

# SDS-PAGE 法检测产气荚膜梭菌毒素型研究

于晓霞,姚美玲,张 彬,柴同杰

(山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018)

**[摘要]** 为了探索一种快速、准确检测产气荚膜梭菌毒素型的方法,以便有效预防控制该病的流行和发生,利用 SDS-PAGE 方法,对通过 ELISA 鉴定的 20 株(A 型 16 株、C 型 3 株和 D 型 1 株)德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株,以及通过 Multiplex-PCR 鉴定的 57 株山东省疫区产气荚膜梭菌分离株外毒素蛋白的相对分子质量进行测定,以确定毒素的种类,进而确定菌株的毒素型。结果表明,产气荚膜梭菌标准株、德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株、山东省疫区产气荚膜梭菌分离株粗提外毒素的质量浓度分别为 3.261,2.238~3.333,1.451~3.109 mg/mL,精提外毒素的质量浓度分别为 0.803,0.521~0.999,0.530~0.812 mg/mL。SDS-PAGE 法检测的 20 株德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株中 A 型 17 株、C 型 2 株、D 型 1 株,与 ELISA 检测结果的符合率为 95.0%; SDS-PAGE 检测的 57 株山东省疫区产气荚膜梭菌分离株全部是 A 型,与 Multiplex-PCR 检测结果的符合率为 100%。说明应用 SDS-PAGE 方法对产气荚膜梭菌的检测方法与 ELISA 方法的检测结果有一定的差异性,与 Multiplex-PCR 方法的检测结果一致。

**[关键词]** SDS-PAGE;毒素蛋白;毒素型鉴定;产气荚膜梭菌分离株

**[中图分类号]** S852.61

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)12-0030-07

## Research on contrast of SDS-PAGE identifying toxin types of *Clostridium perfringens*

YU Xiao-xia, YAO Mei-ling, ZHANG Bin, CHAI Tong-jie

(College of Animal Sciences and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** This experiment was carried out by using SDS-PAGE method to determine the molecular weight of exotoxin protein produced by 20 (16 of type A, 3 of type C and 1 of type D) airborne *Clostridium perfringens* strains from cow stable that the toxin types were examined by ELISA and 57 *Clostridium perfringens* strains selected from Shandong Province had been identified by multi-PCR to confirm the kind of toxin, then their toxin types were obtained. The detecting results showed that the quality concentrations of exotoxin by coarse distill of *Clostridium perfringens* standard strains, airborne *Clostridium perfringens* samples from cow stable in German and *Clostridium perfringens* strains separated from Shandong Province were 3.261, 2.238—3.333 and 1.451—3.109 mg/mL, respectively; the quality concentrations of exotoxin by extractive distill were 0.803, 0.521—0.999 and 0.530—0.812 mg/mL, respectively. The detecting results of 20 airborne *Clostridium perfringens* strains from cow stable were 17 of type A, 2 of type C and 1 of type D, and the accordance with ELISA was 95.0%; the detecting results of 57 *Clostridium perfringens* strains separated from Shandong Province were all of type A, and the accordance with multi-PCR was 100%. The results showed that the difference existed between ELISA method and SDS-PAGE method and

\* [收稿日期] 2006-11-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571381)

[作者简介] 于晓霞(1980—),女,山东文登人,在读硕士,主要从事病原微生物的分离与鉴定研究。E-mail: xiaoxia17315@163.com

there was coherence between multi-PCR method and SDS-PAGE method.

**Key words:** SDS-PAGE; toxin; toxin types detection; *Clostridium perfringens* separated strains

早在 1985 年我国就有产气荚膜梭菌引起“猝死症”的报道,该病呈点散发,1990 年以后,发病数量逐年增多,发病区域也由点状散发发展为片状散发流行,给我国养殖业造成了巨大的经济损失。

产气荚膜梭菌直接的致病因素是其所产生的 12 种蛋白毒素,其中  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$  和  $\iota$  4 种是比较重要的致死毒素,根据这 4 种毒素可将产气荚膜梭菌分为 A ( $\alpha$ ), B( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ ), C( $\alpha$ 、 $\beta$ ), D( $\alpha$ 、 $\epsilon$ ) 和 E( $\alpha$ 、 $\iota$ ) 型。A 型产气荚膜梭菌主要引起气性坏疽和人类食源性食物中毒;C 型产气荚膜梭菌是引起动物(如绵羊、羔羊、犊牛、仔猪等)肠毒血症、坏死性肠炎的主要病原;D 型产气荚膜梭菌可引起羔羊痢疾和绵羊多囊肾。对人致病的主要是 A 和 C 型,B、C、D 三型与动物的感染密切相关<sup>[1]</sup>。

