说明试纸工作正常。

2 胶体金免疫层析的优点

早在 90 年代，Beggs 等[4]就用 GICA 法检测人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadothphin, hCG)，该方法的优势渐渐被人们熟识并被大量运用到各种样品的检测。这些优势包括：①开发成本低：试纸结构简单，耗材、生产设备等成本不高；相对易于制造，易于大批量生产；②使用较简便、快速：不同于 ELISA 法需要多次加样洗涤，GICA 法一步完成检测，一般在 5~15 min 即可得到结果，可在样品收集现场进行检测；操作者依赖的步骤少，结果判定只需肉眼或简单的光学仪器；③相对

作者简介：张莹(1988-)，女，硕士研究生，研究方向：药物新制剂与新剂型，电话：13958029139，E-mail: mei_luanreng@aliyun.com

△通讯作者：冯海，电话：0571-88320776，

E-mail: fenghai289289@163.com

(收稿日期：2013-10-15 接受日期：2013-11-10)

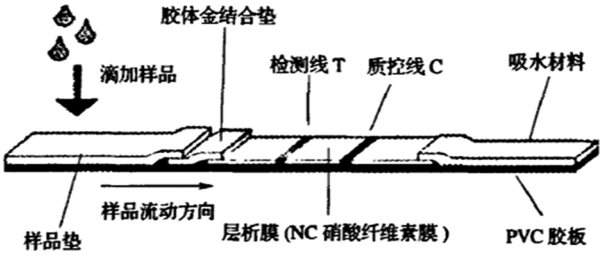

图 1 胶体金免疫层析试纸的组成

Fig. 1 Configuration of a GICA test strip

稳定：GICA 试纸保质期一般在 12-24 个月，且往往不需冷藏；不同于荧光免疫分析，检测结果可在室温下保存较长时间；④应用范围广：尿、唾液、全血、血清、血浆、体液等样品仅需简单处理或不处理即可检测，且样品用量很少。基于以上特点，GICA 法成为现阶段较经济实用的免疫层析技术，特别适合即时检验、大批量时间紧的检测和大面积普查等。

3 胶体金免疫层析的缺点及克服的可能性

虽然胶体金免疫层析有众多优点，但传统技术也存在一些不足而限制了其应用，如产品质量不稳定、灵敏度低、不易定量等。

3.1 检测产品质量不稳定

质量控制对任何产品都非常重要，胶体金免疫层析检测的优点要通过质量可靠的产品才能充分发挥。检测试纸由多部分组成，从胶体金、抗体等原料的质量，膜材的处理，到试纸的组装、储存等，每一步都会影响其质量，即使是同一批产品，也很难保证每个试纸的同一性。这在一定程度上影响了检测的灵敏度和重现性。

新的试纸材料如 Whatman 公司的 Fusion 5™，可作为样品垫、金标垫、检测带、吸收垫，单一材料就能实现免疫层析试纸条的所有功能且具有良好的吸收性和免疫胶体金释放性能[5]。应用该材料可简化试纸生产过程，降低批间差异，提高可重复性并减少生产成本。除了提高原材料的质量，选择合适的生产设备和生产工艺也是改善试纸质量的重要途径之一。许多制造步骤被设计和控制，以最大限度地减少原料和试剂变化对产品整体变异的影响。如使用非接触喷点系统比接触喷点得到更窄更均一的检测线和质控线[6]，而连续处理工艺具有更好的过程控制，更高的输出量，较少的手动输入和较低的产品可变性等[7-9]。

3.2 检测结果灵敏度低

检测灵敏度低是限制胶体金免疫层析应用范围的主要因素，传统 GICA 法的检测限高于 ELISA 等方法。从生产到使用的几乎所有步骤都能影响灵敏度，如生产阶段的材料、工艺、储存条件，及使用过程中样品的处理、检测信号强度等。免疫层析检测所用材料决定了它对环境的敏感性，抗体容易变性而膜材易吸湿，密封、干燥的环境将有助于试纸长时间的稳定。GICA 是根据待测物与相应抗体的剂量 - 反应曲线进行定性和定量检测的，因此为了得到准确的结果，必须有相对于待测物过量的抗体，包括捕获抗体和金标抗体（免疫胶体金）。只有抗体过量的情况下，剂量 - 反应曲线显示正斜率，并提供精确的定量分析。而且测定过程中没有洗涤，一些杂质的非特异性吸附将降低检测灵敏度。因此样品的采集、预处理方法、分析物的浓度选择至关重要，这一部分将在后面详述，本节重点讨论通过提高检测信号强度来改善灵敏度的方法。

