



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106336458 A

(43)申请公布日 2017.01.18

(21)申请号 201610634643.0

(22)申请日 2016.07.29

(71)申请人 浙江省海洋水产养殖研究所

地址 325000 浙江省温州市河通桥6-1号

(72)发明人 闫茂仓 张赛乐 王瑶华 陈然

於俊琦 张翔

(51)Int.Cl.

C07K 16/12(2006.01)

C07K 16/02(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸及制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸及制备方法,通过以副溶血弧菌为研究对象,采用外膜蛋白和溶血素为免疫原制备卵黄抗体,依次利用水提取法、饱和硫酸铵沉淀法和SephadexG-75葡聚糖凝胶层析提取得到高纯度的ompK卵黄抗体和TDH卵黄抗体。以副溶血弧菌THD卵黄抗体为捕获抗体,副溶血弧菌ompK卵黄抗体为检测抗体,研制副溶血弧菌的快速检测试纸条,该快速检测试纸条,具有灵敏、方便使用的优点,可广泛地应用于水产养殖动物疾病的早期快速检测,具有良好的应用前景。

1. 一种抗副溶血弧菌的卵黄抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:①免疫原的制备,免疫原的制备包括副溶血弧菌外膜蛋白(ompK)和溶血素(TDH)抗原的制备;②将上述副溶血弧菌外膜蛋白和溶血素抗原分别接种到健康蛋鸡上;③蛋鸡经免疫后,收集鸡蛋,并提取纯卵黄液,对纯卵黄液依次进行水提取、饱和硫酸铵沉淀法和SephadexG-75葡聚糖凝胶层析提取分别得到纯净的副溶血弧菌外膜蛋白(ompK)卵黄抗体和溶血素(TDH)卵黄抗体。

2. 根据权利要求1所述的抗副溶血弧菌的卵黄抗体的制备方法,其特征在于:所述副溶血弧菌外膜蛋白的制备包括根据副溶血弧菌ompK保守序列设计引物,上游引物和下游引物的基因序列分别为:ompK-F(5'-ATGGATTACTCTGACGGCG-3')和ompK-R(5'-TTAGAACTTGTAAGTTACTGC-3'),PCR扩增副溶血弧菌外膜蛋白ompK基因,通过基因重组构建重组质粒pET28a-ompK,将重组质粒pET28a-ompK诱导转入大肠杆菌感受态细胞诱导培养,将重组质粒表达的上清蛋白经纯化、浓缩后,按照一定比例与佐剂混合、匀浆,制备副溶血弧菌ompK抗原。

3. 根据权利要求1所述的抗副溶血弧菌的卵黄抗体的制备方法,其特征在于:所述副溶血弧菌TDH的制备包括根据副溶血弧菌tdh基因序列(M10069)设计引物,上游引物和下游引物分别为:tdh-F(5'-ATGAAACACCAATATTTTGC-3')和tdh-R(5'-TTATTGTTGATGTTTACATT-3'),PCR扩增副溶血弧菌tdh基因,采用基因重组构建重组质粒pET28a-tdh,将重组质粒pET28a-tdh诱导转入大肠杆菌感受态细胞诱导培养,将重组质粒表达的上清蛋白经纯化、浓缩后,按照一定比例与佐剂混合、匀浆,制成副溶血弧菌TDH抗原。

4. 根据权利要求1所述的抗副溶血弧菌的卵黄抗体的制备方法,其特征在于:所述高纯度卵黄抗体的制备过程包括以下步骤:在纯卵黄液中加入9倍体积的蒸馏水,调pH5.2,4℃静置12h后10000r/min离心20min,收集上清液得到粗提物即鸡卵黄中水溶性成分,然后滴加等体积饱和硫酸铵溶液使其饱和度达50%,4℃静置过夜后离心得到沉淀物,用等体积蒸馏水溶解后滴加饱和硫酸铵溶液使其饱和度达33%,4℃静置1h后离心得到沉淀物,用原1/2体积磷酸缓冲盐溶液溶解,并用透析袋除盐,盐析后PEG-6000浓缩,再经SephadexG-75葡聚糖凝胶层析柱进一步纯化,冷冻干燥,-20℃保存。

5. 一种胶体金-卵黄抗体复合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:采用所述权利要求1-4任意一项制备方法制备TDH卵黄抗体,然后,通过柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在胶体金溶胶中加入K₂CO₃调节pH,搅拌的同时,缓慢滴加卵黄抗体溶液,搅拌静置后,加入BSA溶液防止聚沉,然后将溶液通过超速离心进行纯化,得到浓缩的胶体金-卵黄抗体复合物。

6. 根据权利要求5所述的胶体金-卵黄抗体复合物的制备方法,其特征在于:取20ml胶体金溶胶,加入1%K₂CO₃ 240μl调节pH,搅拌的同时,缓慢滴加卵黄抗体溶液,搅拌10-30min。静置30min后,加入10%BSA至终浓度为1%,搅拌10-20min。然后将溶液通过超速离心进行纯化,10000r/min离心60min,弃上清,沉淀用金标抗体缓冲液溶解,重复二次离心,最后用原1/20体积金标抗体缓冲液重悬,得到浓缩的金标卵黄抗体。

7. 根据权利要求5所述的胶体金-卵黄抗体复合物的制备方法,其特征在于:所述胶体金的制备方法,包括以下步骤:取洁净锥形瓶,加入0.01%的氯金酸100ml,加热煮沸,迅速加入1%柠檬酸三钠水溶液1.5ml,继续煮沸,观察溶液颜色变化,当完全变为酒红色时,取

出,冷却至室温,超纯水补足至100ml。

8.一种副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸,其特征在于:包括硝酸纤维素膜(NC膜)、胶体金垫、粘性PVC底板、样品垫、吸水滤纸、检测线(T)和质控线(C),所述胶体金垫上铺设金标副溶血弧菌TDH卵黄抗体,所述检测线与质控线由副溶血弧菌ompK卵黄抗体及兔抗鸡IgG分别制得,所述副溶血弧菌ompK卵黄抗体和副溶血弧菌TDH卵黄抗体如权利要求1-4任意一项权利要求所述的制备方法制得,金标卵黄抗体由所述权利要求6所述的制备方法制得。

9.根据权利要求8所述的副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸,其特征在于:所述试纸条包括NC膜、胶体金垫、粘性PVC底板、样品垫、吸水滤纸,所述NC膜粘于粘性PVC底板上21-46mm的位置,检测线在上,质控线在下;胶体金垫粘于粘性PVC底板上12mm的位置,上端压于NC膜的下端,重叠2mm,样品垫粘于粘性PVC底板上,上端压于胶体金垫的下端,重叠3mm,吸水滤纸粘于粘性PVC底板上,下端压于NC膜的上端,重叠2mm。

