

网络出版时间:2012-03-21 17:57

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120321.1757.025.html>

魏氏梭菌 α 毒素快速诊断金标试纸条的研制

刘晓敏^{1,2}, 柴同杰¹, 邹明强², 黄 蓉¹, 张明亮¹

(1 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018; 2 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

【摘 要】 【目的】研制魏氏梭菌 α 毒素快速诊断金标试纸条, 为魏氏梭菌病的快速诊断提供新方法。【方法】采用分子生物学方法制备魏氏梭菌 α 毒素, 将其免疫家兔制备多克隆抗体。用制备的抗魏氏梭菌 α 毒素多克隆抗体作为胶体金标记抗体和检测线上的捕获抗体, 制备魏氏梭菌 α 毒素快速诊断金标试纸条, 对其特异性、敏感性、稳定性和重复性进行检测。用制备的魏氏梭菌 α 毒素快速诊断金标试纸条对临床样品进行检测, 比较其检测结果与 PCR 检测结果的符合率。【结果】成功制备了魏氏梭菌 α 毒素多克隆抗体。成功研制了 α 毒素快速诊断金标试纸条, 其检测线上抗体的最适包被质量浓度为 $0.06 \mu\text{g/mL}$ 。研制的试纸条仅与魏氏梭菌 α 毒素发生反应, 且不同批次的试纸条重复检测结果无差异, 表明试纸条具有较高的特异性和重复性; 该试纸条最低可检测 1.40 mg/mL 的毒素量, 与 PCR 方法测得结果符合率为 80.77% , 基本能满足实际应用要求。【结论】成功研制了魏氏梭菌 α 毒素快速诊断金标试纸条, 该试纸条具有快速、特异、敏感、稳定等优点, 适用于对魏氏梭菌病进行普查和检疫, 具有良好的应用前景。

【关键词】 魏氏梭菌; 胶体金; 免疫层析; α 毒素

【中图分类号】 S855.1⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)04-0008-07

Development of colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of *Clostridium perfringens* α toxin

LIU Xiao-min^{1,2}, CHAI Tong-jie¹, ZOU Ming-qiang²,
HUANG Rong¹, ZHANG Ming-liang¹

(1 College of Animal Science, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China;

2 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: 【Objective】The study developed a colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of *Clostridium perfringens* α toxin and provided a new method for detection of *C. perfringens*. 【Method】*C. perfringens* α toxin was developed by the method of molecular biology, and injected into rabbits to prepare anti- α polyclonal antibody. According to the immune colloidal gold technique principle, we prepared detection dipsticks using anti- α polyclonal antibody as gold labeled antibody and capture antibody of the detection line to detect the *C. perfringens* α toxin. 【Result】The anti- α polyclonal antibody and colloidal gold immunochromatographic test strip for detection CPT α toxin was developed successfully and the suitable concentration of antibody on test line was 1 mg/mL ; Tests on serum samples showed that only *C. perfringens* α toxin positive serum produced a positive signal on the IC strip; The results revealed that the test strip had good specificity and reproducibility for the same result of different batches of test strips; The detection limit of α toxin was 1.40 mg/mL and the correspondence rate between the colloidal gold strip and

* [收稿日期] 2011-10-24

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2010BAD04B000)

[作者简介] 刘晓敏(1986—), 女, 山东威海人, 在读硕士, 主要从事环境微生物学及病原学研究。E-mail: liuxm319@163.com

[通信作者] 柴同杰(1957—), 男, 山东德州人, 教授, 博士生导师, 主要从事环境微生物与分子细菌学研究。

E-mail: chaitj117@163.com

PCR was 80.77%, meeting the requirement of field application basically. 【Conclusion】 The colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of *C. perfringens* α toxin was developed successfully. All these results showed that the strip was sensitive, specific, and rapid for the detection of *C. perfringens*, and had good application prospect.

