

- EMBO. J.*, 3(13): 3039-3041.
- [6] McCormick, S. et al., 1986. *Plant Cell Reports*, 5: 81-84.
- [7] Marton, L. et al., 1979. *Nature*, 277: 129-131.
- [8] Jia Jing-Fen(贾敬芬) et al., 1983. *Z. Pflanzenphysiol.*, 112: 1-6.
- [9] Wei Zhi-Ming(卫志明) et al., 1986. *Plant Cell Reports*, 5: 93-96.
- [10] Davey, M. R. et al., 1980. *Plant Sci. Lett.*, 18: 307-313.
- [11] Krens, F. A. et al., 1982. *Nature*, 296: 72-74.
- [12] Hasezawa, S. et al., 1981. *Mol. Gen. Genet.*, 182: 206-210.
- [13] Okada, K. et al. 1985. *Plant Cell Reports*, 4: 133-136.
- [14] Baba, A. et al., 1986. *Plant Cell Physiol.*, 27(3): 463-471.
- [15] Deshayes, A. et al., 1985. *The EMBO. J.*, 4(11): 2731-2737.
- [16] Paszkowski, J. et al., 1984. *The EMBO. J.*, 3(12): 2717-2722.
- [17] Potrykus, I. et al., 1985. *Mol. Gen. Genet.*, 199: 169-177.
- [18] Potrykus, I. et al. 1985. *Mol. Gen. Genet.*, 199: 183-188.
- [19] Fromm, M. et al., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82(17): 5824-5828.
- [20] Paszkowski, J. et al.: 1986. *Plant Mol. Biol.*, 6: 303-312.
- [21] Lawrence, W. A. et al.: 1985, *Plant Cell Reports*, 4: 33-35.
- [22] Crossway, A. et al.: 1986 *Mol. Gen. Genet.*, 202: 179-185.
- [23] Zhou, G. Y. (周光宇) et al.: Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in Enzymology*, 1983, 101, 433. Wu, R., Grossman, L. and Moldave, K. (eds), Academic Press, New York.
- [24] 李向辉等: 1981. 中国科学, B辑 3:223-230.

## 胶体金标记技术

夏诗茂 洪涛

(中国预防医学科学院病毒学研究所 北京)

凌静萍

(中国药品生物制品检定所 北京)

1962年, Feldherr和Marshall<sup>[1]</sup>第一次介绍了胶体金可作为一种在电子显微镜(以下简称电镜)下示踪的标志(trace)。1971年, Faulk<sup>[2,3]</sup>首先将胶体金作为一种特异的标记物(marker)应用于电镜研究中。近十年来,胶体金标记技术不仅越来越广泛地应用于透射电镜中研究各种生物大分子的定位、定性、形态发生、抗原特性等,而且同样可用于扫描电镜和光学显微镜方面。

### 一、原理与特点

氯化金在还原剂作用下(也可用其它方法)聚合形成特定大小的金颗粒,彼此因静电作用相互排斥使其保持一个较稳定的胶体状态,故称作胶体金(colloidal gold)。胶体金颗粒表面能结合多种生物大分子(如免疫球蛋白、葡

萄球菌A蛋白、植物凝血素、刀豆球蛋白A等)<sup>[4,5]</sup>。因此可利用胶体金的这些物理学特性(特定大小和形状、高电子密度、颜色反应等)和活化后不同的生物学特点,在细胞生物学领域内开展多方面的标记研究工作。而且该方法具有如下许多优越性:

1. 胶体金为颗粒性标记物,因此具有精确的定位能力,标记后不影响对细胞超微结构的分辨。

2. 具有高电子密度,电镜下很容易观察和辨认。与铁蛋白标记物相比,后者密度相对较低,其核心在电镜下易与其它重金属染料(如铅、铀等)的污染颗粒相混淆。

3. 活化后的胶体金颗粒在细胞上的非特异性吸附较低。

4. 金颗粒的高电子密度使其具有很好的

发射二次电子的能力,所以是一较理想的用于扫描电镜观察的标记物。

5. 胶体金本身的颜色以及与其它显色染料结合应用能满意地用于光学显微镜观察。

6. 从制备上论,胶体金的制备过程比较简便。虽然,目前对它结合多种生物大分子的机理所知较少,但只要有精确的试剂浓度、pH值和离子强度,生物大分子能很容易地吸附到金颗粒表面,这一过程不涉及到化学反应。