10.一种基于卵黄抗体的副溶血弧菌快速检测试纸的制备方法,其特征在于:采用由所述权利要求1-4任意一项所述的制备方法制得的ompK卵黄抗体和TDH卵黄抗体,由权利要求5所述的制备方法制得的金标TDH卵黄抗体,首先,通过二倍稀释金标抗体,并将其铺到胶体金垫上,将喷好的胶体金条带置于37℃干燥;其次,用缓冲溶液将副溶血弧菌ompK卵黄抗体(T)及兔抗鸡IgG(C)稀释到合适浓度,分别作为检测线与质控线,将NC膜、胶体金垫、粘性PVC底板、样品垫、吸水滤纸通过粘性底衬相互重叠地粘成一体,成为完整的试纸条。

副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及水产养殖中对水产动物病原性疾病方面检测的技术领域,尤其是一种副溶血弧菌的快速检测试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 近年来,随着海水养殖规模的不断扩大,病害频繁发生,对我省乃至全国海水养殖和发展造成了巨大的威胁,成为制约养殖业健康发展的主要瓶颈之一,其中尤以弧菌病最为严重。另一方面,在沿海地区,微生物性食物中毒的病原分布发生了显著变化,海产品中存在许多能够引起人类疾病的弧菌,其中由副溶血弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V.alginolyticus*)、霍乱弧菌(*V.cholera*)和创伤弧菌(*V.vulnificus*)等引起的食物中毒事件尤其显著。而副溶血弧菌引起的食物中毒,已经高居微生物性水产品食物中毒首位。业已证实,副溶血弧菌是引起海水养殖动物主要致病性弧菌,严重威胁着大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、真鲷(*pagrosomus major*)、石斑鱼(*Epinephelus sp.*)、南美白对虾(*Penaeus vannamei*)、文蛤(*Meretrix mertrix*)等大多数海水养殖动物,特别是近两年南美白对虾产业遇到的产业危机,都是由于感染高致病性副溶血弧菌引起的急性肝胰腺坏死症造成的。国内外学者也对致病弧菌的致病因子进行了分离纯化和致病性研究,报道了弧菌的主要致病因子包括铁吸收系统、菌体组分(脂多糖LPS和外膜蛋白ompK等)、胞外产物(溶血素TDH和胞外蛋白酶等)。然而,目前还缺乏成熟的弧菌快速检测技术以满足对水产疾病控制和水产品安全,特别是早期诊断技术和手段。目前,国内外已经开展了大量弧菌病免疫检测技术的研究,但是大多是采用全菌苗制备多克隆抗体或多克隆抗体而建立的快速检测方法,存在交叉反应、特异性和灵敏性等方面的缺陷。

[0003] 近10年来,我国对一些重大疾病的快速检测技术和方法进行较深入的研究,也建立了一些针对某些病原体的快速检验方法。建立的检测方法主要有免疫学、PCR和核酸探针等技术方法。随着免疫学原理不断应用到水产动物健康养殖,病原菌的免疫学检测技术方法的建立受到研究者的广泛关注。近年来,也建立一些致病菌弧菌快速检测技术方法,主要包括间接ELISA、夹心ELISA、Dot-ELISA、荧光抗体等免疫标记方法。然而,上述检测技术手段都需要一定的仪器设备,且操作较复杂,在推广应用上具有很大的局限性;再则,以上研究多是以哺乳动物获得的多克隆抗体或单克隆抗体为免疫手段而建立的快速检测方法,然而哺乳类动物源(如兔、羊等)抗体,容易存在多种非特异性交叉反应,造成假阳性,受到一定的限制。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足,本发明提供了一种副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸及制备方法。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案是:一种抗副溶血弧菌的卵黄抗体的

制备方法,其特征在于,包括以下步骤:①免疫原的制备,免疫原的制备包括副溶血弧菌外膜蛋白(ompK)和溶血素(TDH)抗原的制备;②将上述副溶血弧菌外膜蛋白和溶血素抗原分别接种到健康蛋鸡上;③蛋鸡经免疫后,收集鸡蛋,并提取纯卵黄液,对纯卵黄液依次进行水提取、饱和硫酸铵沉淀法和SephadexG-75葡聚糖凝胶层析提取分别得到纯净的副溶血弧菌外膜蛋白(ompK)卵黄抗体和溶血素(TDH)卵黄抗体。

[0006] 进一步的,所述副溶血弧菌外膜蛋白的制备包括根据副溶血弧菌ompK保守序列设计引物,上游引物和下游引物的基因序列分别为:ompK-F(5'-ATGGATTACTCTGACGGCG-3')和ompK-R(5'-TTAGAACTTGTAAGTTACTGC-3'),PCR扩增副溶血弧菌外膜蛋白ompK基因,通过基因重组构建重组质粒pET28a-ompK,将重组质粒pET28a-ompK诱导转入大肠杆菌感受态细胞诱导培养,将重组质粒表达的上清蛋白经纯化、浓缩后,按照一定比例与佐剂混合、匀浆,制备ompK抗原。

[0007] 进一步的,副溶血弧菌tdh基因序列(M10069)设计引物,上游引物和下游引物分别为:tdh-F(5'-ATGAAACACCAATATTTTGC-3')和tdh-R(5'-TTATTGTTGATGTTTACATT-3'),PCR扩增副溶血弧菌tdh基因,采用基因重组构建重组质粒pET28a-tdh,将重组质粒pET28a-tdh诱导转入大肠杆菌感受态细胞诱导培养,将重组质粒表达的上清蛋白经纯化、浓缩后,按照一定比例与佐剂混合、匀浆,制成TDH抗原。

[0008] 进一步的,所述对纯卵黄液的提纯过程,包括以下步骤:在纯卵黄液中加入9倍体积的蒸馏水,调pH 5.2,4℃静置12h后10000r/min离心20min,收集上清液得到粗提物即鸡卵黄中水溶性成分,然后滴加等体积饱和硫酸铵溶液使其饱和度达50%,4℃静置过夜后离心得到沉淀物,用等体积蒸馏水溶解后滴加饱和硫酸铵溶液使其饱和度达33%,4℃静置1h后离心得到沉淀物,用原1/2体积磷酸缓冲盐溶液溶解,并用透析袋除盐,再经凝胶层析柱进一步纯化,冷冻干燥,-20℃保存。

[0009] 本发明的另一个技术方案是:一种胶体金-卵黄抗体复合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:采用所述权利要求1-4制备方法制备TDH卵黄抗体,然后,通过柠檬酸三钠还原法制备胶体金,在胶体金溶胶中加入K₂CO₃调节pH,搅拌的同时,缓慢滴加卵黄抗体溶液,搅拌静置后,加入BSA溶液防止聚沉,然后将溶液通过超速离心进行纯化,得到浓缩的胶体金-卵黄抗体复合物。

