

固相膜免疫测定

标记免疫测定

放射免疫测定	1960'
酶免疫测定	1970'
荧光免疫测定	1980'—1990'
化学发光免疫测定	1990'—
膜固相免疫测定	1990'—

膜固相免疫测定的特点

优点	不足之处
简便，快速	敏感度略低，价格略高（与ELISA比）
单份测定	精密度较差，质控困难
保存期长（优质试剂）	稳定性较差（普通试剂）
可测定物范围广（主要为定性试验）	不易制备定量、半定量试剂
感染性疾病的诊断	
妊娠、排卵的诊断	
肿瘤标志	
心肌标志	
滥用药物	

固相膜的特点

➤ 多孔性

毛细管作用

➤ 非共价键高度吸附抗体或抗原

高度敏感性

➤ 易于漂洗

操作简便

常用的固相膜

玻璃纤维素(fiberglass)膜

尼龙(nylon)膜

聚偏氟乙稀(polyvinylidene fluoride , PVDF)膜

硝酸纤维素 (nitrocellulose, NC) 膜

固相膜的技术要求

- 孔径：0.2~0.6 μm
- 流速：以 $\text{ml}/\text{cm}^2/\text{min}$ 表示
- 蛋白质结合力：吸附力很强，以 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 表示
- 均一性

第一节 免疫金标记技术

免疫金标记技术(Immunogold labelling technique)主要利用了金颗粒具有高电子密度的特性，在金标蛋白结合处，在显微镜下可见黑褐色颗粒，当这些标记物在相应的配体处大量聚集时，肉眼可见红色或粉红色斑点，因而用于定性或半定量的快速免疫检测。这一反应也可以通过银颗粒的沉积被放大，称之为免疫金银染色（immunogold silver staining, IGSS）。

一、胶体金制备

胶体金（colloidal gold）的制备一般采用还原法，常用的还原剂有柠檬酸钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷、硼氢化钠等。向一定浓度的金溶液内加入一定量的还原剂使金离子还原成金原子，形成金颗粒悬液，也称金溶胶（gold solution）。

胶体金的制备及特性

胶体金粒径 (nm)	1%柠檬酸钠加入量 (ml)*	胶体金特性	
		呈色	λ_{\max} (nm)
16	2.00	橙色	518
24.5	1.50	橙红色	522
41	1.00	红色	525
71.5	0.70	紫色	535

*还原100 ml 0.01%HAuCl₄ 所需量

胶体金 (Colloidal Gold)