由于该病发病急、死亡快,因此,及时准确地对疫区流行的产气荚膜梭菌毒素型进行判断是非常必要的。产气荚膜梭菌毒素型的鉴定多采用血清学方法,但该方法不仅需要特殊的设备,而且要求具备一定的专业技能,操作繁琐费时,浪费试验动物且敏感性较低;近几年来,采用 ELISA 和多重 PCR 对毒素检测判定细菌毒素型的报道较多<sup>[2-4]</sup>,其中,ELISA 方法具有较高的特异性,但因需要酶标仪等特殊设备难以在实际应用中推广;多重 PCR 通过对几种毒素基因的扩增来鉴定毒素型,但是需要进行引物设计、DNA 模板制备和扩增等繁杂操作,在模板处理和反应时间上还存在繁琐费时的缺点,并且对同一菌株毒素型的确定目前多采用单一的鉴定方法,采用多种方法进行鉴定结果的比较也很少。为此,本试验利用 SDS-PAGE 方法,对产气荚膜梭菌标准株、德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株和山东省疫区产气荚膜梭菌分离株进行毒素型鉴定,并同已经过 ELISA 和多重 PCR 方法鉴定的结果进行比较,以期找到一种更快速准确检测产气荚膜梭菌毒素型的方法,以便有效地预防控制该病的流行和发生。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌 种 产气荚膜梭菌标准株 NTCC Type B 6121、德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株 20 株,均由山东农业大学动物科技学院微生物实验

室保存;山东省疫区产气荚膜梭菌分离株 57 株,由山东各疫区采样分离得到。

1.1.2 培养基 营养肉汤,购自上海伊华医学科技有限公司;血一葡萄糖一琼脂,按文献<sup>[5]</sup>配制;Gordon 汤,按文献<sup>[6]</sup>配制;液体硫乙醇酸盐培养基(FT),购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.3 主要试剂 硫酸铵,购自北京化工厂;Sephadex G-200,购自上海长征制药厂;SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质,购自大连宝生物工程有限公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、SDS、TEMED、考马斯亮蓝 R-250,均购自上海生物工程有限公司;过硫酸铵,购自天津市大茂化学仪器供应站。

1.1.4 主要仪器设备 Anke GL-20G-Ⅱ型冷冻离心机,购自上海安亭科学仪器厂;UV-762 型紫外/可见光分光光度计,购自上海精密科学仪器有限公司;MP3 多功能微型电泳仪,美国 Bio-Rad 公司生产;ML-902 型定时磁力恒温搅拌器,购自绍兴市卫星医疗设备制造有限公司;HL-2 型恒流泵,购自上海市青浦沪西仪器厂;YQX 型厌氧培养箱,购自上海跃进医疗器械厂;PHS-3C 型精密 pH 计,购自上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂;OLYMPUS CH-2 型光学显微镜, JAPAN 生产;TS-92 型万向摇床,购自江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

### 1.2 产气荚膜梭菌外毒素培养物的制备

将产气荚膜梭菌标准株 NTCC Type B 6121 接种到含体积分数 5% 公绵羊血和 10 g/L 葡萄糖的血琼脂平板上,在含体积分数 88%  $N_2$ 、7%  $H_2$ 、5%  $CO_2$  的厌氧培养箱中,43 °C 培养 24~48 h。挑取典型菌落接种到液体硫乙醇酸盐培养液中,在相同的环境中增菌培养 12~18 h 后,接种于产毒培养基中,同样条件下厌氧振荡培养 4~6 h,即得到产气荚膜梭菌培养物。

### 1.3 产气荚膜梭菌外毒素的粗提

将产气荚膜梭菌培养物于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液 200 mL,室温下向其中加入固体硫酸铵至 60% 饱和度,4 °C 静置过夜。于 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min,分别收集上清和沉淀。再向收集的上清液中缓缓加入固体硫酸铵使其达到 40% 饱和度,收集沉淀蛋白,将两次沉淀溶解于 3 mL 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液中,即为产气荚膜梭菌粗提外毒素。用紫外分光光度计