[0010] 进一步的,取20ml胶体金溶胶,加入1%K₂CO₃240μl调节pH,搅拌的同时,缓慢滴加卵黄抗体溶液,搅拌10-30min。静置30min后,加入10%BSA至终浓度为1%,搅拌10-20min。然后将溶液通过超速离心进行纯化,10000r/min离心60min,弃上清,沉淀用金标抗体缓冲液溶解,重复二次离心,最后用原1/20体积金标抗体缓冲液重悬,得到浓缩的金标卵黄抗体。

[0011] 进一步的,所述胶体金的制备方法,包括以下步骤:取洁净锥形瓶,加入0.01%的氯金酸100ml,加热煮沸,迅速加入1%柠檬酸三钠水溶液1.5ml,继续煮沸,观察溶液颜色变化,当完全变为酒红色时,取出,冷却至室温,超纯水补足至100ml。

[0012] 本发明的另一个技术方案是:一种副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸,其特征在于:包括硝酸纤维素膜(NC膜)、胶体金垫、粘性PVC底板、样品垫、吸水滤纸、检测线(T)和质控线(C),所述胶体金垫上铺设金标副溶血弧菌TDH卵黄抗体,所述检测线与质控线由副溶血弧菌ompK卵黄抗体及兔抗鸡IgG分别制得,所述副溶血弧菌ompK卵黄抗体和副

溶血弧菌TDH卵黄抗体如权利要求1-4任意一项权利要求所述的制备方法制得,金标卵黄抗体由所述权利要求6所述的制备方法制得。

[0013] 进一步的,所述试纸条包括NC膜、胶体金垫、粘性PVC底板、样品垫、吸水滤纸,所述NC膜粘于粘性PVC底板上21-46mm的位置,检测线在上,质控线在下;胶体金垫粘于粘性PVC底板上12mm的位置,上端压于NC膜的下端,重叠2mm,样品垫粘于粘性PVC底板上,上端压于胶体金垫的下端,重叠3mm,吸水滤纸粘于粘性PVC底板上,下端压于NC膜的上端,重叠2mm。

[0014] 本发明的另一个技术方案是:一种基于卵黄抗体的副溶血弧菌快速检测试纸的制备方法,其特征在于:采用由所述权利要求1-4所述的制备方法制得的ompK卵黄抗体和TDH卵黄抗体,由权利要求5所述的制备方法制得的金标TDH卵黄抗体,首先,通过二倍稀释金标抗体,并将其铺到胶体金垫上,将喷好的胶体金条带置于37℃干燥;其次,用缓冲溶液将副溶血弧菌ompK卵黄抗体(T)及兔抗鸡IgG(C)稀释到合适浓度,分别作为检测线与质控线,将NC膜、胶体金垫、粘性PVC底板、样品垫、吸水滤纸通过粘性底衬相互重叠地粘成一体,成为完整的试纸条。

[0015] 采用上述方案,本发明以副溶血弧菌为研究工具,采用外膜蛋白和溶血素为免疫原制备卵黄抗体,研制副溶血弧菌的快速检测试纸条,并在海水养殖区进行应用示范。这将为开展海水养殖动物致病性弧菌的早期快速检测和防控,以及海产品食品安全控制提供技术支持;为海水养殖动物副溶血弧菌引起的疾病的防治奠定基础。

[0016] 下面结合附图对本发明作进一步描述。

附图说明

[0017] 图1为TCBS培养基上副溶血弧菌示意图;

[0018] 图2为副溶血弧菌ompK扩增结果;

[0019] 图3重组ompK的表达、纯化及Western blotting检测;

[0020] 图4副溶血弧菌tdh基因扩增结果;

[0021] 图5 pET28a-tdh酶切后鉴定结果;

[0022] 图6重组tdh表达纯化与检测;

[0023] 图7不同方法提取的IgY的SDS-PAGE电泳图谱;

[0024] 图8四种方法提取IgY的OD值(初始稀释度为1:10);

[0025] 图9硫酸铵法纯化后SDS-PAGE电泳图;

[0026] 图10 IgY的凝胶洗脱图谱;

[0027] 图11不同纯化方法IgY凝胶电泳图;

[0028] 图12不同卵黄抗体的效价比较;

[0029] 图13柠檬酸三钠还原法制备的胶体金溶液;

[0030] 图14蛋白与胶体金结合最适宜K₂CO₃用量的测定;

[0031] 图15与胶体金结合最适抗体蛋白结合量的测定;

[0032] 图16制备好的金标抗体;

[0033] 图17基于卵黄抗体的副溶血弧菌胶体金试纸条的灵敏性;

[0034] 图18基于卵黄抗体的副溶血弧菌胶体金试纸条的特异性。

具体实施方式

[0035] 结合附图说明及发明内容,本发明的具体实施例如下,包括以下几个部分:

[0036] (一)免疫原的制备

[0037] 1材料与方法

[0038] 1.1材料

[0039] 1.1.1菌株

[0040] 如图1所示,供试菌株为副溶血弧菌,经分离保存。质粒、大肠杆菌感受态细胞购自上海生物工程有限公司。

[0041] 1.1.2溶液配制

[0042] 1M HCl溶液:量筒量取8.36ml浓盐酸(或直接用天平称9.86g),倒入已经装有大约50-70ml纯水的烧杯中,不断搅拌,待冷却后定容至100ml,无菌过滤后,室温保存。

[0043] PBS缓冲液(pH 7.4,0.01M):称取NaCl 8.0g,KCl 0.2g,Na₂HP0₄1.42g,KH₂PO₄0.27g,溶解于600ml纯水中,定容至1L,121℃灭菌20min,室温保存。

[0044] 30%Acrylamide:称取Acrylamide 290g,BIS 10g,加入600ml纯水,搅拌溶解后定容至1L,用0.45μm滤膜滤去杂质,于棕色瓶中4℃保存。

[0045] 1.5mol/l Tris-HCL缓冲液(pH 8.8):称取181.7g Tris置于1L烧杯中,加800ml纯水,充分搅拌溶解,用浓盐酸调节pH至8.8后定容至1L。高温高压灭菌后,室温保存。

[0046] 1mol/l Tris-HCL缓冲液(pH 6.8):将121.1g Tris溶于900ml纯水中,再根据所需pH(25℃下)加一定浓盐酸(11.6mol/l),用双蒸水调整终体积至1L,高温高压灭菌后于室温储存。

[0047] 10%(W/V)AP溶液:称取1g AP,加入10ml纯水后搅拌溶解,于4℃保存。

[0048] 10%SDS溶液:称取10g高纯度SDS溶于80ml纯水中,加数滴浓HCL调pH至7.2后定容至100ml,室温保存。

[0049] 5×Tris-Gly Buffer(SDS-PAGE电泳缓冲液):称量Tris 15.1g,Glycine 94g,SDS 5.0g,加入800ml纯水,搅拌溶解,后定容至1L,室温保存,使用时5倍稀释。

[0050] 5×SDS-PAGE Loading Buffer试剂:1M Tris-HCl(pH6.8)1.25ml,SDS 0.5g,BPB 25mg,甘油2.5ml,加纯水定容至5ml。