Key words: *C. perfringens*; colloidal gold; immunochromatographic; α toxin

魏氏梭菌(*Cl. welchii*)又称产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*),为革兰氏阳性菌,是一种广泛分布于自然界中的条件性致病菌^[1],可引起兔梭菌性下痢、羔羊痢疾、羊猝狙和肠毒血症等多种传染性疾病。魏氏梭菌致病性强,其所引起的气性坏疽治疗困难,预后差,另外该菌在细菌性食物中毒中也占有相当高的比例^[2]。魏氏梭菌病发病急,死亡快,发病率和死亡率高,呈地方性流行,是造成家畜猝死症的重要传染病,目前该病已广泛分布于世界各地,呈全球流行态势,严重危害各国畜禽养殖业的发展,成为动物传染病学、兽医微生物学的研究热点。 α 毒素是魏氏梭菌最重要的毒力因子,各型魏氏梭菌均可产生 α 毒素,因此 α 毒素的检测对魏氏梭菌病的诊断具有重要意义。

目前,对魏氏梭菌病的诊断方法主要有病原学检测、免疫学实验、分子生物学实验等。病原学检测主要采用动物试验;免疫学诊断方法主要包括PCR技术、毒素中和实验、卵磷脂水解实验等^[3]。虽然目前已经建立了多种魏氏梭菌病诊断方法,但这些方法都有一定的局限性,最突出的不足就是操作繁琐、检测周期长、需要专业人员进行操作等^[4-5]。因而快速、简便易行、准确的检测方法就成为该病诊断中最迫切的需求^[6]。为此,本研究利用胶体金标记产气荚膜梭菌 α 毒素多克隆抗体,制成检测该毒素的胶体金免疫层析试纸条,诊断时只需一步加样,10 min内就能判断结果,具有简便、灵敏度高、特异性强的特点,能够在动物发病早期快速作出诊断,以便于及时采取措施,降低家畜猝死症的死亡率,为现场快速检测提供了技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及待检样品 魏氏梭菌标准菌株、大肠杆菌菌株 BL21(DE3)及载体 pET28a,均由山东农业大学动物科技学院预防兽医系微生物实验室保存。待检样品(病死兔回肠内容物)采自山东省青岛市某兔场发病兔,共30份。

1.1.2 主要试剂及仪器 氯金酸、柠檬酸三钠、牛

血清白蛋白(BSA),均购自美国 Sigma 公司;羊抗兔 IgG 购自北京博奥森公司;硝酸纤维素膜(NC膜)、玻璃纤维膜、吸水纸、PVC板,均为美国 Millipore 公司产品;微波合成仪,购自北京祥鹄科技发展有限公司;三维喷膜仪、CM4000切条机,购自美国 BioDot 公司;Sunrise 酶标仪,购自德国 TECAN 公司;3K30型高速冷冻离心机,购自 Sigma 公司。

1.2 魏氏梭菌 α 毒素多克隆抗体的制备

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 上发表的 α 毒素基因序列(GenBank 登录号:EU839816.1),运用计算机 DNASTAR 软件自行设计引物,引物序列为:P1:5'-GCGGAATTCATGAAAAGAAAGATTG-3';P2:5'-GCGGCGAAGCTTTTATTTTATATTATAAGTT-3',引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 魏氏梭菌 α 毒素基因的PCR扩增 PCR反应体系为25 μ L:Buffer 2.5 μ L,P1(25 mmol/L)1 μ L,P2(25 mmol/L)1 μ L,dNTP 2 μ L,MgCl₂(25 mmol/L)2 μ L,DNA聚合酶(5 U/ μ L)0.25 μ L,模板DNA(1 ng/ μ L)2.0 μ L,ddH₂O 14.25 μ L。PCR扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR反应结束后,取5 μ L PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶上于90 V下电泳35 min,在 BIO RAD 凝胶成像系统下观察扩增片段的长度。

1.2.3 魏氏梭菌 α 毒素蛋白的诱导表达 将目的片段克隆至表达载体 pET28a 中获得重组质粒,将其转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,涂布于固体 LB 培养基上,37 $^{\circ}$ C培养8~10 h后,挑取单克隆接种于5 mL液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min扩大培养;然后吸取2 mL扩大培养的菌液接入到200 mL新鲜的液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C培养2 h至 OD₆₀₀为0.4~0.8时,加入 IPTG 至终浓度为1 mmol/L,28 $^{\circ}$ C诱导表达10 h,期间每隔2 h收集1次菌液,进行 SDS-PAGE 分析,以确定 IPTG 的最佳诱导时间。