要用肉眼在清晰的白色膜条带上发现胶体金产生的信号，其敏感度受到使用者能力的局限。而对膜的视觉检测中，仅仅能检测到大约膜表面 10 μm 深度的信号[6]。因此，通过增加检测信号强度来提高灵敏度，对免疫胶体金或检测复合物进行修饰、采用新的标记物等是常用的方法。Horton 等[10]将完成检测的试纸用磷酸盐缓冲液和 Tween-20 溶液洗涤，在银增强试剂中浸渍 5 分钟，得到增强的信号，与传统的 GICA 相比，其灵敏度可以提高一到两个数量级。Naoki Nagatani 等[11]在传统夹心法免疫层析检测结束后，通过应用增敏剂，使检测线显色强度增加，从而改善灵敏度。Ryo Tanaka 等[12]以胶体金标记的检测抗体作为增强剂，将其按一定比例与检测抗体混合作为检测线，既保持了 GICA 一步完成检测的便利性，又提高了灵敏度。Claudio Parolo 等[13]则用结合了辣根过氧化物酶(HRP)的金标抗体作为标记物，在常规检测完成后，将试纸浸渍到 HRP 底物中二次显色，得到颜色加深的检测线和质控线。Dong Yang 等[14]则用 Fe_3O_4/Au 纳米颗粒作为标记物，较传统的 GICA 试纸其灵敏度有所提高。

3.3 检测样品定量不准确

虽然胶体金免疫层析不需要任何特殊读取装置即可判断结果，但随着检测要求的提高，这种形式的缺点陆续显现，包括缺乏自动记录结果的文档，对结果的主观解释导致的假阳性和假阴性，不能准确定量，一次检测多种物质的能力有限，由于手动操作而不能高通量检测等[15]，限制了其在更多领域的应用。

目前胶体金免疫层析的半定量或定量形式主要有三种：(1)通过颜色深浅进行视觉比较，提供半定量结果，可分为阴性、弱阳性、中阳性和强阳性；(2)将检测部位结合胶体金的抗原或抗体设计为只能结合已知量的待测物，任何过量的待测物将会与下一条检测线结合，产生一个温度计式的条带梯度[1]；(3)使用一个小型的、便携式的分析仪读取条带上的检测结果，由分析仪将有色的测试线转换为数字信号，换算成样品浓度值。近年来，越来越多快速诊断产品生产企业致力于便携式或手持式侧向免疫层析读条仪的研发，提高产品质量及便利性，并以此区别于竞争对手。大多读条仪可用于多种侧向免疫层析检测，兼容多家厂商的试纸，可存储大量结果并有数据输出端口。其中 QIAGEN 公司的 ESE-Quant 读条仪可自定义最多 60 个不同的参数，还可进行免疫荧光检测[16]；而 Skannex 公司的 SkanFlexi 产品一次可测定多个不同类型的试纸，为实际应用提供便利[17]。

3.4 检测目标物单一

由于抗体抗原的结合特异性，胶体金免疫层析往往只能检测单一物质，这对于一些需要联合检测的物质相当不便。

实现多元检测可采用在同一膜上作多种项目测定和多项目的组合测定[18]。Zhang Can 等[19]以胶体金免疫层析方法同时检测西维因和硫丹，两者没有交叉反应，结果与仪器分析吻合良好，为农产品的快速筛查西维因和硫丹提供便利。Taro

Yonekita 等人[20]以抗菌肽结合的胶体金作为标记物，同时鉴别和检测 3 种不同血清型的大肠杆菌，具有较好的灵敏度和特异性。而多元检测的 GICA 试纸商品化也已实现，Advnt Biotechnologies 公司的 Pro Strips™[21]可同时检测和识别多达 5 种生物毒素，操作简单，结果可靠。

3.5 检测样品不易预处理

如前所述，样品的采集、预处理等对提高检测灵敏度至关重要。不同的样品预处理的方法一般不同，有些还比较繁琐，对于资源匮乏地区或非实验室环境是一种挑战。样品的制备必须简便、快速、可靠，尽量保持胶体金免疫层析检测的优势。

样品处理的关键是要将其作为一个整体考虑，包括采样方法、样品的预处理方法以及分析物的浓度[7]。以全血样品为例，可在一些层析系统中使用一个分离膜（如 Pall Vivid™ 或 Cytosep™ 膜）来分离血细胞和血浆，再施加样品稀释液或缓冲液以提供足够的量来完全润湿试纸。日本立佳有限公司（株式会社リージャー）的 Demecal® 设备则可以一步完成少量血液的稀释、分离[22]。该设备包括血液采集、稀释、过滤等装置。最终可得到稀释的血浆，直接应用于试纸上。