[0051] 考马斯亮蓝R-250染色液:称取1g考马斯亮蓝R-250,加入250ml异丙醇搅拌均匀;加入100ml冰醋酸,搅拌均匀;加入650ml纯水,搅拌均匀;滤纸过滤后,室温保存。

[0052] 考马斯亮蓝脱色液:量取醋酸100ml,乙酸50ml,纯水850ml,充分混合后室温保存。

[0053] 1.1.3培养基的制作

[0054] ZOBELL 2216E培养基:蛋白胨5g,酵母浸出膏1g,磷酸铁0.01g,陈海水1L,调pH至7.6-7.8(配置固体培养基时,再加入16g琼脂粉),分装后121℃灭菌20min。

[0055] TCBS培养基:TCBS 83g,纯水1L,将其混匀煮沸3次,直接倒入无菌培养皿,冷却备用。

[0056] 营养肉汤:取蛋白胨10.0g、牛肉粉3.0g、氯化钠5.0g于1000ml纯水中,搅拌加热煮沸至完全溶解,调pH至7.2±0.2(配置固体培养基时,再加入16g琼脂粉),分装后121℃高压灭菌15min。

[0057] 1.2副溶血弧菌灭活菌苗的制备

[0058] 副溶血弧菌菌株接种于Zobell 2216E斜面,28℃培养24h后,用灭菌0.65%生理盐水洗下菌苔,加入终浓度为0.3%的甲醛灭活24h后,用TCBS培养基检测灭活效果。确认彻底灭活后,用灭菌0.65%生理盐水洗3次,配成终浓度为 1×10^8 CFU/ml副溶血弧菌灭活菌苗。

[0059] 1.3副溶血弧菌OMP和TDH抗原的制备

[0060] 1.3.1特异性ompK疫苗的制备

[0061] 根据副溶血弧菌ompK保守序列设计引物,上游引物和下游引物分别为:ompK-F(5'-ATGGATTACTCTGACGGCG-3')和ompK-R(5'-TTAGAACTTGTAAGTTACTGC-3'),PCR扩增副溶血弧菌外膜蛋白ompK基因。

[0062] 经测序验证后,采用基因重组技术,构建重组质粒(表达ompK基因的原核表达载体pET28a-ompK),1TPG诱导转入大肠杆菌感受态。经验证,重组质粒pET28a-ompK在大肠杆菌得到了表达。

[0063] 重组表达的上清蛋白经HisTrap纯化、浓缩后,采用Bradford方法测定ompK蛋白浓度。并按照一定比例与佐剂混合、匀浆,制备ompK亚单位疫苗。

[0064] 1.3.2特异性副溶血弧菌TDH疫苗的制备

[0065] 根据已报道的副溶血弧菌tdh基因序列(M10069)设计引物,上游引物和下游引物分别为:tdh-F(5'-ATGAAACACCAATATTTTGC-3')和tdh-R(5'-TTATTGTTGATGTTTACATT-3'),PCR扩增副溶血弧菌tdh基因。

[0066] 经测序和balst比对,与genbank公布的序列相似性为99%。采用基因重组技术,构建重组质粒(表达tdh基因的原核表达载体pET28a-tdh),1TPG诱导转入大肠杆菌TOP10感受态细胞。经验证,重组质粒pET28a-tdh在大肠杆菌得到了表达。

[0067] 2结果与分析

[0068] 2.1副溶血弧菌ompK的制备

[0069] 应用上游引物V-ompK-F(5'-ATGGATTACTCTGACGGCG-3')和下游引物V-ompK-R(5'-TTAGAACTTGTAAGTTACTGC-3')成功扩增到副溶血弧菌外膜蛋白ompK基因,约为750bp(图2)。经测序和balst比对,与genbank公布的序列相似性为99%。

[0070] 如图3,采用基因重组技术成功构建重组质粒(表达ompK基因的原核表达载体pET28a-ompK)。重组表达的上清蛋白经HisTrap纯化、浓缩后,采用Bradford方法测定ompK蛋白浓度。并按照一定比例与佐剂混合、匀浆,制成ompK亚单位疫苗。

[0071] 2.2副溶血弧菌TDH的制备

[0072] 应用上游引物Tdh-F(5'-ATGAAACACCAATATTTTGC-3')和下游引物TDH-R(5'-TTATTGTTGATGTTTACATT-3')成功扩增到副溶血弧菌tdh基因,PCR产物,约为570bp(图4)。经测序和balst比对,与genbank公布的序列相似性为99.6%。采用基因重组技术成功构建重组质粒(表达tdh基因的原核表达载体pET28a-tdh),重组质粒双酶切后可见两条带,一条为载体,一条大小约为570bp的目的条带(图5)。

[0073] 将重组质粒pET28a-tdh成功转入大肠杆菌感受态细胞,诱导培养后,经检测在27kD处出现蛋白条带与目的条带相符(图6)。培养液上清蛋白进行经HisTrap纯化后,进行Western blotting检测,表明27kD蛋白发生特异性反应(图6)。重组蛋白并按照一定比例与佐剂混合、匀浆,制成TDH亚单位疫苗。

[0074] (二)精制抗副溶血弧菌卵黄抗体的制备

[0075] 1材料与方法

[0076] 1.1实验材料

[0077] 试验用菌株:副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)为本实验分离并鉴定;实验用蛋鸡为SPF海兰鸡。

[0078] 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、PEG-6000等试剂购自上海生工生物工程有限公司, Sephadex G-75凝胶购自sigma公司。

[0079] 1.2抗原的制备

[0080] 抗原为上述制备的副溶血弧菌灭活菌苗、ompK和TDH。

[0081] 1.3蛋鸡的免疫

[0082] 取备用的上述抗原, 0.1mg重组蛋白ompK和TDH加入1ml弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂, 副溶血弧菌悬液 1×10^8 CFU/ml加入等体积的弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂。分别充分乳化后, 免疫健康海兰蛋鸡。免疫采取胸、颈、翼下4点皮下注射, 首次免疫注射含弗氏完全佐剂的抗原, 剂量为每只1.0ml。10d后第1次加强免疫, 每只1.5ml; 20d后进行第2次加强免疫, 每只2.0ml; 第2次加强免疫后1周开始收集鸡蛋, 根据具体效价确定是否进行进行第3次加强免疫。加强免疫时注射含弗氏不完全佐剂的抗原。同时设未免疫对照组。

[0083] 1.4卵黄抗体水溶性组分(WSF)的分离

[0084] 二免后收集鸡蛋, 用清水洗净蛋表面污物, 晾干, 编号后4℃保存备用。采取水稀释法对卵黄免疫球蛋白IgY进行粗分离: 小心敲开蛋壳, 用注射器吸尽蛋清, 加入灭菌蒸馏水洗净蛋清, 将蛋黄在滤纸上滚动后, 注射器刺破卵黄膜, 收集卵黄液。加9倍卵黄液体积的灭菌蒸馏水, 调pH至5.2-5.3, 搅拌均匀后4℃放置过夜, 4℃, 10000r/min离心25min, 取上清即为WSF。