15~60 nm

优质

劣质

Figure 1 - Good quality gold particles

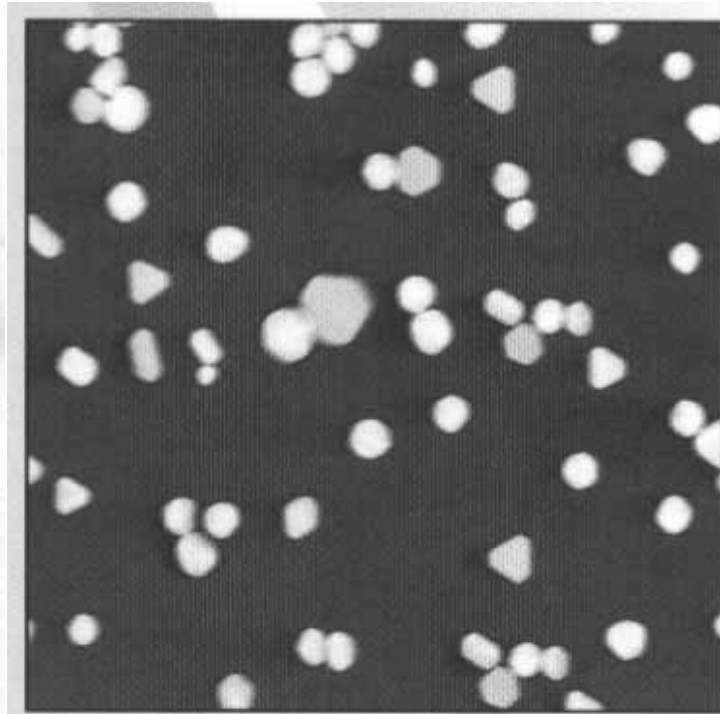
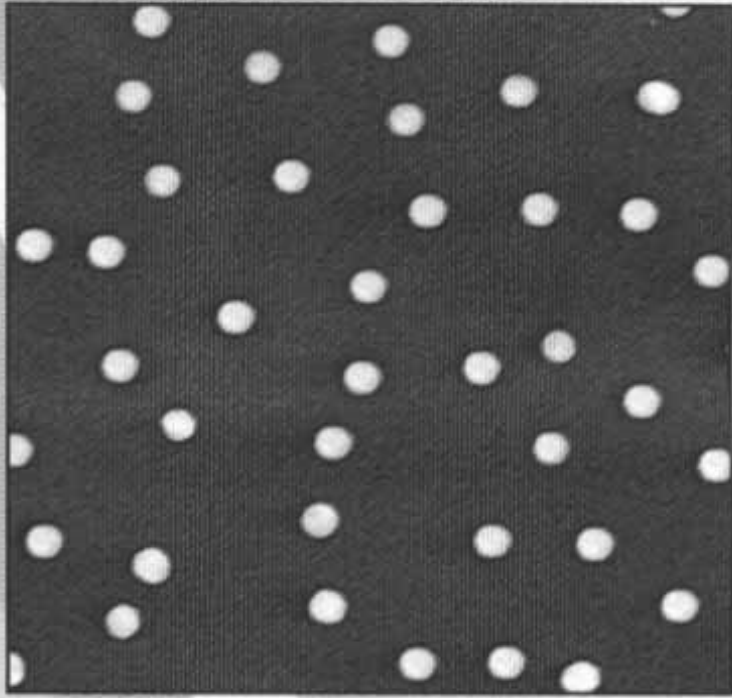
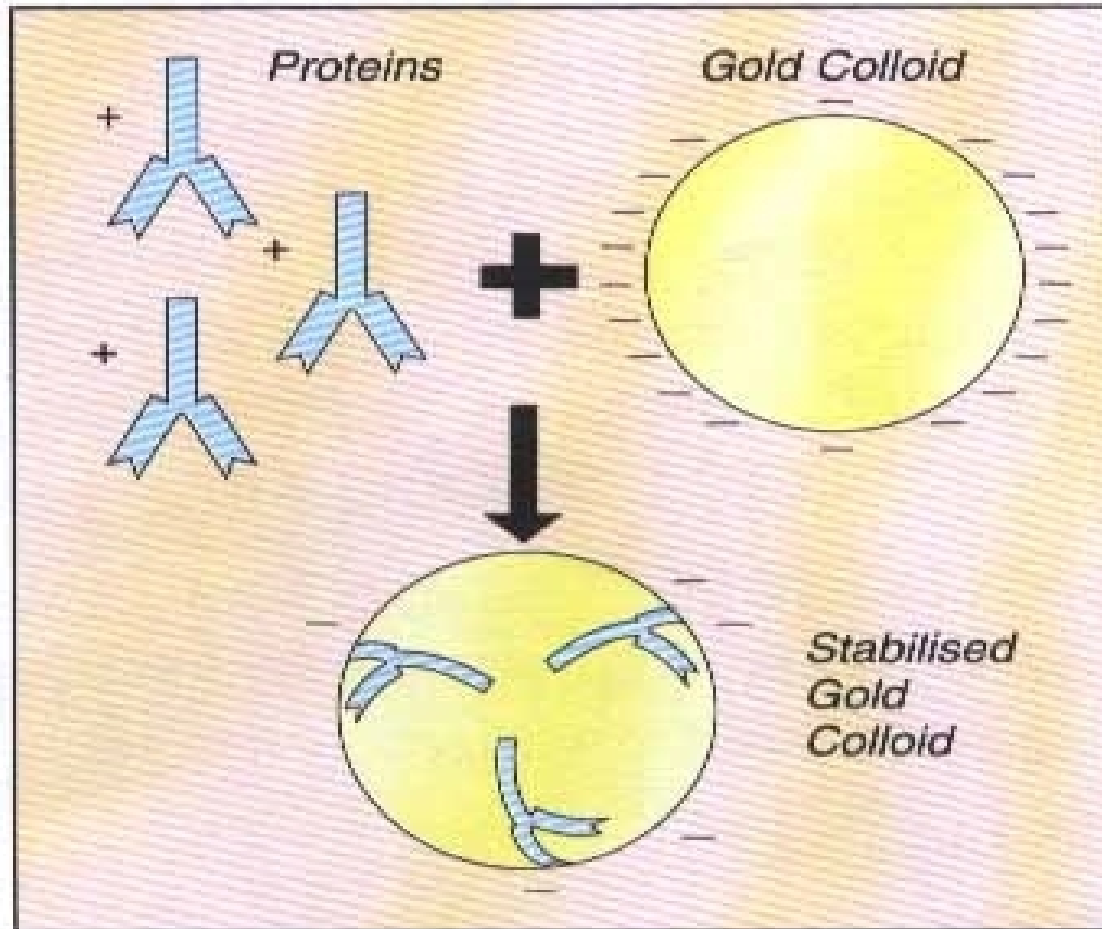