测定其  $A_{280}$  和  $A_{260}$ , 按文献[7]的方法计算粗提外毒素质量浓度。

#### 1.4 产气荚膜梭菌外毒素的纯化

1.4.1 透析脱盐 将透析袋放在 0.1 mol/L EDTA(乙二胺四乙酸)溶液中煮沸 30 min, 再换蒸馏水煮沸 2~3 次, 每次煮沸 30 min, 以除去蛋白酶、重金属等对蛋白有害的物质。将产气荚膜梭菌粗提外毒素溶液装入透析袋内, 将袋口扎好放入装有 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液的大容器中, 通过磁力搅拌器不断搅拌使 Tris-HCl 缓冲液始终处于流动状态。经过 12 h 后, 采用 50 g/L  $BaCl_2$  溶液监测容器内缓冲液中  $SO_4^{2-}$  离子的析出情况, 以达到最终脱盐的目的。脱盐后用 PEG(聚乙二醇)浓缩粗提液至 1.5 mL。

1.4.2 SephadexG-200 分子筛层析 用 SephadexG-200 凝胶装柱, 柱长 40 cm, 直径 10 mm, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液充分平衡后, 加入 1.5 mL 样品, 以 0.05 mol/L Tris-HCl 进行洗脱。恒流泵控制 12 滴/min 的速度收集各蛋白洗脱液 2 mL/管, 并用紫外分光光度计测定各管收集液的  $A_{280}$  值, 监测蛋白析出峰, 并将各管收集液适当浓缩后检测毒素活性。其他菌株的提纯方法同上。

(1)  $\alpha$ 、 $\beta$  毒素活性检测。取浓缩液, 分别与 A 型产气荚膜梭菌抗毒素血清和抗  $\beta$  毒素血清进行琼脂扩散试验, 操作按常规方法进行。将各管浓缩液分别加入抗原孔中, 根据抗原抗体反应结果, 将能形成白色沉淀线的各管收集液合并后用 PEG 浓缩。

(2) 胰酶激活处理。1% 胰酶水溶液与各管收集液 1:9(体积比)混合, 37 °C 保温 30 min。胰酶处理对  $\epsilon$  毒素起激活作用, 对  $\alpha$  及  $\beta$  毒素起灭活作用。

取经胰酶处理后的毒素液与 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清进行琼脂扩散试验, 操作按常规方法进行, 将出现沉淀线的各管收集液合并后用 PEG 浓缩。

#### 1.5 产气荚膜梭菌外毒素的 SDS-PAGE 电泳

将提纯的毒素蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳所用的分离胶质量浓度为 150 g/L, 浓缩胶质量浓度为 50 g/L。在加样孔分别加入处理好的 SDS-PAGE 低分子量标准蛋白 20  $\mu$ L 和毒素蛋白浓缩液 10  $\mu$ L, 样品进胶前将电压控制在 90 V, 当样品进入浓缩胶后, 将电压控制在 120 V 左右进行电泳。电泳完毕后, 将凝胶剥离后放入染色皿中, 在万向摇床上振荡染色。然后用蒸馏水漂洗后加入脱色液, 在摇床上振荡脱色, 直至蛋白质区带清晰为止。根据毒素蛋白电泳显示条带的位置, 对照标准株不同毒

素蛋白的条带位置确认被检毒素的分子量, 从而确定菌株的毒素型, 或根据标准蛋白各条带的迁移率及其分子量对数绘制的标准曲线, 求得毒素蛋白的分子量, 进而确定菌株的毒素型。

#### 1.6 产气荚膜梭菌外毒素的 ELISA 和 Multiplex-PCR 检测方法

1.6.1 ELISA 方法 产气荚膜梭菌外毒素培养物的制备方法同 1.2, 采用标准抗 C( $\beta$ )-血清和抗 D( $\epsilon$ )-血清, 用于包被微量反应板及进行异系、全部中和试验。采用 ELISA 检测毒素的主要步骤: 包被抗体, 抗 C-板和抗 D-板冲洗, 封闭, 样品稀释, 中和试验, 加酶标抗体, 加底物, 测量, 评定。