1.2.4 多克隆抗体的制备及效价检测 选择2 kg左右新西兰大耳朵兔4只,分为试验组和对照组,每组2只,预饲1周后进行免疫。首免取诱导表达的

魏氏梭菌 α 毒素蛋白 0.5 mL 与等量弗氏完全佐剂充分混匀,皮下多点注射免疫兔子,剂量为 1.0 mL/只;第 2,3 次免疫剂量和方法同上,间隔 20 d;第 3 次免疫 20 d 后进行加强免疫,用无佐剂抗原皮下多点注射,剂量同上。对照组注射生理盐水,剂量和方法同上。15 d 后进行颈动脉采血,收集血清,采用饱和硫酸铵沉淀法和透析袋纯化抗体,用 ELISA 方法检测抗体效价,用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

1.3 魏氏梭菌 α 毒素快速诊断金标试纸条的制备

1.3.1 胶体金标记物的制备 按柠檬酸三钠还原法^[7-9]制备胶体金溶液。将 98 mL 双蒸水加热至 65℃,磁力搅拌下准确加入新鲜制备的质量分数为 1%的氯金酸水溶液 1 mL,继续加热至 95℃,迅速加入质量分数为 1%的柠檬酸三钠水溶液 1 mL,不断搅拌煮沸 15 min,待溶液颜色由黑-蓝-紫变成酒红色时,停止加热^[10-11],冷却至室温,4℃保存备用。

1.3.2 胶体金标记最适 pH 的确定^[12] 取 1 mL

胶体金溶液,用 0.1 mol/L K₂CO₃ 溶液将 pH 值分别调至 6.5,7.0,7.5,8.0,8.5 和 9.0,然后分别加入质量浓度为 1 mg/mL 的 α 毒素多克隆抗体 25 μ L,振荡后静置 15 min,再分别加 100 g/L 的 NaCl 溶液 100 μ L,继续振荡后静置 15 min。观察胶体金的颜色变化,测定 OD₅₂₀ 值。

1.3.3 胶体金标记最低蛋白稳定量的确定^[13] 用 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 将魏氏梭菌 α 毒素多克隆抗体稀释至 1 mg/mL,备用。取 6 支试管,编号后按表 1 依次加入胶体金、0.1 mol/L K₂CO₃、1 mg/mL α 毒素多克隆抗体及 0.1 mol/L pH 7.2 的 PBS,混匀,5 min 后,向上述各管中加入 100 g/L 的 NaCl 溶液 100 μ L,摇匀,静置 2 h,以 6 号管做对照。观察结果,颜色仍保持红色的最小抗体用量即为稳定胶体金的最小抗体用量。在此基础上再加最小抗体用量的 20%~30%即为稳定胶体金的抗体蛋白实际用量。

表 1 魏氏梭菌 α 毒素胶体金标记抗体最低稳定量测定试验设计

Table 1 Experiment design for detemining the optimal proportion in colloidal gold and antibody

项目 Item	管号 Numbe of tube						项目 Item	管号 Numbe of tube					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
胶体金/mL Colloidal gold	1	1	1	1	1	1	1 mg/mL α 毒素多克隆抗体/ μ L 1 mg/mL antibody	0	20	40	60	80	100
0.01 mol/L 碳酸钾/ μ L 0.01 mol/L K ₂ CO ₃	15	15	15	15	15	15	0.1 mol/L pH 7.2 PBS/ μ L	100	80	60	40	20	0

1.3.4 金标抗体的制备及喷涂 按上述方法确定 2 种试剂的最适用量比例后,分别取相应量的胶体金和魏氏梭菌 α 毒素多克隆抗体,在不停搅拌条件下将金溶胶液和抗体混合,10 min 后再加 100 g/L 的 BSA 使其最终质量浓度为 10 g/L,4℃封闭 30 min,12 000 g 离心 30 min,仔细吸除上清液,沉淀物用含 10 g/L BSA 的 0.01 mol/L pH 7.6 的 PBS 溶液重悬至原体积,重复离心 1 次,最后用 PBS 将

沉淀物混悬为原体积的 1/10,4℃避光保存。裁取 10 mm×4 mm 的玻璃纤维,取 1 mL 的金标抗体喷涂于玻璃纤维上,37℃干燥 1 h^[14]。

1.3.5 试纸条的组装 如图 1 所示,先将硝酸纤维素膜粘贴到 PVP 底板的相应位置,然后将样品垫、金标垫、吸收垫依次粘贴到 PVP 底板的相应位置,使金标垫与吸收垫和硝酸纤维素膜部分接触,将其切成 4 mm 宽试纸条,室温干燥贮存备用。