Figure 2 - Poor quality gold particles

胶体金结合物 (Conjugate)



Adsorption of proteins to gold colloid

固相微孔膜测定种类

斑点金免疫渗滤试验(dot immunogold filtration assay, DIGFA)

免疫层析试验 (immunochemistry assay, ICA)

斑点ELISA (dot enzyme linked immunosorbent assay, Dot-ELISA)

酶联免疫斑点试验(enzyme linked immunospot , ELISPOT)

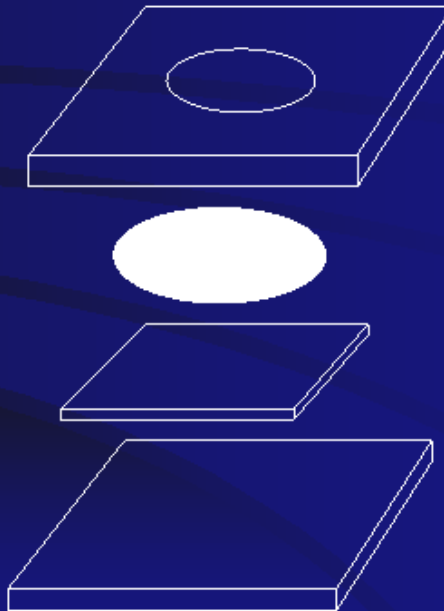
免疫印迹法(immunoblotting test, IBT)

放射免疫沉淀试验(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)