1.6.2 Multiplex-PCR 方法 主要步骤: Multiplex-PCR 引物设计, 模板 DNA 的制备和 Multiplex-PCR 扩增。

## 2 结果与分析

### 2.1 产气荚膜梭菌外毒素的粗提

产气荚膜梭菌标准株粗提外毒素的质量浓度为 3.261 mg/mL, 德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株为 2.238~3.333 mg/mL, 山东省疫区产气荚膜梭菌分离株为 1.451~3.109 mg/mL。

### 2.2 产气荚膜梭菌外毒素的纯化

产气荚膜梭菌标准株 NTCC Type B 6121、德国牛舍气源性产气荚膜梭菌分离株(17A、13A、21C、35C、57C、9D)和山东省疫区产气荚膜梭菌分离株(LWZ、LYZ、QHN、TAT、YTT、ZZN)的层析曲线见图 1~3。

图 1 产气荚膜梭菌标准株 NTCC Type B 6121 的 SephadexG-200 层析曲线

Fig. 1 SephadexG-200 chromatography curve of NTCC Type B 6121

由图 1 可见, 产气荚膜梭菌标准株用 SephadexG-200 层析时出现了 3 个蛋白质吸收峰, 毒素活性

测定结果表明,第1个峰为 $\alpha$ 毒素活性峰,第2个峰具有 $\beta$ 和 $\epsilon$ 毒素活性,第3个峰为杂蛋白峰,将具有毒素活性的第3~7管和第9~11管收集液分别合并,并用PEG浓缩至1.5 mL。由图2可以看出,德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株17A用SephadexG-200层析时出现了3个蛋白质吸收峰,毒素活性检测结果表明, $\alpha$ 毒素活性峰位于6,7管,其他峰为杂蛋白峰;13A层析时出现了2个蛋白质吸收峰,其中第1个峰的5~7管有 $\alpha$ 毒素活性;21C层析时也出现了2个蛋白质吸收峰,在第1个峰的6~8管中检测有 $\alpha$ 毒素活性,在第2个峰的10,11管中有 $\beta$ 毒素活性;35C层析时只有1个蛋白质吸收峰,4~6管中毒素活性检测只有 $\alpha$ 毒素活性;57C层析曲线有3个蛋白质吸收峰,但第1个和第3个峰检测不到毒素活性,为杂蛋白峰,在第2个峰的5~9管中既有 $\alpha$ 毒素活性也有 $\beta$ 毒素活性;9D层析时出现了2个蛋白质吸收峰,检测第1个峰的3,4

管中含有 $\alpha$ 毒素活性,第2个峰的6~9管中含有 $\epsilon$ 毒素活性。将上述各分离株具有毒素活性的各管收集液分别合并,并用PEG浓缩至1.5 mL。由图3可以看出,山东省疫区产气荚膜梭菌分离株(LWZ、LYZ、QHN、TAT、YTT、ZZN)的层析曲线均有1个主蛋白质吸收峰,毒素活性检测结果表明,该主蛋白质吸收峰为 $\alpha$ 毒素活性峰,依次将各分离株的具有 $\alpha$ 毒素活性的第3~4管、第3~5管、第6~8管、第4~5管、第4~8管和第5~9管收集液分别合并,并用PEG浓缩至1.5 mL。

产气荚膜梭菌标准株精提外毒素的质量浓度为0.803 mg/mL,20株德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株精提外毒素的质量浓度为0.521~0.999 mg/mL,57株山东省疫区产气荚膜梭菌分离株精提外毒素的质量浓度为0.530~0.812 mg/mL。

图2 德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株(17A、13A、21C、35C、57C、9D)的SephadexG-200层析曲线

Fig. 2 SephadexG-200 chromatography curve of German airborne *Cl. perfringens* strains

(17A,13A,21C,35C,57C,9D)

图 3 山东省疫区产气荚膜梭菌分离株(LWZ、LYZ、QHN、TAT、YTT、ZZN) 的 SephadexG-200 层析曲线  
Fig. 3 SephadexG-200 chromatography curve of Shandong *Cl. perfringens* strains  
(LWZ,LYZ,QHN,TAT,YTT,ZZN)