7. 采用不同的还原剂以及通过对其剂量的控制或程序的改变可以制成不同大小的金颗粒(3—100 nm)。用小颗粒胶体金标记能在更高分辨率的水平上进行电镜观察,由于空间位阻小而能更多地结合到特定部位,因此可提高标记的敏感性和精确定位能力;应用大颗粒胶体金进行标记,可在较低分辨率的水平上进行透射、扫描或光学显微镜观察,且能提高观察效率;利用不同大小的胶体金同时分别标记多种抗原,可获得多标记效果。

## 二、方 法

### (一) 胶体金制备

在氯化金溶液中加入不同的还原剂可制备出不同大小直径的金颗粒。常用的三种还原剂(柠檬酸、抗坏血酸和白磷)可分别制备出大、中和小三种主要胶体

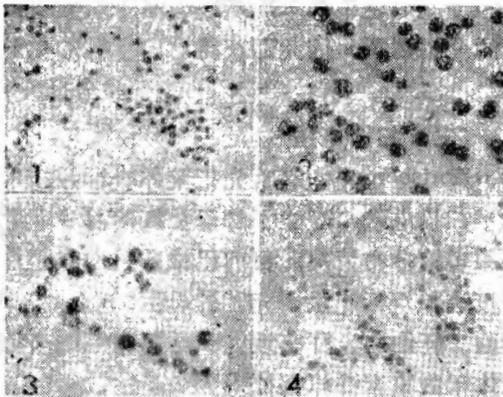


图 1、2 不同柠檬酸还原法制备的 6 nm 和 10 nm 直径的胶体金颗粒

图 3 抗坏血酸法制备的平均 13 nm 直径的金颗粒

图 4 白磷法制备的平均 5 nm 直径的金颗粒

金<sup>[6]</sup>。目前有更多的实验室仅以柠檬酸为还原剂即可制成不同大小的金颗粒<sup>[7]</sup>。我们实验发现,柠檬酸法制备的金颗粒其均一性和分散性均优于抗坏血酸法和白磷法生产的胶体金,而且能获得更好的标记效果<sup>[8]</sup>。图 1-4 为几种不同方法制备的胶体金电镜图像。

胶体金制备一般需在中性 pH(7.2 左右)条件下进行,其溶液为红色,大颗粒胶体金呈紫红色,凝聚后的胶体金呈紫色。正常情况下,胶体金溶液(或称溶胶)应清澈而不含任何可见的沉淀或漂浮物,否则很可能是由于不洁的溶液、试剂、瓶皿等所致。这将造成如下结果:1)不能获得预期大小的金颗粒;2)影响到下一步生物大分子与金颗粒的结合以及活化后胶体金的稳定性。因此,为了获得高质量的胶体金,应选择最纯净的各有关试剂。如有条件,所有配制好的试剂用前最好再经超过滤处理,以去除其中的分子聚合物和可能混入的杂质。制备所需的水以三蒸去离子水最理想,各类器皿均需经严格清洗<sup>[4]</sup>,盛胶体金的瓶皿经过硅化后则能更有效地保存胶体金。胶体金在活化之前具有一定的稳定性,4℃可存放数日,若经超过滤和透析处理后加叠氮钠能保存数月<sup>[9]</sup>。

### (二) 胶体金的活化(即胶体金与具有生物学活性的大分子的结合)

#### 1. 生物大分子制备

盐类成分能影响胶体金的吸附能力,过量的盐类使金颗粒发生凝集。因此,生物大分子应该溶解在无盐或极低盐浓度的溶液中。但是某些大分子在这种情况下可能形成多聚体(特别是在较高的浓度下)或有其它的生物学特性的改变<sup>[10]</sup>。所以,当需要透析这些生物大分子时,应考虑到上述特点选用不同的透析液,如 0.005 mol/L NaCl、EDTA 或乙二醇溶液<sup>[2,11]</sup>。生物大分子临用前的高速离心或超过滤处理对于去除其中的聚合物很是必需,因为大分子团块吸附到金颗粒表面是造成胶体金不稳定的一个重要原因。

#### 2. 生物大分子的用量及其与胶体金的结合

金颗粒表面过多或过少地结合生物大分子均使胶体金呈不稳定状态。它们的最佳结合比例量可通过如下方法测得:即一定量的胶体金加到不同稀释度的大分子溶液中,吸附后再加入 10% NaCl 视其颜色或紫外线吸收峰的改变测定之<sup>[4,10]</sup>。然后按计算结果以 10%—20% 过量加入生物大分子使达到饱和结合浓度。pH 值明显影响吸附过程<sup>[10]</sup>,一般讲,胶体金的 pH 应调整到待结合蛋白质的等电点或稍偏碱的范围中。当以上条件选定后,胶体金即可快速加到生物大