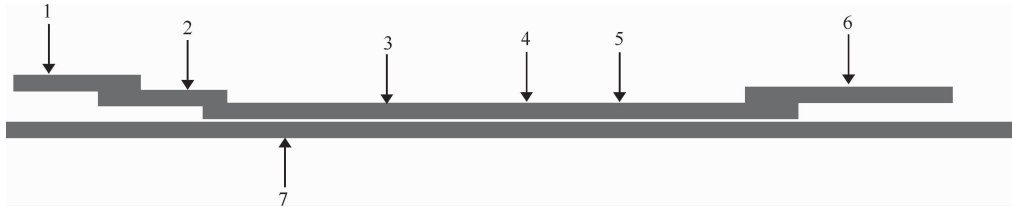


图 1 魏氏梭菌 α 毒素快速诊断胶体金免疫层析试纸条的组装示意图

1. 样品垫;2. 金标垫;3. 硝酸纤维素膜;4. 检测线;5. 质控线;6. 吸收垫;7. PVC 底板

Fig. 1 The assembly of gold colloid immunochromatographic strip for detection of *C. perfringens* α toxin

1. The sample pad;2. The gold conjugate pad;3. The nitrocellulose membrane;
4. The test line;5. The control line;6. The absorbent pad;7. The backing plate

1.3.6 检测方法与结果判定 取死兔病变明显的回肠内容物,用灭菌生理盐水进行 1:1 稀释后,4℃ 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,再以 4℃

8 000 r/min 离心 15 min,然后取上清液 100 μ L,将试纸条样品垫插入其中,液面不浸过金标垫,取出后水平放置,10 min 后观察结果。当样品中存在 α 毒

素,抗原首先与金标抗体中的抗体结合,当液相层析到达检测线处时,金标抗体结合的抗原被膜上的多抗捕捉,产生红色的条带,而未与多抗结合的金标抗体则继续向上层析,当到达质控线处时,羊抗兔 IgG 会与金标抗体中的抗体结合,质控线处同样出现红色条带,判定为阳性结果;如果被检样品中不含有 α 毒素,则检测线处不出现红色条带,只在质控线处出现红色条带,判定为阴性结果。

1.4 试纸条特异性、敏感性、稳定性和重复性的检测

1.4.1 特异性和敏感性^[15] 用组装的试纸条检测含魏氏梭菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌的样品及空白样品,检查其特异性。将魏氏梭菌菌种接种于血平板上使其复活,40℃厌氧培养 24 h,挑取典型菌落接种于营养肉汤进行增菌培养,18 h 后取适量液体培养物接种 Gordon 汤,43℃厌氧振荡培养 4~5 h。取培养液 100 mL,4℃、8 000 r/min 离心 30 min,取上清,用饱和硫酸铵法粗提外毒素^[16],用紫外分光光度计分别测其 OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀ 值,按文献^[17]方法计算其浓度,用 PBS 倍比稀释后进行检测,以确定试纸条的敏感性。

1.4.2 稳定性和重复性 将做好的 α 毒素快速诊断试纸条分别放在室温、4 和 37℃条件下,其中置

于室温和 4℃的纸质条每隔 7 d 取出 5 条,置于 37℃的每天取出 5 条,用其分别检测阴性样本和阳性样本,观察检测线的有无、颜色深浅及金标探针的释放速度与程度。对同一批次的平行试纸条以及不同批次的试纸条,在不同阳性血清质量浓度(0.35, 0.70, 1.40 和 2.80 mg/mL)条件下测试,每个质量浓度设置 10 个重复,检查其重复性。

1.5 临床样品检测

取病死兔回肠内容物,等分为 2 部分,一部分经 5 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,用所制备的魏氏梭菌 α 毒素胶体金试纸条进行检测;另一部分涂布于选择培养基并经肉汤增菌后,进行 PCR 检测,对比 2 种检测方法的符合率。

2 结果与分析

2.1 魏氏梭菌 α 毒素基因的 PCR 扩增

从图 2 可以看出,PCR 成功扩增出 1 228 bp 的 α 毒素基因。

2.2 魏氏梭菌 α 毒素蛋白的诱导表达

从图 3 可以看出,终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 在 28℃诱导表达 8 h,目的蛋白可获得高效表达,得到分子质量为 45 ku 的蛋白条带。