### 2.3 产气荚膜梭菌外毒素的 SDS-PAGE 电泳结果

将上述纯化的毒素蛋白进行 SDS-PAGE,结果如图 4~6 所示。从图 4~6 可以看出,无论是产气荚膜梭菌标准株提纯毒素,还是德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株、山东省疫区产气荚膜梭菌分离株的提纯毒素,其电泳条带均比较清晰,基本无杂蛋白条带,且接近标准蛋白分子质量<sup>[8-10]</sup>。从根据标准蛋白各条带的迁移率及其分子质量对数绘制的标准曲线可知,各型菌株纯化的  $\alpha$  毒素分子质量为 42.6~43.6 ku, $\beta$  毒素分子质量为 34.4 ku, $\epsilon$  毒素分子质量为 32.1 ku。

由此可见,将产气荚膜梭菌外毒素经硫酸铵盐析、透析脱盐及 SephadexG-200 层析后,能够较好地提纯,可以作为一种毒素蛋白的检测方法,并由此可确定产气荚膜梭菌的毒素型。

图 4 产气荚膜梭菌标准株 NTCC Type B 6121 毒素蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis picture of the toxin of NTCC Type B 6121

图 5 德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株 9D、17A、13A、35C、21C 和 57C 毒素蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果  
 Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis picture of the toxin of German airborne *Cl. perfringens* strains (9D,17A,13A,35C,21C,57C)

和 Multiplex-PCR 2 种方法检测,结果 57 株分离株均为 A 型,两种方法检测结果一致,符合率为 100%。Multiplex-PCR 的检测结果如图 7 所示。

表 1 SDS-PAGE 和 ELISA 检测德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株毒素型的比较

Table 1 Type percentage of the separate *Cl. perfringens* from the air of calf stable detected by

方法 Method	SDS-PAGE and ELISA				%
	A 型 Type A	B 型 Type B	C 型 Type C	D 型 Type D	
SDS-PAGE	85.0	0.0	10.0	5.0	
ELISA	80.0	0.0	15.0	5.0	

图 6 山东省疫区产气荚膜梭菌分离株 LWZ、LYZ、QHN、TAT、YTT 和 ZZN 毒素蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果  
 Fig. 6 SDS-PAGE electrophoresis picture of the toxin of Shandong *Cl. perfringens* strains (LWZ,LYZ, QHN,TAT, YTT,ZZN)

## 2.4 产气荚膜梭菌外毒素检测结果的差异性

2.4.1 SDS-PAGE 与 ELISA 检测德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株外毒素结果的比较 20 株德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株经 SDS-PAGE 检测结果为 A 型 17 株、C 型 2 株、D 型 1 株,ELISA 检测结果为 A 型 16 株、C 型 3 株、D 型 1 株,两种方法检测结果的符合率为 95%。由此可见,SDS-PAGE 和 ELISA 的检测结果存在一定的差异性(表 1)。

2.4.2 SDS-PAGE 与 Multiplex-PCR 检测山东省疫区产气荚膜梭菌分离株外毒素结果的比较 57 株山东省疫区产气荚膜梭菌分离株经 SDS-PAGE

图 7 山东省疫区产气荚膜梭菌分离株外毒素 Multiplex-PCR 的检测结果

M. DNA 标样;1~2. 阳性对照;3. 阴性对照;  
 4~11. 山东省疫区产气荚膜梭菌分离株

Fig. 7 Multi-PCR detected results of separate *Cl. perfringens* strains from Shandong epidemic disease region  
 M. DNA Marker;1-2. Positive control;3. Negative control;  
 4-11. Separate *Cl. perfringens* strains from Shandong epidemic disease region

## 3 讨论

### 3.1 3种检测方法的比较

本研究对产气荚膜梭菌标准株 B 6121、德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株、山东省疫区产气荚膜梭菌分离株采用 SDS-PAGE 方法进行毒素型鉴定后,与采用 ELISA 和 Multiplex-PCR 方法鉴定的结果进行比较,结果表明,SDS-PAGE 方法与 ELISA 方法的符合率为 95.0%,与 Multiplex-PCR 方法的符合率为 100%。