分子溶液中,倒过来进行可能造成凝聚或不完全包被而产生絮凝。大分子与金颗粒结合后再加入一定量的聚乙二醇能进一步稳定已活化(包被)后的胶体金。超离心可将胶体金浓缩并去除其中未结合而游离的生物大分子。活化的金颗粒经负染色后在电镜下能见到其表面的蛋白层<sup>[12]</sup>,但是当相对较小分子量的蛋白质与其结合时则不一定能发现这层蛋白晕。

### 3. 活化胶体金的稳定性和保存

活化后的胶体金当加入了一定量的聚乙二醇后无菌条件下于4℃可存放数月或一年以上<sup>[2,10]</sup>。

## (三) 胶体金应用在透射电镜中的几种主要标记方法

### 1. 包埋前标记

(1) 细胞表面标记: 这种标记法可用于细胞膜上抗原物质的定性、定位和定量研究。实验可分直接法、间接法、单标记或多标记。显然,直接法的非特异性反应少,间接法较敏感及广谱应用范围。单标记是指用一种胶体金所进行的标记实验;所谓多标记,是利用几种不同大小的金颗粒(每一种金颗粒结合一种特定的生物大分子)同时标记细胞上相应的不同抗原成分,以达到了解多种抗原物质的分布状态和相互关系等<sup>[4,5]</sup>。若需进行定量分析,可通过直接计数<sup>[13]</sup>、分光光度测定<sup>[14]</sup>、放射检测<sup>[9]</sup>或X-射线分析<sup>[15]</sup>多种方法。

(2) 细胞穿透标记: 即使是最小的金颗粒也不能通过完整的细胞膜进入细胞内。但是,用某些理化方法(如超声波处理或冻融细胞、去污剂-皂角甙等试剂的应用)可人为地使细胞膜的通透性增大,使得金颗粒能自由地进出细胞浆而达到标记细胞内抗原的目的。应当注意的是,对不同的实验需要摸索一个恰当的处理条件,使细胞的损害降低到最小限度。此外,对细胞核内、细胞器内部和某些致密体结构,穿透标记还有很多困难不易解决。

### 2. 超薄切片后标记

该方法包括低温包埋切片、冷冻切片和常规包埋切片标记实验。其显著特点是:胶体金可标记到细胞中任一部位,目前已在细胞生物学的许多方面得到应用<sup>[13,16,17]</sup>。低温包埋是将组织或细胞经适当固定后在低温条件下包埋聚合<sup>[18]</sup>,然后再切片;而冷冻切片则省去了包埋步骤,标本经固定处理后直接在冰冻状态下切片<sup>[5]</sup>。因此,这两种方法均能有效地保存组织细胞的抗原活性。但是,这类方法所需的试剂、仪器

设备和技术条件目前在国内还受到一定的限制,而且包埋剂和冷冻过程都对细胞超微结构的保存有明显的影 响。

LR white<sup>[19]</sup>和LK4M<sup>[20]</sup>是现在较多用的两种低温包埋树脂,前者对超微结构保存较好,后者能更多地保存抗原的活性。如果某些抗原成分能耐受高温聚合,样品则可直接以812树脂作常规包埋切片进行标记实验<sup>[21]</sup>,可获得最好的超微结构图像。

## 三、胶体金标记技术的应用范围

自七十年代初首次用胶体金作为透射电镜的探针研究沙门氏菌细胞壁表面抗原的分布以来,该技术几经改进日趋完善,应用范围亦逐渐扩大。总的说来,胶体金标记技术主要是用来进行免疫组织化学和细胞化学方面的研究。

### (一) 在普通光学显微镜方面的应用

胶体金呈红色,当细胞表面有足够量的特异结合的胶体金标记物时,在普通显微镜下即可见到细胞表面橙红色的外膜。Geoghan<sup>[22]</sup>等已用于定量测定人外周血液中B淋巴细胞的数量。也有人用胶体金技术代替荧光技术,直接在普通光镜下观察而不需荧光显微装置。

### (二) 荧光显微镜

Horisberger<sup>[23]</sup>将结合有荧光素的生物大分子吸附到金颗粒上,首先对酵母菌细胞壁上甘露聚糖进行荧光镜下的定向性分布观察,然后再包埋制成电镜标本,从超微水平研究甘露聚糖的分布规律,因此而获得了更多的实验结果。