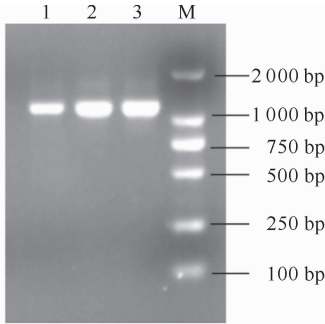


图 2 魏氏梭菌 α 毒素基因的 PCR 扩增
M. DNA Maker;1~3. PCR 产物
Fig.2 Electrophoresis map for PCR of α toxin of *C. perfringens*
M. DNA Maker;1-3. PCR product

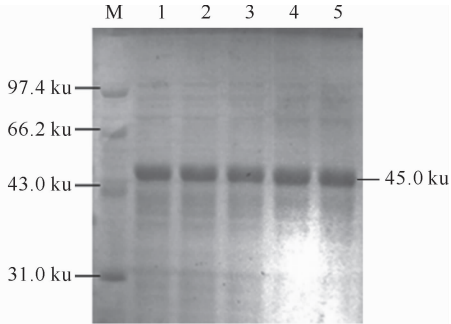


图 3 魏氏梭菌 α 毒素蛋白的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白标准品;1~5. 分别为 α 毒素蛋白诱导 2,4,6,8,10 h 的产物
Fig.3 SDS-PAGE analysis of α toxin of *C. perfringens*
M. Prestained protein Ladder;1-5. Expression of α toxin induced by IPTG in 2,4,6,8,10 h

2.3 魏氏梭菌 α 毒素多克隆抗体效价的检测

试验兔经 4 次免疫后,用 ELISA 方法检测抗体

效价,用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值,结果见表 2。由表 2 可知,α 毒素多克隆抗体效价可以达到 1 : 512 000。

表 2 魏氏梭菌 α 毒素多克隆抗体效价的 ELISA 检测结果

Table 2 ELISA results of anti-α polyclonal antibody of *C. perfringens*

序号 Number	稀释度 Dilution	对照组 Control group		免疫组 Immune group	
		1 号家兔 Rabbit 1	2 号家兔 Rabbit 2	3 号家兔 Rabbit 3	4 号家兔 Rabbit 4
1	1 : 1 000	0.066	0.058	2.922	2.813
2	1 : 2 000	0.055	0.046	2.907	2.789
3	1 : 4 000	0.060	0.052	2.878	2.788

续表 2 Continued table 2

序号 Number	稀释度 Dilution	对照组 Control group		免疫组 Immune group	
		1 号家兔 Rabbit 1	2 号家兔 Rabbit 2	3 号家兔 Rabbit 3	4 号家兔 Rabbit 4
4	1 : 8 000	0.048	0.040	2.851	2.788
5	1 : 16 000	0.047	0.038	2.851	2.767
6	1 : 32 000	0.042	0.040	2.767	2.756
7	1 : 64 000	0.042	0.041	2.653	2.636
8	1 : 128 000	0.042	0.039	2.387	2.268
9	1 : 256 000	0.044	0.043	1.818	1.695
10	1 : 512 000	0.041	0.040	1.270	1.220
11	空白 Blank	0.041	0.037	0.043	0.046
12	空白 Blank	0.036	0.034	0.038	0.044

2.4 胶体金标记最适 pH 和最低蛋白稳定量的确定

从图 4 可以看出,pH 为 7.5 时 OD₅₂₀ 值最高,因此,胶体金标记抗体的最适 pH 为 7.5。

从图 5 可见,1 和 2 号管出现黑色沉淀且红色全部褪去;3 号管虽然能保持红色,但是管底也出现了一定的黑色沉淀;4、5 号管颜色无变化,与对照 6 号管颜色一致,所以抗体与胶体金的最佳包被质量浓度为 0.06 μg/mL,在这个量上再加 20%~30%即为抗体与胶体金颗粒的最低蛋白稳定量(0.072~0.078 μg/mL)。

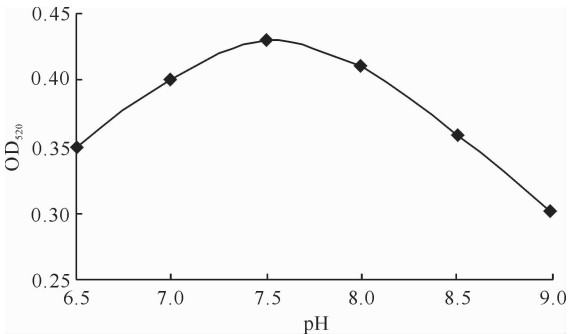


图 4 魏氏梭菌 α 毒素金标抗体最适 pH 的确定
Fig.4 Optimal pH of *C. perfringens* α toxin colloidal antibody