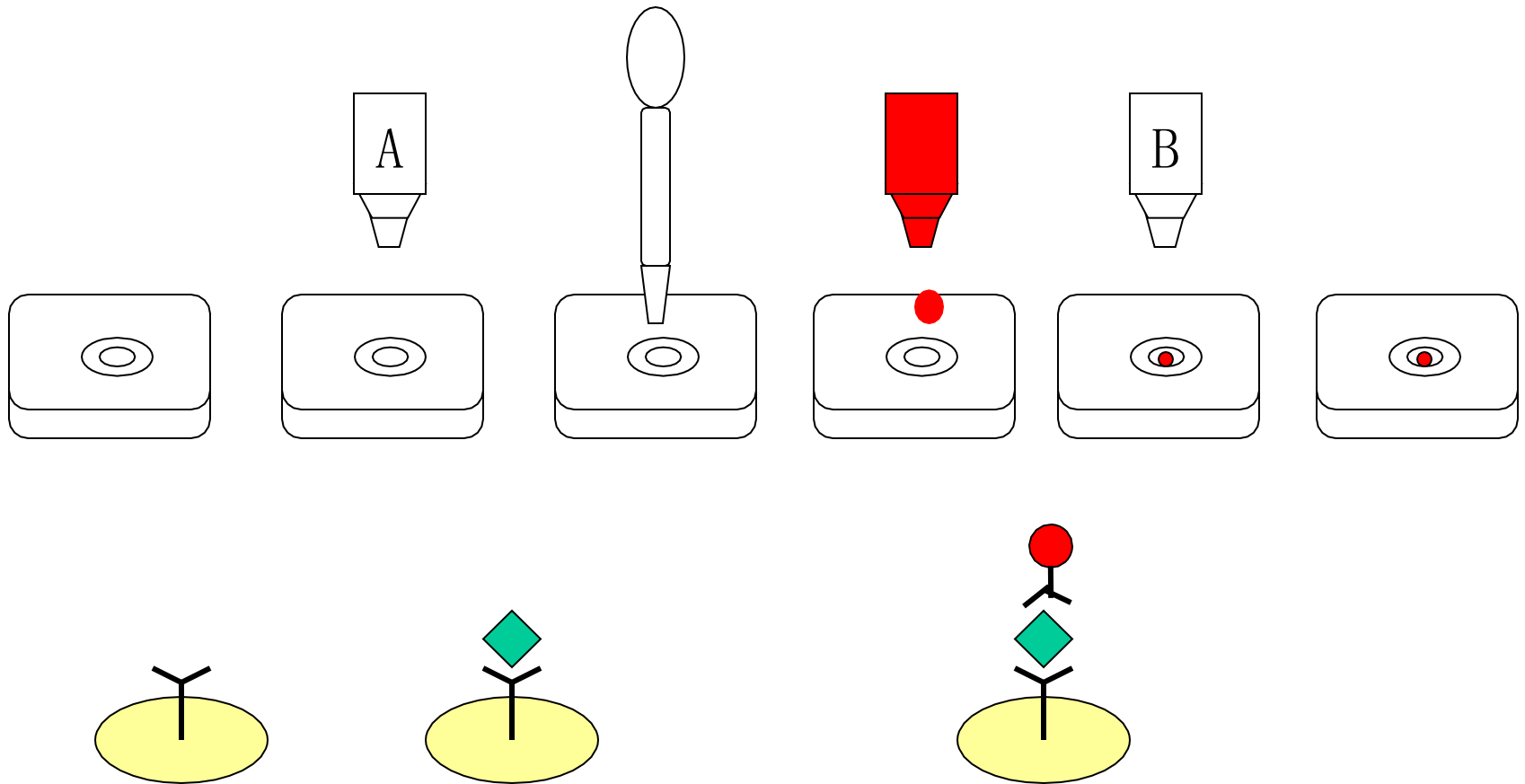
一、免疫渗滤测定(IFA)