[0085] 1.5抗哈氏弧菌特异性IgY的二次分离

[0086] 本实验比较了苯酚法、冷乙醇法、硫酸铵法和辛酸-硫酸铵法4种方法对抗哈氏弧菌卵黄抗体进行二次提纯的效果。分别从同1枚鸡蛋取卵黄液2ml, 进行4种不同方法的提取, 设3个重复。具体方法如下:

[0087] 苯酚法: 用含3%苯酚的生理盐水与卵黄按体积比4:1搅拌均匀, 静置10min。4℃, 4000r/min, 离心10min, 去除沉淀, 再用等量50%冷乙醇沉淀与上清液混合, 4000r/min, 离心15min, 取沉淀溶解在原体积的PBS中。

[0088] 硫酸铵法: 卵黄液与蒸馏水1:9稀释, 调pH 5.2, 4℃静置12h后10000r/min离心20min, 收集上清液得到粗提物即WSF。然后滴加等体积饱和硫酸铵溶液使其饱和度达50%, 4℃静置过夜后离心得到沉淀物, 用等体积蒸馏水溶解后滴加饱和硫酸铵溶液使其饱和度达33%, 4℃静置1h后离心得到沉淀物, 用原1/2体积PBS缓冲液溶解, 并用透析袋除盐。

[0089] 冷乙醇法: 将95%乙醇置于-20℃预冷2h后, 按WSF与乙醇体积比1:1把乙醇慢慢加入到WSF中, 4℃搅拌30min, 沉淀完全后, 4℃, 22000r/min离心20min, 弃上清。将沉淀物溶于25mmol/LNaCl溶液中, 使其成为均一的悬浮液。4℃过滤, 除去其中的脂蛋白沉淀, 收集滤液。然后在加入50%的冷乙醇使其终浓度为30%, 4℃, 22000r/min, 离心20min, 沉淀用蒸馏水溶解。

[0090] 辛酸-硫酸铵法: 向用WSF中缓慢加入终浓度为1%的正辛酸, 搅拌10min, 放入冰箱中

冷冻10min,抽滤得lgY溶液。然后滴加等体积饱和硫酸铵溶液使其饱和度达50%,4℃静置过夜后,4℃,10000r/min,离心20min弃上清,用蒸馏水溶解沉淀后滴加饱和硫酸铵溶液使其饱和度达33%,4℃静置1h后4℃,10000r/min,离心20min离心弃上清,用原1/2体积PBS缓冲液溶解,并用透析袋除盐。

[0091] 1.4 lgY凝胶层析

[0092] 以饱和硫酸铵法制备的卵黄抗体溶液,用透析袋除盐后。Sephadex G-75凝胶层析柱进一步纯化,冷冻干燥,-20℃保存,并通过SDS-PAGE电泳检测样品纯化效果。

[0093] 1.5卵黄抗体lgY效价间接ELISA测定

[0094] 间接ELISA操作方法为:

[0095] (1)用包被缓冲液稀释特异性抗原即副溶血弧菌,终浓度 10^8 CFU/mL,包被酶标板,100μl,4℃过夜;

[0096] (2)洗涤液洗板3次,封闭液封闭,100μl/孔,37℃温育1h;

[0097] (3)洗涤液洗板3次,每孔加入被比稀释的二次分离后的特异性lgY(初浓度为0.97mg/mL)。同时加入阴性对照(非特异性lgY)和空白对照,100μl/孔,37℃温育2h;

[0098] (4)洗涤液洗板3次,加过氧化物酶HRP标记二抗,100μl/孔,37℃温育1h;

[0099] (5)洗涤液洗板3次,加TMB工作液(现用现配),100μl/孔,阴暗处反应20min;

[0100] (6)加终止液(2M H_2SO_4),50μl/孔,酶标仪检测OD值(波长450nm);

[0101] (7)分析数据,OD值为阴性对照值的2.1倍所对应的稀释度为其效价。

[0102] 2结果与分析

[0103] 2.1不同方法提取的lgY SDS-PAGE电泳结果

[0104] 通过SDS-PAGE电泳图谱(图7)可知,lgY的重链分子量为67kD,轻链分子量为23kD。卵黄WSF的蛋白条带最多,单独应用辛酸法次之,苯酚法和冷乙醇法居于中间,硫酸铵法和辛酸-硫酸铵法所含的蛋白条带最为清晰,杂蛋白较少。图7中M蛋白Mark;1卵黄WSF;2苯酚法;3冷乙醇法;4辛酸法;5硫酸铵法;6辛酸-硫酸铵法。

[0105] 2.2不同方法提取lgY的OD值比较

[0106] 用间接ELISA方法测比较4种方法提取lgY的效价。由图8可以看出,苯酚法提取的效价最低,其次为冷乙醇法,辛酸-硫酸铵法提取lgY与单纯的硫酸铵提取的lgY效价几乎同步。

[0107] 2.3硫酸铵法粗提纯lgY的性状和总蛋白质含量

[0108] 用硫酸铵法提取的lgY为无气味残留,经测定,蛋白浓度为 0.911 ± 0.09 mg/ml。通过SDS-PAGE电泳图谱(图9)可知,lgY的重链分子量为67kD,轻链分子量为23kD。卵黄WSF的蛋白条带很多,硫酸铵法纯化的条带也比较清晰,杂蛋白减少很多。图9中M蛋白Mark;1卵黄WSF;2硫酸铵法粗提卵黄抗体。

[0109] 2.4凝胶层析纯化lgY

[0110] 将硫酸铵二次盐析后PEG-6000浓缩后的样品通过Sephadex G-75凝胶柱,自动收集,绘制洗脱曲线。结果见图10。

[0111] 2.5 SDS-PAGE检测lgY纯度

[0112] 以抗副溶血弧菌特异性lgY的水溶液组分、第一次硫酸铵后溶液、第二次硫酸铵后溶液、凝胶层析后溶液为样品,用SDS-PAGE电泳检测lgY纯化情况,结果见图11。图11中,M

Mark;1WSF;2第一次硫酸铵后;3第二次硫酸铵后;4凝胶层析后。

[0113] 2.6不同纯化方法后IgY抗体效价比较

[0114] 相同蛋白含量的水提法、硫酸铵沉淀法和凝胶层析后获得的IgY抗体效价,凝胶层析后纯化的IgY效价最好,最适合用于研发检测产品。

[0115] (三)不同免疫原制备的卵黄抗体的特异性比较

[0116] 卵黄抗体制备过程中,用间接ELISA法监测不同抗体滴度变化,考察不同抗体中和能力。抗副溶血弧菌FKC卵黄抗体、抗副溶血弧菌TDH卵黄抗体和抗副溶血弧菌ompK卵黄抗体达到最佳效价时间、最佳抗体效价维持时间,以及抗体效价存在差异(图12)。