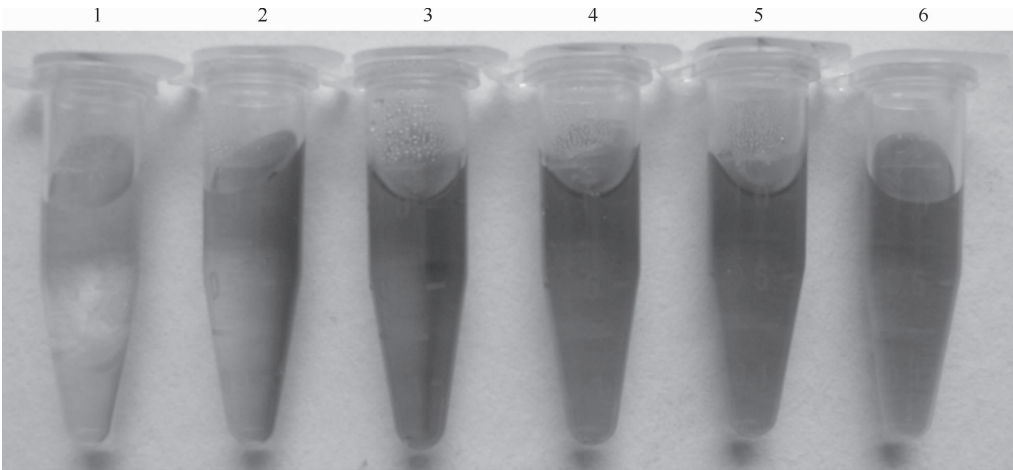


图 5 魏氏梭菌 α 毒素胶体金标记抗体最低蛋白稳定量的测定
1~6 号管与表 1 中的 1~6 号管对应

Fig.5 Determination of the optimal proportion in colloidal gold and *C. perfringens* α toxin antibody
Tubes 1—6 are correspond to 1—6 in table 1

2.5 试纸条特异性和敏感性的检测

由图 6 可见,只有魏氏梭菌呈阳性反应,检测线处有明显条带,而其他 3 种菌及空白对照均呈阴性,反应检测线处无明显条带,说明制备的金标试纸条对魏氏梭菌具有良好的特异性。按文献[18]的方法测得菌种所产外毒素质量浓度为 2.80 mg/mL,用 PBS 作倍比稀释,用制备的金标试纸条进行检测,结

果如图 7 所示。由图 7 可见,质控线条带明显,当 α 毒素质量浓度为 2.80 和 1.40 mg/mL 时,检测线处有明显条带;当 α 毒素质量浓度为 0.70 mg/mL 时,检测线处条带较淡;当 α 毒素质量浓度为 0.35 mg/mL 时,检测线处几乎没有条带;空白样品检测线没有出现条带。为了保证检测结果的准确性,应将制备的魏氏梭菌 α 毒素金标试纸条检测下限定为

1.40 mg/mL。

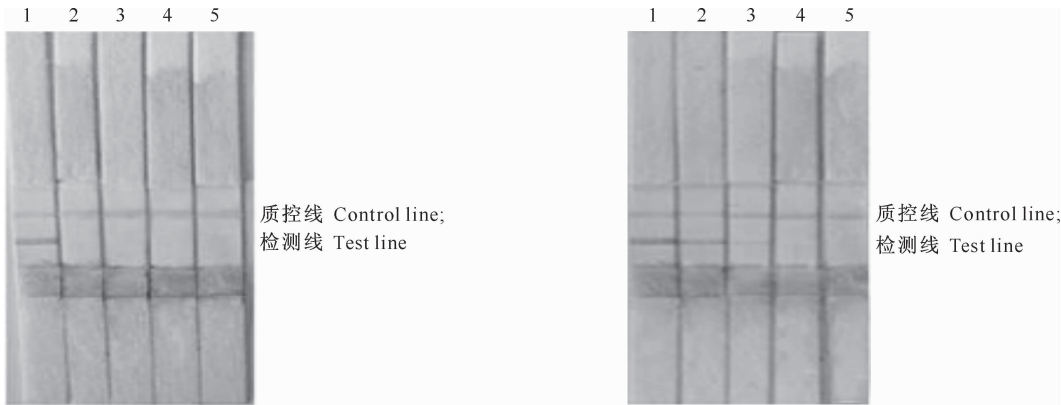


图 6 魏氏梭菌 α 毒素快速诊断金标试纸条的特异性检测

1. 魏氏梭菌;2. 大肠杆菌;3. 金黄色葡萄球菌;
4. 沙门氏菌;5. 空白对照

Fig. 6 The specificity of the strips for detection of *C. perfringens* α toxin of clostridium welchii