快速检测技术简介

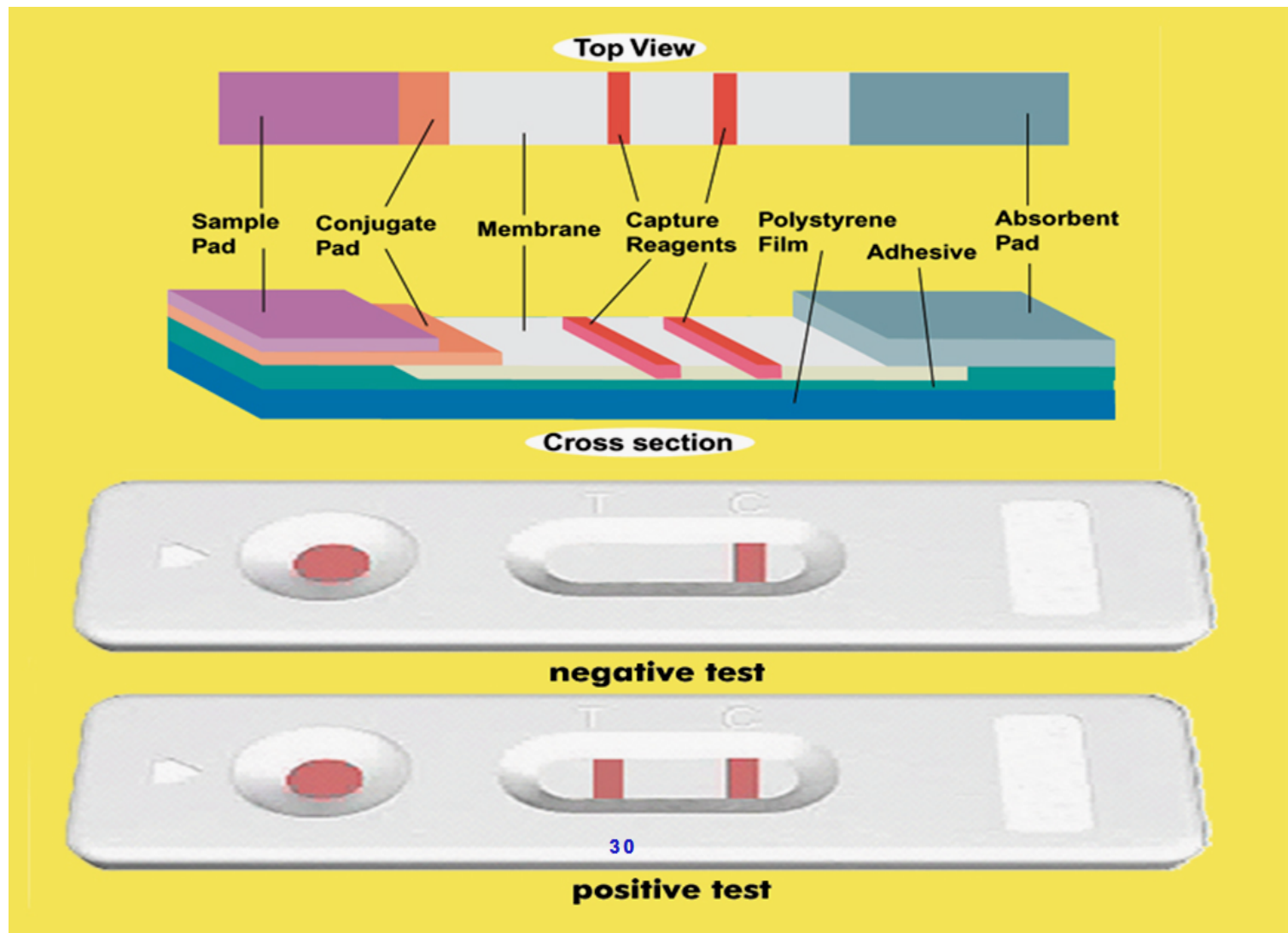
GIFA的组成及操作（图示）



IFA——双抗体夹心法测抗原



二、免疫层析测定（ICA）



ICA 试剂条



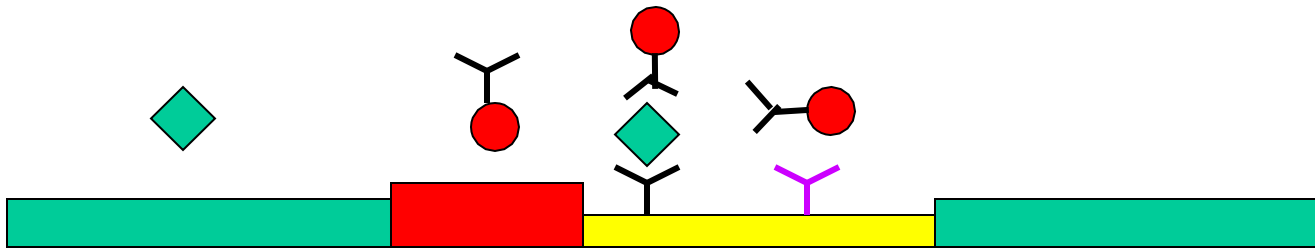
样品垫

结合物垫

NC膜

吸水垫

ICA——双抗体夹心法测抗原



ICA 结果观察