4 展望

虽然相对于其他侧流免疫层析检测，胶体金免疫层析存在灵敏度低、定量难等问题，但其开发时间短、技术难度低、开发成本低[23]，且操作方便，检测速度快，结果判定不需要复杂的仪器，仍然是现阶段一种经济实用的快速检测技术。随着应用范围的扩大和潜在市场的开发，对该技术的要求增加，因此在不损害其本身优点的基础上提高重现性、灵敏度和定量准确性的意义重大。这对新的标记物、新的读取形式、新的样品处理方法、新的设备等具有强烈需求。而 GICA 技术涉及材料科学、化学、生物学、免疫学、光学、软件和硬件工程等多个学科，改进现有的技术需要多学科的研究、融合，将可能的变异降到最低，使其更具重现性、更灵敏、更易制造、更易操作和解释、检测浓度范围更广，为以更低的成本和负担更快地占有市场提供可能。

参 考 文 献(References)

[1] 林一民, 王云龙. 胶体金免疫层析技术在临床疾病诊断中的研究进展[J]. 重庆医学, 2013, 42(1): 91-93
Lin Yi-Ming, Wang Yun-Long. Progress in the clinical diagnosis of the colloidal-gold immunochromatography assay [J]. J Chongqing Medical, 2013, 42(1): 91-93

[2] Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey [J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2009, 393(2): 569-582

[3] Chandler J, Gurmin T, Robinson N. The place of gold in rapid tests[J]. IVD Technology, 2000, 6(2): 37-49

[4] Beggs M, Novotny M, Samocdro S, et al. A self performing chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic gonadotrophin in urine and serum [J]. Clinical Chemistry, 1990: 1084-1085

[5] Raphael W, Harley T. Lateral flow immunoassay [M]. New York: Humana Press, 2009: 115-129

[6] O'Farrell B, Bauer J. Developing highly sensitive, more reproducible lateral flow assays. Part 2: New challenges with new approaches[J]. IVD Technology, 2006, 12(6): 67-75

[7] David W. The Immunoassay Handbook [M]. 4th ed. Oxford: Elsevier, 2013: 89-107

[8] Tisone TC. In-line manufacturing for rapid-flow diagnostic devices[J]. IVD Technology, 2000, 6(3): 43-60

[9] Tisone TC. In-line processing trends for lateral-flow immunoassay manufacturing[J]. IVD Technology, 2007, 13(5): 37-41

[10] Horton JK, Swinburne S, O'Sullivan MJ. A novel, rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin [J]. Journal of Immunological Methods, 1991, 140 (1): 131-134

[11] Nagatani N, Tanaka R, Yuhi T, et al. Gold nanoparticle-based novel enhancement method for the development of highly sensitive immunochromatographic test strips [J]. Science and Technology of Advanced Materials, 2006, 7(3): 270-275

[12] Tanaka R, Yuhi T, Nagatani N, et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles [J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2006, 385(8): 1414-1420

[13] Parolo C, de la Escosura-Muiz A, Merkoi A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 40(2013): 412-416

[14] Yang D, Ma J, Zhang Q, et al. Polyelectrolyte coated gold magnetic nanoparticles for immunoassay development: toward point of care diagnostics for syphilis screening [J]. Analytical chemistry, 2013, 85: 6688-6695

[15] Raphael W, Harley T. Lateral flow immunoassay [M]. New York: Humana Press, 2009: 157-183

[16] QIAGEN. ESEQuant Lateral Flow Immunoassay Reader[EB/OL]. [2013-10-10].http://www.qiagen.com/about-us/contact/corporate-contacts/oem-services/ese-instruments/esequant-lateral-flow-immunoassay-reader/#

[17] Skannex. SkanFlexi [EB/OL]. [2013-10-10]. http://www.skannex.com/products/skanflexi/

[18] 齐颖颖. 免疫胶体金技术及其应用 [J]. 河北省科学院学报, 2011, 28(4): 36-39
Qi Ying-ying. Immune colloidal gold technique and its applications [J]. Journal of HeNan Forestry Science and Technology, 2011, 28(4): 36-39

[19] Zhang C, Zhang Y, Wang S. Development of multianalyte flow-through and lateral-flow assays using gold particles and horseradish peroxidase as tracers for the rapid determination of carbaryl and endosulfan in agricultural products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(7): 2502-2507

[20] Yonekita T, Ohtsuki R, Hojo E, et al. Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli [J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 93(3): 251-256

[21] Advnt. Pro Strips [EB/OL]. [2013-10-10]. http://www.advnt.org/products/biowarfare/prostrips/

[22] 株式会社リージャー. DEMECAL 使用方法[EB/OL]. [2013-11-1]. http://www.kenkojin.net/demecal/howtonavi_text.html

[23] Raphael W, Harley T. Lateral flow immunoassay [M]. New York: Humana Press, 2009: 1-33