1. *Clostridium perfringens*;2. *Escherichia coli*;3. *Staphylococcus aureus*;4. *Salmonella paratyphi*;5. Blank control

2.6 试纸条重复性和稳定性的检测

重复性试验结果显示,不同批次 α 毒素诊断试纸条检测结果均无明显差异,说明该试纸条具有良好的重复性。稳定性试验结果表明,室温、37 ℃ 下长时间保存后,试纸条颜色有所减弱,4 ℃ 保存的试纸条颜色基本没有变化,说明试纸条稳定性良好。

2.7 试纸条对临床样品的检测结果

在供检的 30 份样品中,经胶体金试纸条检测呈阳性的有 21 份,经 PCR 检测呈阳性的有 26 份,2 种检测方法的符合率为 80.77%,说明试纸条检测结果与 PCR 检测结果的符合率较高。

3 讨 论

胶体金溶液可与多种生物大分子结合形成稳定的复合物,已应用于血清学试验、细胞生物学及医学等领域。胶体金制备方法很多,但制备单一粒度的胶体金颗粒采用柠檬酸三钠还原法效果较好。在制备胶体金过程中,影响因素很多,使用的容器必须清洁,否则将导致金溶胶混浊或颗粒大小不匀;还原剂柠檬酸三钠必须一次性快速加入,搅拌均匀,一次制备的量不宜过多;试剂溶液均需用 4 蒸水配制,并用微孔滤膜过滤。制备的胶体金应存放于 4 ℃ 备用,及早标记,避免放置过程中出现自凝或细菌生长^[18]。金溶胶与被标抗体的用量比例也是影响标记成功与否的一个重要因素。因此,在每次标记时,

图 7 魏氏梭菌 α 毒素快速诊断金标试纸条的敏感性检测

1~4. α 毒素质量浓度分别为 2.80,1.40,
0.70 和 0.35 mg/mL;5. PBS

Fig. 7 The sensitivity of the strips for detection of *C. perfringens* α toxin

1—4. The concentration of α toxin is 2.80,1.40,
0.70 and 0.35 mg/mL respectively;5. PBS

都要测定二者具体的稳定点,以获得最佳标记率。

大分子物质的检测通常采用双单抗夹心的方法,但是单克隆抗体的制备过程耗时耗力且成本较高,故本研究尝试使用本实验室自行制备的多克隆抗体来研制试纸条。由于大分子蛋白有多个抗原位点,所以样品中的待测物与金标抗体的其中一些抗原位点结合后,检测线上的抗体还能与待测物的另一些位点结合。在某种意义上,也相当于双抗夹心,在理论上是可行的^[19]。通过研究发现,本研究用多抗代替单抗是可行的。

试验结果表明,所研制的魏氏梭菌 α 毒素快速诊断试纸条不仅具有灵敏度高、特异性强、重复性好等特点,还具有操作简便快速,不需要特殊试验条件,结果直观和易判定等优点^[20],可以对产气荚膜梭菌 α 毒素进行快速的鉴定和诊断,为家畜猝死症的监测提供更便捷和准确的方法。

[参考文献]

[1] Cole A R,Gibert M,Popoff M. Clostridium perfringens epsilon toxin shows structural similarity to the poreforming toxin aerolysin [J]. Nat Struct Mol Biol,2004,11(8):797-798.
[2] Smerdon W J,Adak G K,O'Brien S J,et al. General outbreaks of infectious intestinal disease linked with red meat, England and Wales, 1992 — 1999 [J]. Commun Dis Public Health, 2001,4(4):259-267.
[3] Layana J E,Fernandez Miyakawa M E,Uzal F A. Evaluation of

