DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.033

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)08-0742-02

自制GICA试纸条检测样品中人血红蛋白的初步研究

Gold-immunochromatography assay for human hemoglobin antigen

王志红,纪 欣,武子涛 (北京军区总医院消化内科实验室,北京 100700)

提 要:目的 建立一种国产的简易快速,自测式胶体金免疫层析测试条(gold-immunochromatography assay, GICA)用于检测人血红蛋白(人Hb)。方法 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,标记抗人血红蛋白抗体(抗人Hb抗体),制成免疫层析法试纸条。样品中人Hb抗原与试纸条上金标抗体结合后沿着硝酸纤维膜移动,与硝酸纤维膜上的固相抗体结合形成肉眼可见的红色沉淀线。结果 GICA试纸条仅与人Hb发生特异性反应,与牛、马、羊、猪等动物血清无交叉反应。检测人Hb参比品溶液,灵敏度可达30 ng/ml,与进口商品试纸条符合率为90%。结论 GICA检测人Hb样品特异性强,灵敏性较高,简便快速,无需特殊仪器设备,具有广泛应用价值。

免疫层析法(immunochromatography)是上世纪80年代中期在免疫渗滤(immunofiltration)[1,2]技术的基础上建立的一种简易快速的免疫学检测技术[3]。其原理是将特异性抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当该硝酸纤维素膜一端浸入样品(血清、尿液、粪便等)时,由于毛细管作用,样品沿着膜向前移动,当移动至固定有抗体的区域时,样品中相应的抗原即与该抗体特异性结合,若用免疫胶体金或免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性免疫诊断。目前,国内市场销售的大部分金标试剂(如便潜血试纸条)多为进口产品。本实验所用材料及试剂均为国内产品。

本室自制的金标免疫层析试纸条灵敏度可达30 ng/ml,与牛、马、羊、猪等动物全血无交叉反应,并具有简便快速,不需要仪器设备等优点,可用于快速检测人Hb样品(如血液、尿液、粪便等)。

1 材料和方法

1.1 材料

氯金酸($HAuCl_4 \cdot 4H_2O$ 分析纯):上海试剂一厂产品。抗人血红蛋白抗体:兔抗人血红蛋白抗体(抗人Hb抗体,系本实验室参考文献[4]方法并加以改进制备,羊抗兔IgG为市售商品。人血红蛋白(人Hb)灵敏性检测参比品:由于无市售人Hb标准品,本实验室自制人Hb参比品,经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度,福林-酚法做蛋白质定量)。对照用金标抗人Hb抗体试纸条:市售OB试纸条。人Hb特异性检测参比品:1%牛、马、羊、猪全血。

1.2 方法

1.2.1 对抗人Hb作标前处理并经实验确定金标与待标抗体用量比例 按照文献[5,6]。

1.2.2 胶体金-抗人Hb抗体结合物的制备 0.1 mg氯金酸用纯水溶解至100 ml。煮沸后,加入0.000 34 mol/L柠檬酸三钠溶液4.0 ml,继续煮沸15 min。冷却后,用0.2 mol/L K_2CO_3溶液调至pH 9.0。取金胶液9 ml,在快速电磁搅拌下加入抗人Hb抗体纯品(15~20 μg/ml),继续搅拌15 min。最终加入0.17 mol/L NaCl溶液1 ml,混匀,2 000 r/min离心10 min,弃沉淀,上清液以10 000 r/min离心60 min,小心吸去上清液,沉淀物即为纯化的金标抗人Hb抗体结合物。将沉淀物制作火棉胶铜网标本并经电镜(8×10^5)观察可见结合良好的标记抗体。

1.2.3 免疫层析试纸条的制备 试纸条底层为PVC板,上层分为3部分,两端为吸水滤纸,中间的吸水纤维部分点加金标抗人Hb抗体结合物;硝酸纤维素膜上用0.02 mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成100 ng/ml的兔抗人Hb抗体(检测线)和兔抗鼠IgG(对照线)包被成两条约1 mm宽的小条,晾干后用含10%胎牛血清PBS封闭,待干燥后,依次(吸水滤纸-金标抗人Hb抗体-兔抗鼠IgG-吸水滤纸)粘在PVC板上,加干燥剂密封保存。

1.2.4 灵敏性检测 用本室制备的金标抗人Hb试纸条和市售的便潜血试纸条分别检测系列稀释的本室制备人Hb抗原。结果判定:以试纸条上控制线和检测线出现两条红色沉淀线为阳性;仅在控制线处出现一条红色沉淀线为阴性;无红色沉淀线出现为失效。

1.2.5 特异性检测 用本室制备的金标抗人Hb抗体试纸条分别检测1%牛、马、羊、猪全血。

2 结果

2.1 GICA试纸条检测Hb的特异性

用试纸条分别检测不同浓度的人Hb和1%牛、马、羊、猪全血,结果显示:仅人Hb呈阳性反应,其余均呈阴性反应。

2.2 GICA试纸条检测Hb的灵敏性

用试纸条检测不同浓度人Hb参比品(1×10^6、1×10^5、1×10^4、1×10^3、1×10^2、5×10、4×10、3×10、2×10 ng/ml),其灵敏度可达30 ng/ml。