通过 SDS-PAGE 方法检测的 20 株德国牛舍环境气源性产气荚膜梭菌分离株中菌株 35C 的结果与 ELISA 的不同,SDS-PAGE 检测为 A( $\alpha$ )型,而 ELISA 检测结果为 C( $\alpha$ 、 $\beta$ )型。两种方法都是通过检测毒素蛋白的特性来确定细菌的毒素型,ELISA 方法是根据抗原抗体结合原理来确定毒素蛋白的种类,而 SDS-PAGE 是通过测定毒素蛋白分子量来确定毒素种类,其结果理论上应该是一致的。但本试验中菌株 35C 检测结果出现差异,这可能有两方面的原因:一是该菌株在进行 ELISA 检测时由于标本、试剂或操作因素的影响而出现了假阳性结果;二是 SDS-PAGE 检测在蛋白的提取和纯化、定量等试验环节中该菌株  $\beta$  毒素蛋白产生量不足,或是在精提过程中流失过多,以至检测不到该毒素,从而影响了试验结果。为确定 35C 菌株的毒素型,又经 SDS-PAGE 重复试验和 Multiplex-PCR 方法鉴定,最终确定为 A 型。

通过 SDS-PAGE 方法检测的 57 株山东省疫区产气荚膜梭菌分离株均为 A 型,与 Multiplex-PCR 方法的检测结果一致,同王磊等<sup>[11]</sup>的检测结果也一致。

### 3.2 SDS-PAGE 试验条件的优化

本研究采用不同饱和度的硫酸铵对产气荚膜梭菌粗提外毒素进行 2 次盐析,采用透析的方法进行脱盐,然后用 SephadexG-200 进行层析,并利用琼脂扩散试验对收集液的毒素活性进行监测,建立了一种简单快速、精确度相对较高且不需要特殊仪器设备提纯的方法。该方法能对  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\epsilon$  毒素进行提纯并获得纯化的毒素,其含量约为粗提外毒素的 1/4,表明通过该方法既除去了大量的杂蛋白和其他物质,又保证了毒素蛋白的质量浓度,最终获得了较纯的产气荚膜梭菌外毒素。

目前,多采用将培养物于 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min 后取上清,再用蔡氏滤器进行过滤的方法

提纯外毒素蛋白,操作步骤繁琐。本试验采用于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 的方法,达到了同样的除菌效果,使步骤简单化,更易操作。

通常人们都采用 SephadexG-25 层析脱盐<sup>[12]</sup>,该方法较透析脱盐节省了不少时间,但存在的主要缺点是毒素蛋白被大量稀释且接连 2 次过柱造成蛋白损失严重,含量降低。基于上述原因,本研究采用传统的透析脱盐方法,从而使毒素的质量浓度保持较高水平,有利于后续试验的进行。

### 3.3 产气荚膜梭菌病流行的控制

国内外关于产气荚膜梭菌致动物猝死症的报道很多<sup>[13-15]</sup>,该病发病急、死亡快,给各国的畜禽生产都带来了很大损失。因此,建立一种有效的检测方法来确定疫区的毒素型,从而有针对性的进行疾病防治具有重要意义。本研究根据细菌形成的毒素蛋白是细菌基因编码表达产物的基本原理,采用 SDS-PAGE 方法,该方法步骤简化,操作过程影响因素较少,并且灵敏度较高,一般只需要不到微克量级的蛋白质,而且通过电泳可以测得毒素蛋白的分子量,根据蛋白分子量判断毒素蛋白种类,根据毒素种类可清楚鉴定该菌的毒素型,以达到快速准确的诊断产气荚膜梭菌病及有效预防和控制该病流行的目的。

### [参考文献]

- [1] 柴同杰,马瑞华,张绍学,等.产气荚膜梭状芽孢杆菌致病机制探讨[J].中国预防兽医学报,2001,23(1):70-72.
- [2] Ahmed H,Idrissi E,Gilbert E W. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins[J]. Veterinary Microbiology,1992,31:89-99.
- [3] Vissidi R,Langton B E,Hanvaich M,et al. Improved ELISA for the detection of antigens in faecal specimens[J]. Journal of Immunology Methods,1984,67(1):129-143.
- [4] 柴同杰,张绍学,常维山,等. ELISA 对动物舍环境魏氏梭菌型别的研究[J]. 畜牧兽医学报,2001,32(1):33-37.
- [5] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995:407.
- [6] Gordon M,Fiock M A,Yarinsky A,et al. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum* [J]. J Bacteriol,1957,74:533-538.
- [7] 李建武,余瑞元,袁明秀,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:171-173;434.
- [8] 朱平.产气荚膜梭菌毒素研究进展[J].国外医学:微生物学分册,1999,22(4):18-24.
- [9] 王玉炯.产气荚膜梭菌  $\beta$  毒素研究进展[J].宁夏农学院学报,1999,20(3):74-77.