阳性



阴性



无效

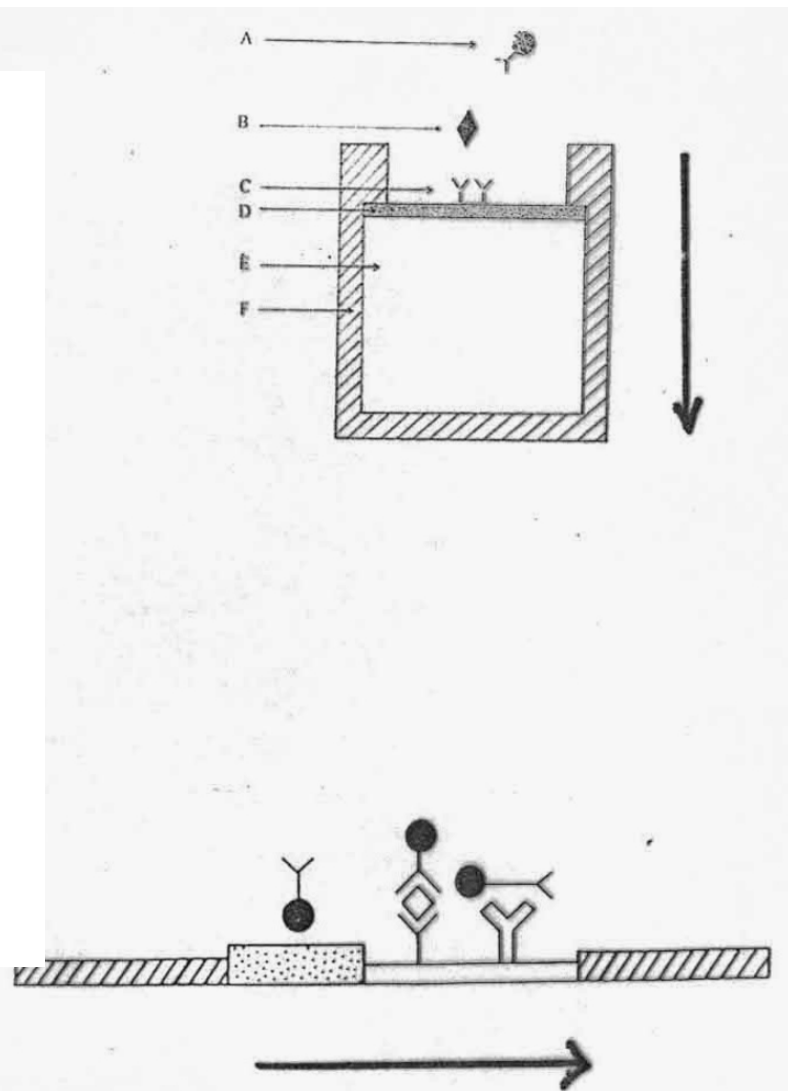


IFA与ICA的比较

	IFA	ICA
试剂形式	渗滤装置及附加试剂	试剂条
试剂保存	4~8℃ 6个月	室温一年
操作步骤	3~5	1
观察时间	3 min	3~20 min
阳性反应颜色浓度	操作结束颜色不变	颜色逐渐加深

IFA
穿流 (FLOW THROUGH)