2.3 与市售进口同类商品的比较

同时用本室制备的金标抗人Hb试纸条与市售进口OB试纸条检测人Hb参比品进行比较,本室制备的GICA试纸条仅在20 ng/ml浓度时未出现阳性,与市售进口OB测试纸条比较,符合率为90%。

作者简介:王志红(1953-),女,安徽省宿洲市人,主任技师,主要从事大肠肿瘤早期诊断方法学及相关诊断试剂的研制方面的研究,发表论文35篇。电话:(010)66721570

收稿日期:2003-04-02;修回日期:2003-07-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

胶体金免疫层析法检测人 Hb，是样品中 Hb 与金标抗人 Hb 抗体结合物结合后，沿硝酸纤维素膜迁移，在包被有抗人 Hb 抗体处形成抗人 Hb 抗体-Hb-金标抗人 Hb 抗体夹心物而出现红色沉淀线。此法集免疫反应与色谱层析之特点，使待测样品的人 Hb 与吸水纤维上的金标抗人 Hb 抗体不断结合，形成 Hb-金标抗人 Hb 抗体复合物，再经层析作用持续通过硝酸纤维素膜，与膜上固相抗人 Hb 抗体结合。由于是全部样品均经过窄条的硝酸纤维素膜的连续性反应，实际上对被测物质起到了浓缩作用，从而使免疫层析法比原理相近的免疫渗滤法更为敏感。

我们利用国产材料和本实验室条件研制了 GICA 试纸条，并与市售的进口同类商品进行了比较，其符合率为 90%。GICA 的灵敏性可达 30 ng/ml。该试纸条仅对人 Hb 反应，而对牛、马、羊、猪等动物 Hb 则无交叉反应。实验结果表明，本室自制的 GICA 试纸条具有特异性强，灵敏性高，简易快速，不需仪器设备等优点，填补了国内此项产品的空白，我们将在下一步研究中对消化道出血疾病和大肠肿瘤的初筛等辅助诊断方面的应用价值做进一步探讨。

关键词：人血红蛋白；胶体金；免疫层析法
中图法分类号：R446.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] Valkirs G E, Barton R. Immuno concentration-a new format for solid-phase immunoassays[J]. Clin Chem, 1985, 31(9): 1427－1431.
[2] Spielberg F, Kabeya C M, Ryder R W, *et al*. Field testing and comparative evaluation of rapid, visually read screening assays for antibody to human immunodeficiency virus[J]. Lancet, 1989, 1(8638): 580－584.
[3] Beggs M, Novotny M, Sampedro S, *et al*, A selfperforming chromatographic immunoassyas for the qualitative determination of human chorionic gonadotrophin (HCG) in urine and serum[J]. Clin Chem, 1990, 36(9): 1084－1085.
[4] 赖卓胜，张亚历. 葡萄球菌 A 蛋白粪隐血试验[A]. 见：周殿元名誉主编，张亚历主编. 大肠癌的基础与临床[M]. 上海：上海科技出版社，1999. 286－290.
[5] 李成文. 现代免疫化学技术[M]. 上海：上海科技出版社，1992. 165－181.
[6] 吴冯波，侯惠仁，贺佑丰，等. 免疫层析分析进展[J]. 中华医学检验杂志，1998, 21(2): 122－124.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)08-0743-02

技术方法

一阶导数光谱法测定斑秃擦剂中米诺地尔的含量

Determination of Minoxidil in alopecia areate liniment by first order derivative spectrophotometry

田 华，葛 勤，曹 健，王 芳，王 琴 （第三军医大学新桥医院药剂科，重庆 400037）

提 要：目的 建立斑秃擦剂中米诺地尔的含量测定方法。方法 采用一阶导数光谱法直接测定斑秃擦剂中米诺地尔的含量，测定波长为 298 nm。结果 线性范围为 6～14 μg/ml，r=0.999 98，平均回收率为 100.22% RSD=1.06%（n=9）。结论 本方法简便、快速、准确，可消除该制剂中其它组分的干扰，适用于医院制剂的质量控制。

斑秃是临床上常见的脱发病之一，其发病机制目前多倾于自身免疫性疾病，与遗传、内分泌失调、精神因素等也有密切关系。头皮活组织检查发现，病人毛囊发育不全，头发的直径明显变细。美国 FDA 于 1991 年批准普强(Pujohn)公司生产米诺地尔外用擦剂用于治疗斑秃及男性脱发。米诺地尔外用可促使患者毛囊直径和深度恢复正常，从而促进毛发生长。我国 1995 年版药典仅收载米诺地尔为降压药，尚无治疗脱发这一适应证[1]。本院普通制剂室研制了斑秃擦剂，用于治疗斑秃、脂溢性脱发及男性脱发，疗效显著。根据主要成分米诺地尔在紫外光区有吸收这一性质，作者采用一阶导数光谱法直接测定擦剂中米诺地尔的含量，可消除其它组分的干扰，不经分离直接测定，获得满意效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

日本岛津 UV-2501 型紫外分光光度计；电子分析天平(Sartorius Germany)。米诺地尔对照品(江苏省金坛市天华化工新技术研究所 990202)；其它辅药及辅料均为药用规格。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 105 ℃干燥至恒重的

作者简介：田 华(1964－)，女，四川省德阳市人，主管药师，主要从事医院制剂及新药开发方面的研究。电话：(023)68774707
通信作者：葛 勤，电话：(023)68774716
收稿日期：2003-03-27；修回日期：2003-05-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net