### (三) 扫描电镜

Horisberger<sup>[24]</sup>等首先把胶体金标记技术应用用于扫描电镜,观察了酵母菌细胞壁表面糖蛋白和多糖分布情况。目前已报道采用直接法、间接法和双标记法研究了酵母菌、血小板、红细胞、肝细胞、肝癌细胞和结肠癌细胞表面的抗体和凝集素受体部位<sup>[4,9,25]</sup>。

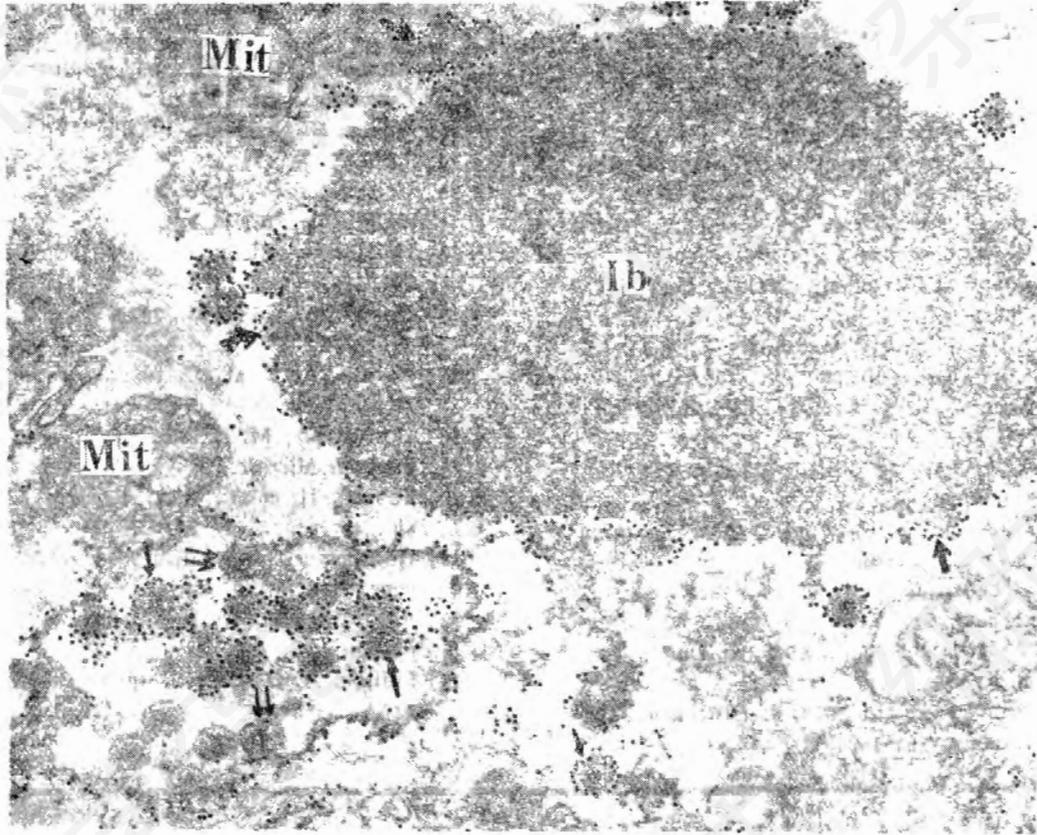
应用于扫描电镜的胶体金,随扫描电镜的分辨率的不同,可选用20—75nm范围内的金颗粒。应当指出,扫描电镜标本常由于抗原从细胞表面脱落造成一些人工假象而导致错误的

解释。因此,如果在扫描电镜胶体金标记的同时能结合透射电镜观察,可获得更客观的结果<sup>[28]</sup>。

#### (四) 透射电镜

胶体金标记技术在透射电镜中已得到广泛应用。田中春高<sup>[27]</sup>等用A蛋白-胶体金复合物标记观察了成人T淋巴细胞白血病相关抗原和成人T淋巴细胞白血病病毒抗原在Mt-2细胞

表面的分布情况。Horisberger<sup>[28]</sup>和Nurden<sup>[25]</sup>用多标记法分别观察了人的红细胞和血小板表面各种凝集素的受体位置。其他一些学者还进一步研究了这些凝集素受体之间的相互作用以及影响这些受体重新分布的各种因素<sup>[29]</sup>。笔者曾用皂角甙处理细胞进行细胞内标记实验,研究了轮状病毒的形态学、形态发生学和抗原特性,并获得了较理想结果<sup>[8]</sup>,如下图:



轮状病毒感染细胞的胶体金标记实验的电镜图像×50,000

细胞浆内成熟病毒(细箭头示)和单壳病毒(粗箭头)表面特异性地结合有大量胶体金颗粒,而有膜病毒(双箭头)和病毒包含体(Ib)则不与金颗粒发生反应。腺粒体(Mit)膜上无非特异性吸附的金颗粒。