[0117] 采用水提、硫酸铵沉淀、凝胶层析等方法进行卵黄抗体的分离纯化,获得了高纯度的抗副溶血弧菌FKC卵黄抗体、抗副溶血弧菌TDH卵黄抗体和抗副溶血弧菌ompK卵黄抗体,SDS-PAGE检测了分离纯化效果,纯度差别不显著。制备的卵黄抗体冷冻干燥后保存备用。

[0118] 同时采用中和实验分析了不同卵黄抗体与其他常见水产动物病原菌和食品有害细菌的交叉反应情况,发现抗副溶血弧菌FKC卵黄抗体与哈氏弧菌、坎氏弧菌有一定的交叉反应,抗副溶血弧菌ompK卵黄抗体与哈氏弧菌存在交叉反应,抗副溶血弧菌TDH卵黄抗体无交叉反应。

[0119] 根据上述比较结果,选择抗副溶血弧菌TDH卵黄抗体和抗副溶血弧菌ompK卵黄抗体作为制备胶体金快速检测试纸条所需的捕获抗体和检测抗体。

[0120] (四)金标卵黄抗体的制备及反应条件筛选

[0121] 1材料与方法

[0122] 1.1实验材料

[0123] 氯金酸、柠檬酸三钠、BSA购自sigma公司;其他常规试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

[0124] 1.2卵黄抗体的制备

[0125] 上述制备的副溶血弧菌TDH卵黄抗体。

[0126] 1.3玻璃容器的清洁

[0127] 玻璃表面的污染会干扰金颗粒的生成,所有玻璃容器使用前经过酸洗硅化。方法是将初次使用的玻璃容器浸泡于5%二氯二甲硅烷的氯仿溶液中1分钟,室温干燥后蒸馏水冲洗,再干燥备用。反复使用的器皿以金溶液润洗后双蒸馏水淋洗,代替硅化处理。

[0128] 1.4采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金

[0129] 取一个250ml的洁净锥形瓶,加入0.01%的氯金酸100ml,加热煮沸。根据需要迅速加入1%柠檬酸三钠水溶液1.5ml,继续煮沸,观察溶液颜色变化,当完全变为酒红色时,取出,冷却至室温,超纯水补足至100ml。

[0130] 1.5蛋白与胶体金结合最适宜K₂CO₃用量的测定

[0131] 取8个1.5ml EP管,各加入1ml胶体金,并按表2-1加入1%K₂CO₃,搅拌均匀后,加入抗体10μg,搅匀20min后加入5%的NaCl溶液50μl,室温下放置1h,观察胶体金颜色的变化。

[0132] 表1最适宜K₂CO₃用量确定

	EP 管编号	1	2	3	4	5	6	7	8
	1% K ₂ CO ₃ (μl)	0	1	3	6	9	12	15	18
[0133]	胶体金溶液体积 (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
	抗体(μg)	10	10	10	10	10	10	10	10

[0134] 1.6最适宜抗体蛋白结合量

[0135] 取6个1.5ml Ep管,各加入1ml胶体金,并分别加入1%K₂CO₃12μl调节pH,搅拌均匀后,按表2加入抗体,搅匀20min后加入5%的NaCl溶液50μl,室温下放置1h,观察胶体金颜色的变化。

[0136] 表2最适宜抗体蛋白结合量确定

	EP 管编号	1	2	3	4	5	6
	1% K ₂ CO ₃ (μl)	12	12	12	12	12	12
[0137]	胶体金溶液体积 (ml)	1	1	1	1	1	1
	抗体结合量(μg)	10	5	2.5	2	1	0

[0138] 1.7胶体金-抗体复合物稳定剂

[0139] 为防止金标抗体的聚沉,取1ml标记后的抗体缓慢加入10%BSA100μl。

[0140] 1.8胶体金-抗体复合物的制备与纯化

[0141] 取20ml胶体金溶胶,加入1%K₂CO₃240μl调节pH,搅拌的同时,缓慢滴加卵黄抗体溶液,搅拌10-30min。静置30min后,加入10%BSA至终浓度为1%,搅拌10-20min。然后将溶液通过超速离心进行纯化,10000r/min离心60min,弃上清,沉淀用金标抗体缓冲液溶解,重复二次离心,最后用原1/20体积金标抗体缓冲液重悬,得到浓缩的金标卵黄抗体。

[0142] 2结果

[0143] 2.1胶体金的制备

[0144] 氯金酸水溶液为淡黄色,加热后,与柠檬酸三钠水溶液发生反应,溶液迅速从淡黄色转变为黑色,而后变为淡紫色,如图13所示最后变为稳定的酒红色。

[0145] 2.2最适宜K₂CO₃的测定

[0146] 以K₂CO₃调节各胶体金溶液的pH后,加入相同体积的抗体,混合20min后加入NaCl溶液。静置观察,除K₂CO₃添加量为0-9μl组胶体金溶液颜色由酒红色变为蓝色,其余各管溶液均未变化,见图14。结果显示,每1ml胶体金溶液加入K₂CO₃溶液12μl时,胶体金-抗体复合物较为稳定。图14中1-8分别为K₂CO₃体积0μl、1μl、3μl、6μl、9μl、12μl、15μl和18μl。

[0147] 2.3最适抗体蛋白结合量的测定

[0148] 如图15所示,当1ml胶体金溶液中抗体蛋白含量5μg或者超过5μg时,胶体金溶液颜

色不发生变化,形成稳定的胶体金-抗体复合物,图15中1-6分别为抗体结合量10 μ g、5 μ g、2.5 μ g、2 μ g、1 μ g和0 μ g。

[0149] 2.4金标抗体的制备

[0150] 根据最适条件制备金标抗体得到稳定透亮的深酒红色溶液,见图16。

[0151] (五)基于卵黄抗体的副溶血弧菌快速检测试纸条研制与性能检测

[0152] 1材料与方法

[0153] 1.1实验材料

[0154] 试验用菌株:副溶血弧菌灭活菌苗(10⁸CFU/ml)。

[0155] 上述制备的副溶血弧菌TDH金标抗体、副溶血弧菌ompK卵黄抗体及兔抗鸡IgG抗体。

[0156] NC膜、胶体金垫、粘性PVC底板、样品垫、吸水滤纸等。

[0157] 1.2铺金

[0158] 二倍稀释金标抗体,铺到胶体金垫上,将喷好的胶体金条带置于37℃干燥。

[0159] 1.3抗原/抗体划线

[0160] 用缓冲溶液将副溶血弧菌ompK卵黄抗体(T)及兔抗鸡IgG(C)稀释到合适浓度,分别作为检测线与质控线。

[0161] 1.4试纸条组装

[0162] 将处理后的各种固相材料,通过粘性底衬相互重叠地粘成一体,成为完整的试纸条,具体过程如下:

[0163] (1)将NC膜粘于粘性PVC底板上21-46mm的位置,C线在上,T线在下;

[0164] (2)将胶体金垫粘于粘性PVC底板上12mm的位置,上端压于NC膜的下端,重叠2mm;

[0165] (3)将样品垫粘于粘性PVC底板上,上端压于胶体金垫的下端,重叠3mm;

[0166] (4)吸水滤纸粘于粘性PVC底板上,下端压于NC膜的上端,重叠2mm;

[0167] (5)装配成形的条带剪切成4mm宽的试纸条,并保存于干燥的环境中。

[0168] 1.5胶体金免疫层析试纸条检测结果判定

[0169] 以10⁸CFU/ml副溶血弧菌菌悬液作为阳性对照,PBS缓冲液为阴性对照。将试纸条插入对照溶液和样品悬液中,待样品层析完毕后观察检测结果。在测试条反应区中,T带及C带处各出现一条红带,则表示待检样品中有副溶血弧菌,判为阳性,若仅在C带处出现一条红带,则判为阴性;若C带不出现红带,则表示测试条失效。

[0170] 1.6胶体金免疫层析试纸条检测的灵敏度

[0171] 取副溶血弧菌培养物,甲醛灭活后,稀释成不同浓度的菌悬液:10⁹CFU/ml、10⁸CFU/ml、10⁷CFU/ml、10⁶CFU/ml、10⁵CFU/ml、10⁴CFU/ml、10³CFU/ml、10²CFU/ml、10¹CFU/ml和10⁰CFU/ml,待样品层析完毕后观察检测结果。

[0172] 1.7胶体金免疫层析试纸条检测的特异性

[0173] 以哈氏弧菌、鳃弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、灿烂弧菌、霍乱弧菌、河口弧菌、迟缓爱德华菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、无乳链球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和蜡芽孢杆菌共20株非副溶血弧菌菌株的培养物进行试纸条特异性检测。调整各菌悬液浓度至1 $\times$ 10⁸CFU/ml,待样品层析完毕后观察检测结果。

[0174] 1.8试纸条检测的稳定性

[0175] 将制备的试纸条包装后放置在4℃冰箱保存,每30天取出试纸条进行测定,共测试至实验第180天,观察不同时间对试纸检测的影响。在相同的实验条件下以0CFU/ml、 10^3 CFU/ml和 10^6 CFU/ml的副溶血弧菌进行实验。

[0176] 2结果

[0177] 2.1试纸条的灵敏度分析

[0178] 如图17所示,胶体金试纸条对阳性样本检测的灵敏度为 10^2 CFU/ml。图17中1-9分别为副溶血弧菌 10^8 CFU/ml、 10^7 CFU/ml、 10^6 CFU/ml、 10^5 CFU/ml、 10^4 CFU/ml、 10^3 CFU/ml、 10^2 CFU/ml、 10^1 CFU/ml和 10^0 CFU/ml。

[0179] 2.2试纸条的特异性分析

[0180] 将组装后的试纸条与哈氏弧菌、鳃弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、灿烂弧菌、霍乱弧菌、河口弧菌、迟缓爱德华菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、无乳链球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌反应,均不产生阳性反应,结果表明试纸条特异性高,见图18。图18中1-2为副溶血弧菌,3-22分别为加入哈氏弧菌、鳃弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、灿烂弧菌、霍乱弧菌、河口弧菌、迟缓爱德华菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、无乳链球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌。

[0181] 经测定,180天内4℃冰箱保存的试纸条对0CFU/ml、 10^3 CFU/ml和 10^6 CFU/ml的副溶血弧菌三种样品均能正常稳定显色,性能无显著区别,具有良好的稳定性。在相同条件下,不同实验人员同时进行测试的结果没有差别,同一人员不同时间的测试结果也是一致的,具有良好的重复性。

[0182] 本发明采用卵黄抗体作为免疫手段,结合胶体金技术,研制了副溶血弧菌的早期快速检测试纸条,具有灵敏、方便使用的优点,可广泛地应用于水产养殖动物早期快速检测,具有良好的应用前景。其示范应用将有利于早期发现潜伏病原、最大限度地减少因疾病引起的直接经济损失,有利于养殖户的增产增收;同时有利于提高水产品质量,保证食品安全,具有显著社会效益和生态环境效益。本发明不局限于上述具体实施方式,本领域一般技术人员根据本发明公开的内容,可以采用其他多种具体实施方式实施本发明的,或者凡是采用本发明的设计结构和思路,做简单变化或更改的,都落入本发明的保护范围。