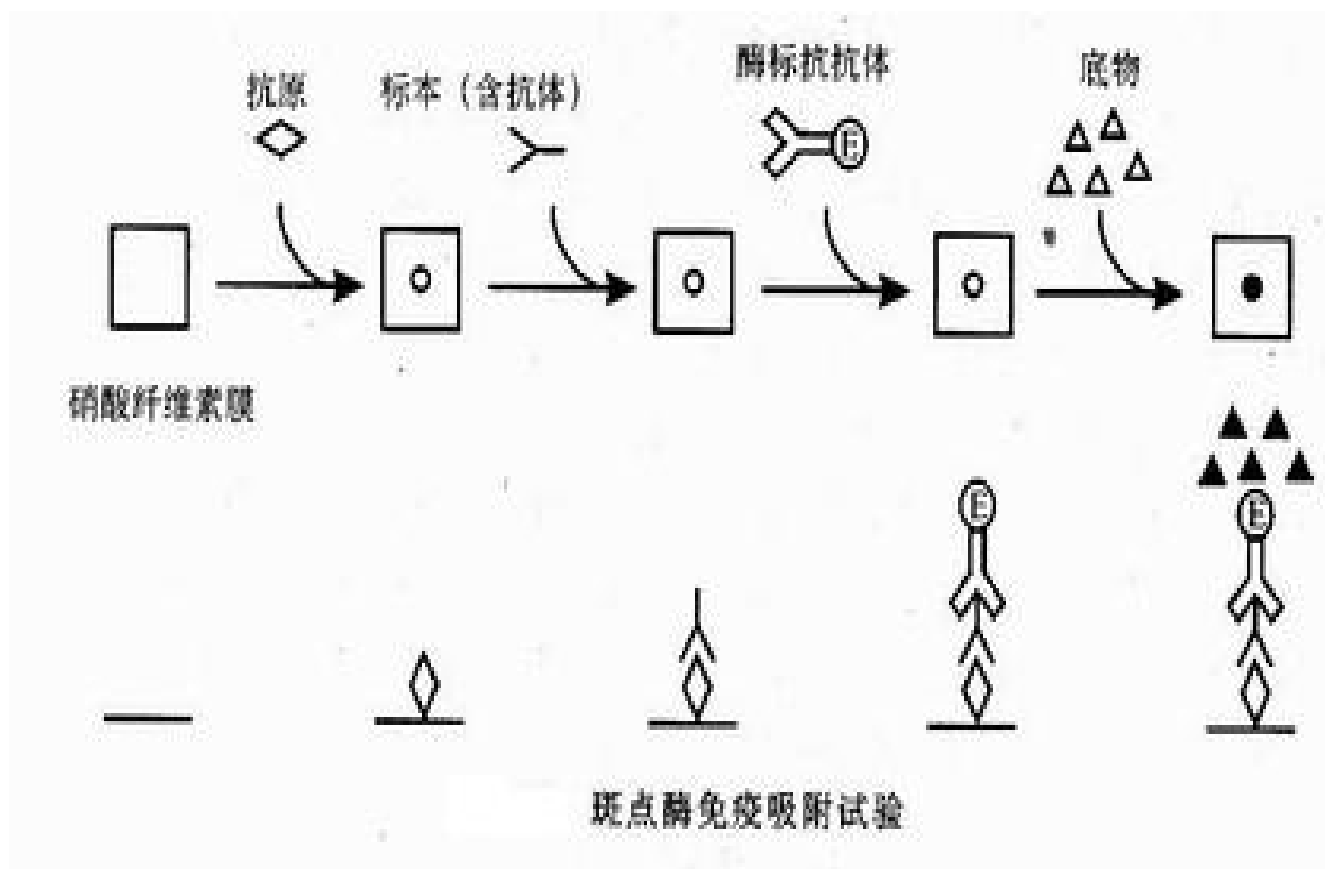
ICA
横流 (LATERAL FLOW)