上图除显示胶体金标记所具有的特异性强、定位精确、非特异性吸附低等特点外,尚可发现轮状病毒获得内、外壳抗原的途径和部位,以及病毒包含体和细胞内质网与病毒发育的关系。由此可见胶体金标记技术确实有其独特的优点。值得推广、普及。

另外,近来在研究 mRNA 亚细胞定位工

作中, Fuliton<sup>[30]</sup>把核酸杂交技术与胶体金标记技术结合起来应用业已获得一些较好结果,这为进一步扩展胶体金标记技术的应用范围开创了新的途径。

#### 摘 要

胶体金标记技术是七十年代发展起来的应

用于细胞生物学研究中的一种较理想的标记方法。本文根据文献资料并结合作者自己的实验比较系统地而又有重点地介绍和讨论了该技术方法所涉及的一般原理、方法特点、技术关键和有关注意事项,且详细列举了该方法在细胞生物学领域内的多种用途和不同方法所研究的对象及其某些实验结果。

### 参 考 文 献

- [1] Feldherr, C. M. and Marshall, J. M., 1962, *J. Cell. Biol.*, 12: 640.
- [2] Faulk, W. P. and Taulor, G. P., 1971, *Immunochem.*, 8: 1081.
- [3] Faulk, W. P. et al., 1971, *Nature New Biol.*, 231: 101.
- [4] Horisberger, M. et al., 1971, *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 295.
- [5] Gueze, H. J. et al., 1981, *J. Cell. Biol.*, 89: 653.
- [6] Slot, J. W. and Gueze, H. J., 1981, *J. Cell. Biol.*, 90: 533.
- [7] Demey, J. et al., 1984, *EMSA Bulletin.*, 14: 54.
- [8] 夏诗茂等, 1987, 中国医学科学院学报 Vol. 9(1): 50.
- [9] Goodman, S. L. et al., 1979, *Scanning Electron Microsc.*, 3: 619.
- [10] Geoghegan, W. D. et al., 1977, *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 1187.
- [11] Wagner, M. et al., 1977, *Z. Immn. Forsch.*, 153: 450.
- [12] Roth, J. et al., 1978, *J. Histochem. Cytochem.*, 26: 1074.
- [13] Bendayan, M. et al., 1980, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 149.
- [14] Horisberger, M., 1979, *Biol. Cellulaire.*, 36: 253.
- [15] Hoyer, L. C. et al., 1979, *Scanning Electron. Microsc.*, 3: 629.
- [16] Ravazzola, M. et al., 1980, *Nature.* 284: 66.
- [17] Roth, J. et al., 1980, *J. Histochem. Cytochem.* 28: 55.
- [18] Roth, J. et al., 1979, *Histochem.* 64: 115.
- [19] Newman, G. R. et al., 1983, *Histochem. J.*, 15: 543.
- [20] Altman, L. G. et al., 1984, *J. Histochem. Cytochem.*, 32: 1217.
- [21] Huang, S. N. et al., 1985, *EMSA BULLETIN.*, 15 (2): 65.
- [22] Geoghegan, W. D. et al., 1978, *Immunolog. Commu.*, 7: 1.
- [23] Horisberger, M. et al., 1979, *Histochem.*, 64: 115.
- [24] Horisberger, M. et al., 1975, *Experientia.*, 31: 1147.
- [25] Nurden, A. T. et al., 1980, *Experientia.*, 36: 1215.
- [26] Horisberger, M. et al., 1980, *Scanning Electron Microsc.*, 11: 9.
- [27] Tanaka, H. et al., 1984, *Cancer. Reserch.*, 44: 3493.
- [28] Horisberger, M. et al., 1979, *J. Microscope.*, 115: 97.
- [29] Roth, J. et al., 1978, *J. Histochem. Cytochem.*, 26: 163.
- [30] Fuliton, A. B. et al., 1980, *Cell.*, 20: 847.

### 细胞培养试剂信息

为了支持开展细胞培养和免疫学方面的科研工作,并解决当前培养剂供货不足和国外订货周期长的困难,中国科学院上海细胞生物学研究所与厦门中华医学生物工程公司合作,并通过国际合作,供应各种国内外细胞培养试剂,可以接受各种国外订货,保证三个月内交货,以人民币结算,低于市场价格,并备有部分现货供应。

需要者请与中国科学院上海细胞生物学研究所开发部联系。

地址:上海市岳阳路320号。

电话:315030×66分机。电报挂号:3334。