嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNBT94-07

計畫名稱：急性心肌梗塞免疫層析試片之開發

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

□整合型計畫　　v 個別型計畫

計畫總主持人：　　計畫主持人：周淑芬

子計畫主持人：

中華民國九十五年二月二十八日

Studied on the Development Immunochromatographic Strip for Acute Myocardial Ischemia

急性心肌梗塞免疫層析試片之開發研究

Shu-Fen Chou(周淑芬)
Department of Biotechnology, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan, R.O.C.

摘要

C-反應蛋白為疾病發生之急性期蛋白質，可作為急性心肌梗塞、類風溼關節炎及直腸癌等疾病之生物指標。傳統檢測C-反應蛋白以酵素連結免疫分析法（ELISA）或螢光連結免疫分析法等方法，但其檢測時間較為冗長、且需昂貴儀器；因此本研究利用膠體金為標誌物與抗體形成共軛物，開發出可拋棄式C-反應蛋白免疫層析試片，其檢測過程方便、快速，不須樣品前處理，所需樣品量少，且不須任何儀器設備即可偵測。所開發出的試片可檢測C-反應蛋白5~100 μg/mL，且無交叉反應出現，因此可應用於實際樣品如：小鼠血清樣品之檢測上，檢測時間為15~20分鐘。

前言

C-反應蛋白為疾病發生之急性期蛋白質，其乃由肝臟分泌，在外傷、局部缺血、燒傷、各種發炎與感染時會迅速上升，有時可上升至1,000倍以上。根據目前研究顯示，亦可作為急性心肌梗塞、類風溼關節炎及直腸癌等疾病之生物指標。

隨著科技進步及材料的應用，免疫分析試片是近幾年來在國內外快速興起的一種快速診斷技術，其檢測方法符合操作簡便、檢測快速、製作成本低、高靈敏度和專一性，且無須儀器判讀等優點，已廣泛應用於臨床診斷上。從1988年開發出用於檢測懷孕的固相三明治分析試片（ClearviewTM, U.S.A.）後，無論在微生物、細菌毒素、賀爾蒙、毒品等的檢測上，皆有廣泛應用。

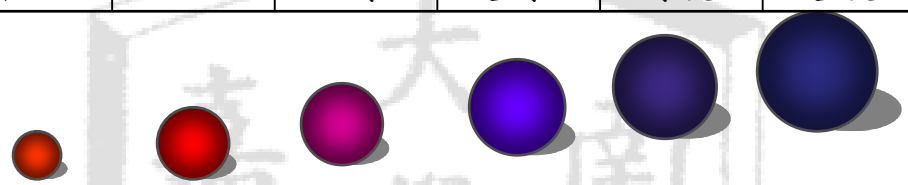
免疫分析試片分別由玻璃纖維膜、硝化纖維膜、纖維紙等組成，而其原理類似於三明治免疫檢測方法。將整個抗原抗體的反應表現在試片上，利用試紙的毛細現象和物質移動的差異，先對待測物進行層析分離，再利用已標幟顯示物的特異性抗體和待測物中的抗原結合，當抗原抗體複合物能被集中於試紙的某一特定區帶上，且抗體的標定物形成一肉眼可觀測之色帶，而達到檢測的目的。整個檢測過程相似於一般免疫分析方法，差別在過程中不需像一般免疫分析法需長時間和多重步驟，只需將待測物或檢體置於試片上，經短暫時間後即可測得結果，且不需使用儀器作分析即可判讀。

一般常見之免疫分析試片中，最常被應用於標幟抗體之標定物為乳膠（latex）及膠體金（colloidal gold）兩種。乳膠是最早被開發應用於免疫分析試片上，但由於乳膠粒子在與抗體結合後，較會傾向發生凝集，造成在抗體標幟上的困擾，所以利用膠體金來標幟抗體漸漸被廣泛使用。膠體金的製作來自氯金酸在還原劑的作用下，能將帶正電金離子還原成帶微弱負電之疏水性膠體溶液，由於靜電作用使得金粒子能穩定形成膠體狀態。常用的還原劑有檸檬酸三鈉（tri-sodium

citrate)、單寧酸（tannic acid）及抗壞血酸（ascorbic acid）等。依還原劑的特質與反應時間的長短，可影響膠體金形成之粒徑大小，不同的粒徑大小可形成不同範圍之吸收光譜，呈現出灰藍、灰紫、紫紅、深紅到橙紅等廣範圍之顏色變化。一般而言粒徑較大之膠體金溶液（80~150 nm）呈現深藍、藍紫顏色，粒徑較小之膠體金溶液（5~40 nm）易呈現紅、紅橙、橙等顏色，如表 1 所示。 。