第二节、其他膜载体免疫分析技术

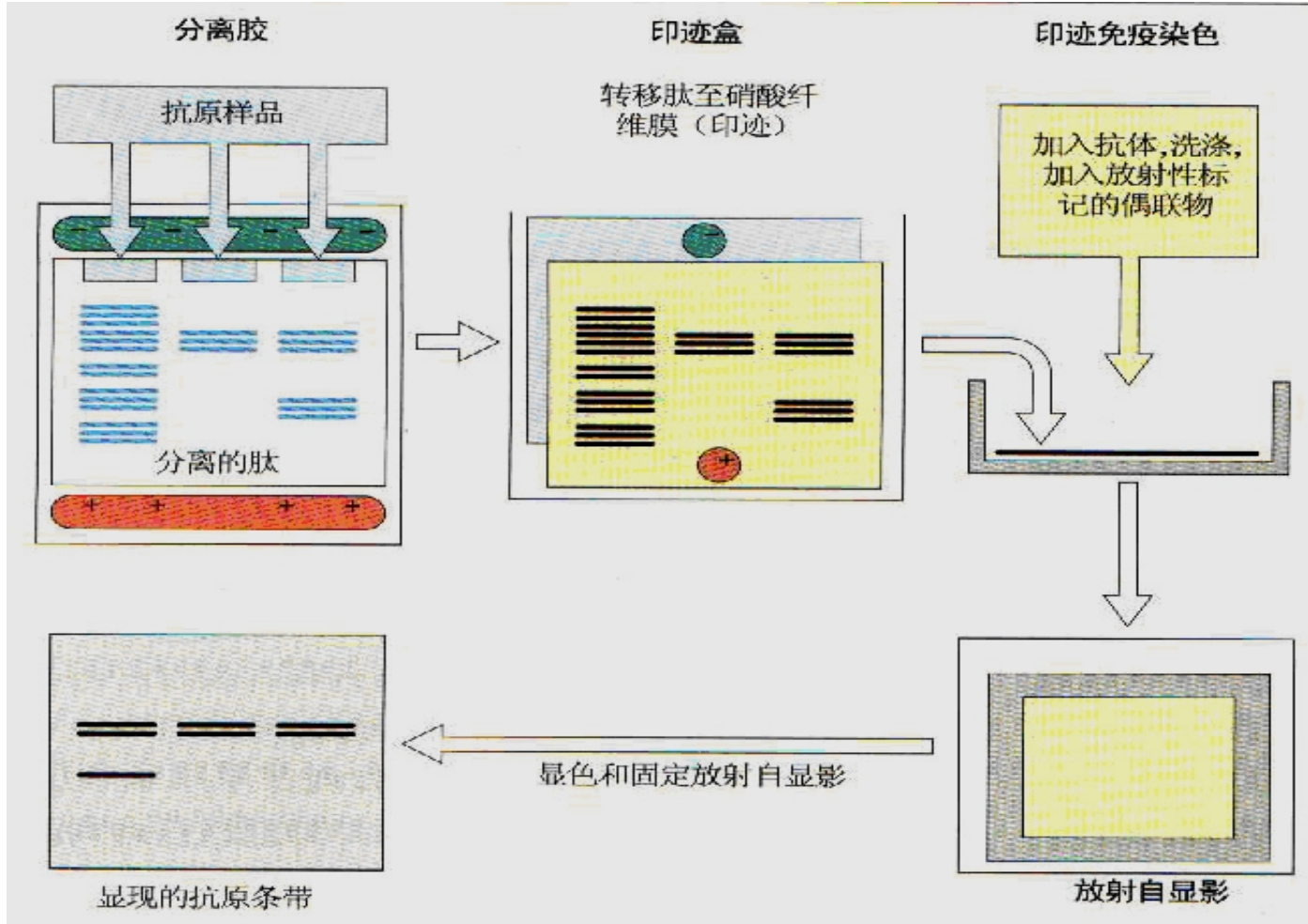
斑点酶免疫吸附试验

——Dot-ELISA



二、免疫印迹法——Westernblot法

原理



Westernblot——抗原表位可能被破坏而漏检