- different fluids for detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in sheep with experimental enterotoxemia [J]. *Anaerobe*, 2006, 12(4): 204-206.
- [4] Sonja J, Jim P, William B, et al. Evaluation of rapid diagnostic tests for typhoid fever [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 1885-1889.
- [5] Wanpen C, Wuttipong T, Srisin K, et al. Detecti on with monoclonal antibody of *Salmonella typhi* antigen 9 ins pecimens from patients [J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(9): 1824-1830.
- [6] 马丽丽, 王玉金, 杨书豪, 等. 快速乙肝表面抗原胶体金免疫层析测定法的建立及应用 [J]. 标记免疫分析与临床, 1997, 4(4): 225-227.
- Ma L L, Wang Y J, Yang S H, et al. Rapid colloidal gold immunochromatographic assay for HBsAg and its application [J]. *Analysis of Immune Markers and Clinical*, 1997, 4(4): 225-227. (in Chinese)
- [7] Roth J, Bendayan M, Orci I. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex [J]. *Histochem Cytochem*, 1978, 26(3): 1074-1081.
- [8] Geoghegan W D. Adsorption of horseradish peroxidase ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloid gold for the indirect detection of concanavlin A wheat germ agglutinin and goat anti human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microcopic level; A new method, therapy and application [J]. *Histochem Cytochem*, 1997, 25(9): 1187-1200.
- [9] Putalun W, Morinaga, Tanaka H, et al. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the detection of senosides A and B [J]. *Phytochem Anal*, 2004, 15(2): 112-116.
- [10] Pattarawarapanm, Nangola S, Cressey T R, et al. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS [J]. *Talanta*, 2006, 59(5): 9-18.
- [11] Kia S, Omidfark, Kashanian S, et al. Development of rapid one-step assay for detecting digoxin toxicity [J]. *Toxicology Letters*, 2007, 172(Suppl1): 82-83.
- [12] 齐玲玲, 金 涌, 邹明强, 等. 胶体金免疫层析试纸条快速检测玉米细菌性枯萎病菌 [J]. 检验检疫学刊, 2010, 1(20): 1-4.
- Qi L L, Jin Y, Zou M Q, et al. A colloidal gold-based immunochromatographic strip for rapid detection of *erwinia stewartii* subs p. *Stewartii* [J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2010, 1(20): 1-4. (in Chinese)
- [13] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学试验技术 [M]. 武汉: 湖北科技出版社, 2002.
- Shen G X, Zhou R L. *Modern techniques of medical immunology* [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2002. (in Chinese)
- [14] 杨 明, 陈伯祥, 孙晓林, 等. 猪瘟胶体金快速诊断试纸条的研制 [J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(2): 34-37.
- Yang M, Chen B X, Sun X L, et al. Development of rapid test strip for classical swine fever virus [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2010, 45(2): 34-37. (in Chinese)
- [15] 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.
- Wu F B, Hou H R, He Y F, et al. Progress in immunochromatographic analysis [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 1998, 21(2): 122. (in Chinese)
- [16] 柴同杰, 刘文波. 魏氏梭菌类毒素疫苗研制及其免疫家兔抗体消长规律 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(1): 101-103.
- Chai T J, Liu W B. Producing research of the *C perfringens* type A toxoid vaccine [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2006, 28(1): 101-103. (in Chinese)
- [17] 王重庆, 李云兰, 李德昌, 等. 高级生物化学实验教程 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 42-53.
- Wang C Q, Li Y L, Li D C, et al. *Advanced biochemistry experimental course* [M]. Beijing: Beijing University Press, 1994: 42-53. (in Chinese)
- [18] 姜先荣, 杨 杰. 胶体金标记蛋白及应用 [J]. 安徽教育学院学报, 1998(2): 60-61.
- Jiang X R, Yang J. Colloidal gold labeling of proteins and application [J]. *Journal of Anhui College of Education*, 1998(2): 60-61. (in Chinese)
- [19] 何素平, 赵 静, 羿国香, 等. Bt 毒素蛋白免疫金标试纸条的制备与应用 [C]//周声涛. 中国棉花协会 2006 年年会暨第七次代表大会论文汇编. 北京: 中国农业出版社, 2006: 254-255.
- He S P, Zhao J, Yi G X, et al. Development of a dipstick assay for detection of transgenic Bt-cotton [C]//Zhou S T. *The Transactions of 2006 China Cotton Association Annual Meeting and the Seventh Congress*. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 254-255. (in Chinese)
- [20] Fauik W P, Talor G M. An immunocolloid method for the electron microscope [J]. *Immunochem*, 1971, 8(2): 1081-1085.