表1 膠體金粒徑大小與其外觀顏色之特性比較

Particle Size (nm)	15	20	40	70	100	150
Absorption (nm)	518	522	530	535	240	220
Color	橙紅	紅	紅紫	藍紫	紫灰	藍灰



材料與方法

1、 膠體金（colloidal gold）的製備首先配置 0.01%之氯金酸（HAuCl-）水溶液 100 mL，加熱至 100˚C。持續攪拌並加入 1%之檸檬酸三鈉（tri-sodium citrate）之水溶液 1.1 mL。觀察氯金酸水溶液從金黃色變為灰黑、藍紫、紅紫至紅色後，繼續將溶液回流 30 分鐘。室溫下慢慢冷卻後，以去離子水恢復原體積，並將溶液 pH 值調整至中性，置於 4˚C 保存使用。

2、 膠體金與抗體的反應則為取 1 mL pH 8.0 之 25 nm 膠體金溶液加入 40 μL 抗體溶液（1 mg/mL anti-CRP mAb, CRP-9G）混合均勻，室溫下反應 5 分鐘。加入 100 μL 之 5% casein 溶液室溫下反應 5 分鐘後，以 8,000～10,000 xg 離心 10-15 分鐘。小心去除上層液後，以 100 μL 之 5% 酪蛋白（casein）水溶液震盪回溶。並置於 4˚C 保存使用。

3、 試片的製作是將硝化纖維膜（NC membrane）先以 10% methanol 處理 5 分鐘，再置 37˚C 烘箱乾燥。依序將 NC 膜、結合墊（玻璃纖維）及檢體墊（玻璃纖維）黏貼於支撐板上。在 NC 膜上 0.5 cm 位置固定 0.1 μL 濃度 0.5 mg/mL 一次抗體(anti-CRP pAb）為檢測線（test line)。在 NC 膜上 1 cm 位置固定 0.1 μL 濃度 4.3 mg/mL 二次抗體（anti-mouse pAb）為控制線（control line)，置於 37˚C 烘箱乾燥 5～10 分鐘。試片乾燥後於室溫下將以 1% casein-PBST 進行遮蔽（blocking）反應 30 分鐘後，再以 PBST 洗兩次，置於 37˚C 烘箱乾燥後，黏貼上吸收墊(absorbent pad)，於室溫下密封保存使用。

結果與討論

於試管中加入 1mL 固定量的膠體金溶液，在分別加入不同濃度的抗體溶液，室溫下反應 5 分鐘後，加入 100μL 的 10% NaCl 溶液，置於室溫下 1 小時，分別取出試管上層液利用 ELISA 分析進行游離抗體之測定，其結果如 Fig.1. 所示，當與 1mL 膠體金溶液反應的單株抗體為 45μg 時，有較多的游離抗體未與膠體金反應結合，因此取單株抗體 40μg 與 1mL 膠體金溶液進行反應結合為最適當之量。於試片上固定 15μL (2.5mM) 的膠體金抗體溶液，血清樣本量 40μL，檢測不同的 C-反應蛋白濃度，結果如 Fig.2. 所示，C-反應蛋免疫層析試片可檢測 C-反應蛋白濃度為 5~100 μg/mL。將製作完成的 C-反應蛋免疫層析試片密封置於室溫下保存，分別於 15，30，45 天，取血清樣本量 40μL，C-反應蛋白 50μg/mL 進行檢測，結果如 Fig.3. 所示，將試片保存放置 45 之久，還具有檢測效果。

結論

在 100 mL 之 0.01%氯金酸水溶液中，以 1.1 mL 之 0.01%檸檬酸三鈉水溶液所合成之膠體金粒徑約為 25 nm，且實際於試紙上聚集呈色時具有最佳之顯色能力。而在膠體金與抗體反應之最適條件為：取 pH 8.0 之 1 mL 25 nm 膠體金溶液與 40 μg 的 CRP-9G 單株抗體於室溫下進行反應 5 分鐘，以 8,000 xg 離心 15 分鐘後，以 5% casein 震盪回溶，置於 4°C 保存使用。在試片的製作過程中，在固定抗體於控制線及檢測線時，抗體固定的範圍及用量的不一致，可能會造成在結果判讀上的差異。試片完成後，待其完全乾燥有助於色帶顯色的效果，而試片可放置室溫下密封保存 45 天之久。在 C-反應蛋白免疫層析試片上能測得 C-反應蛋白最小濃度為 5 μg/mL，檢測時間在 15～20 分鐘，同時可應用於實際樣品檢測上。

參考文獻

1. Brüning A, Bellamy K, Talbot D, Anderson J. A Rapid Chromato- graphic Strip Test for the Pen-Side Diagnosis of Rinderpest Virus. Journal of Virological Methods. 1999;81:143-54.
2. Bedford MA. A Short Guide: Development Immunochromatographic Test Strips, 2nd edition, Millipore Corp, 1999.
3. Beesley J. Colloidal Gold: A New Perspective for Cytochemical Marking, 1st edition, London, Oxford University Press, 1989.
4. Chandler J, Robinson N, Whiting K, Handling False Signals in Gold-based Rapid Test. IVD Technology. 2001;7(2): 34-45.

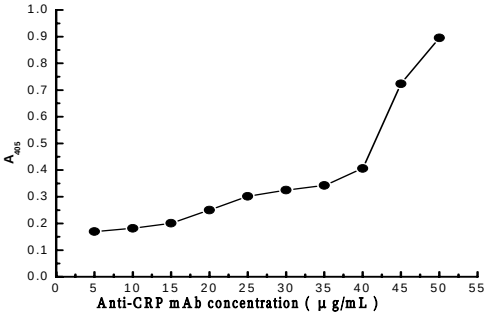


Fig.1. 單株 CRP 抗體(anti-CRP mAb)和膠體金反應最適量之測定

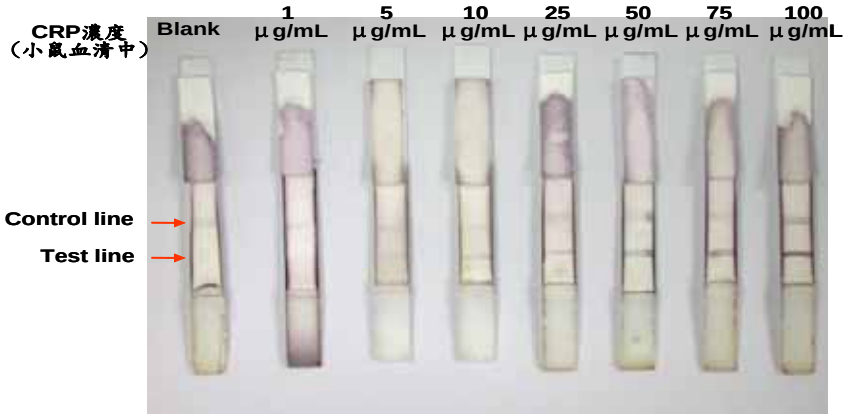


Fig.2. 免疫層析試片檢測小鼠血清中不同濃度之C-反應蛋白之結果

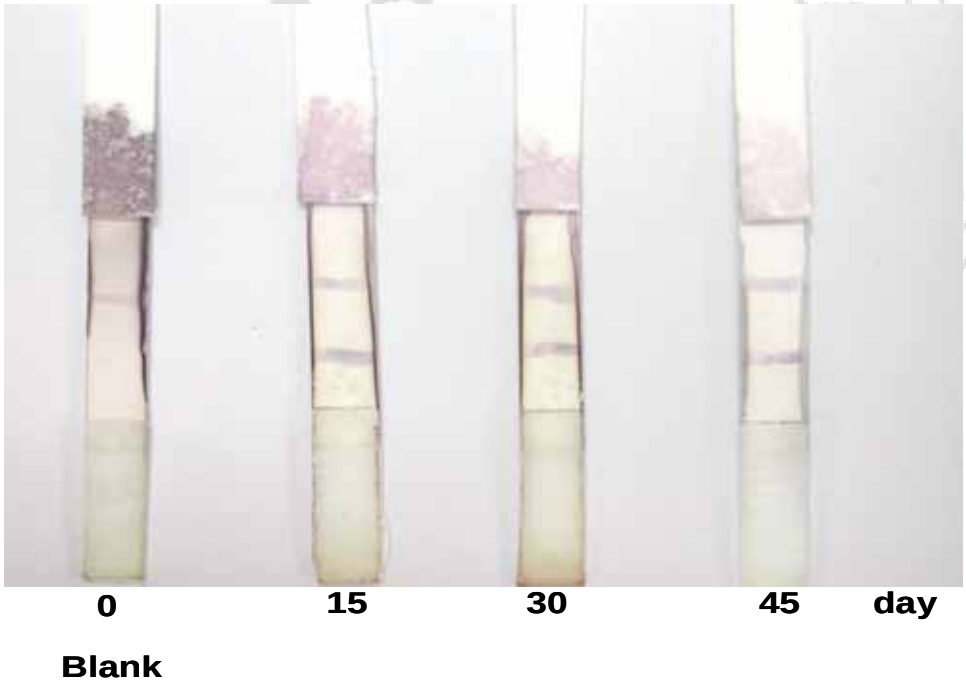


Fig.3 C-反應蛋白免疫分析試片保存期限之測試

嘉南大學