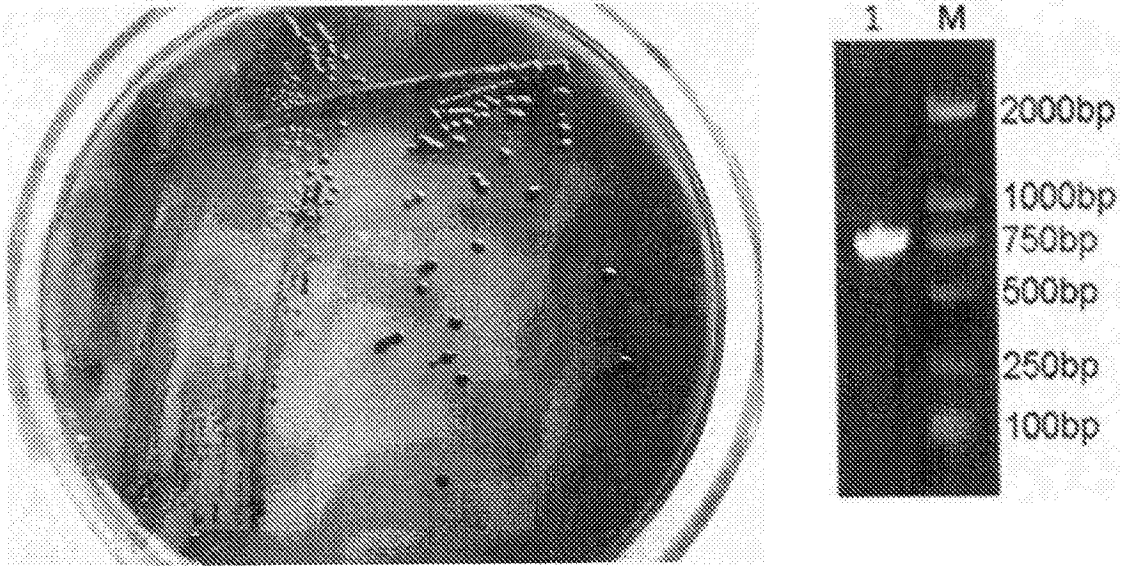


图2

图1

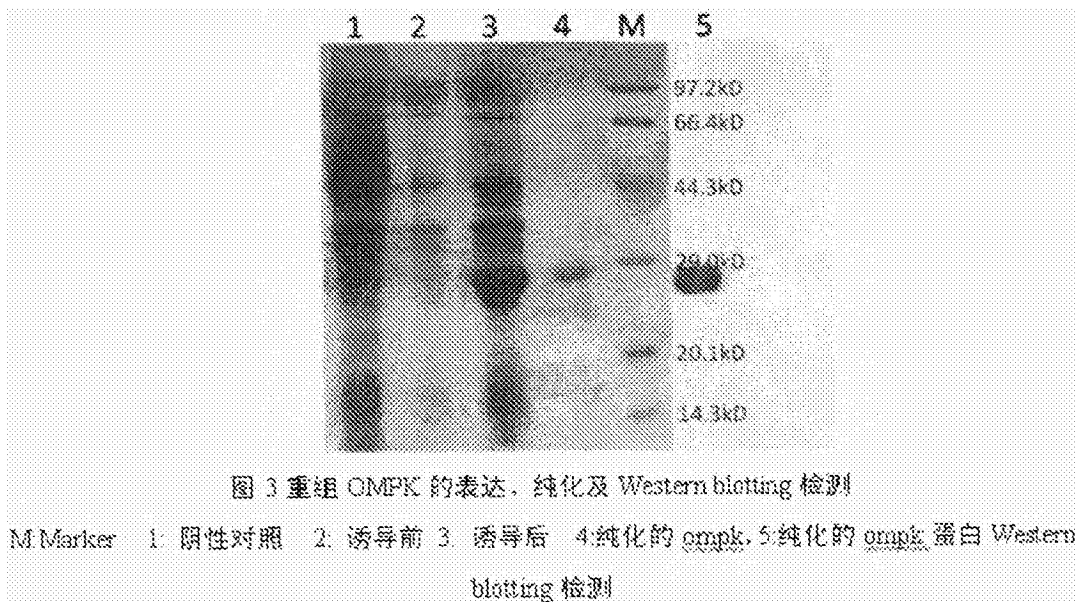


图3

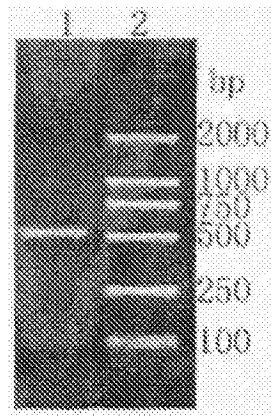


图4

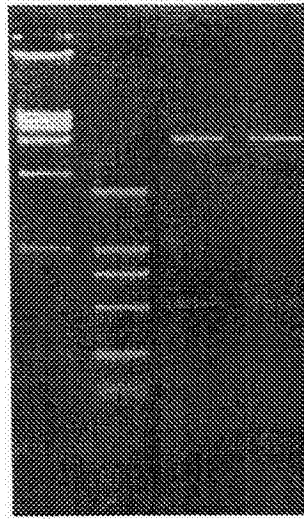


图5

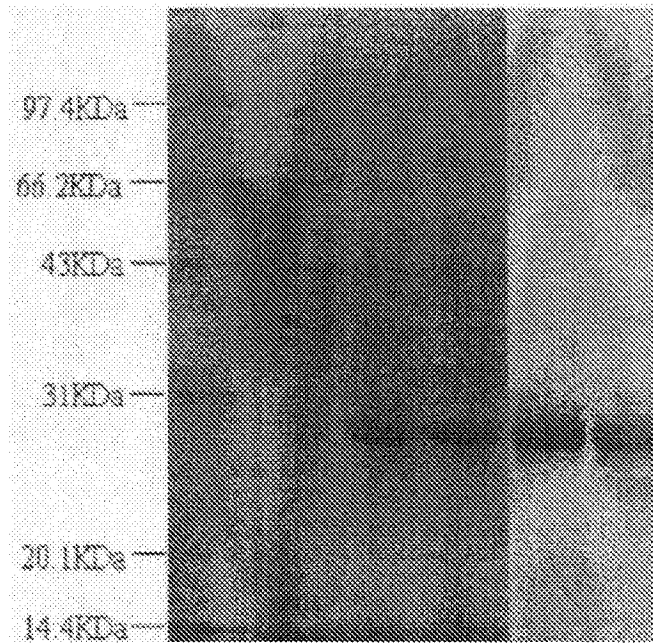


图6

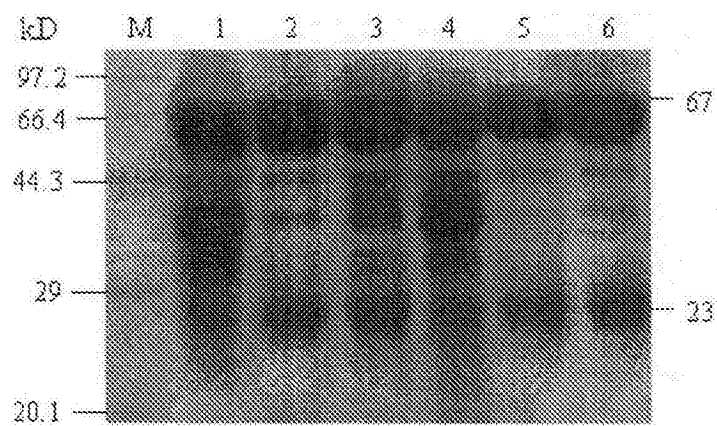


图7

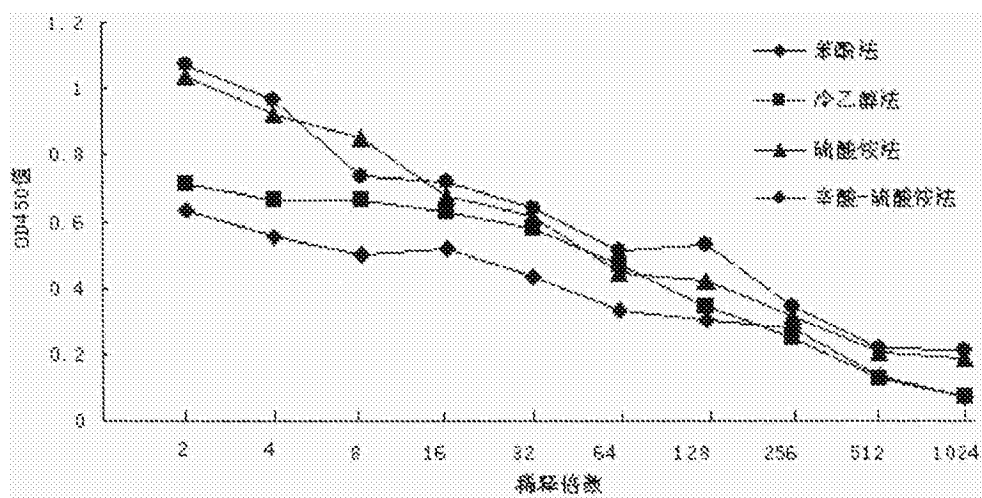


图8

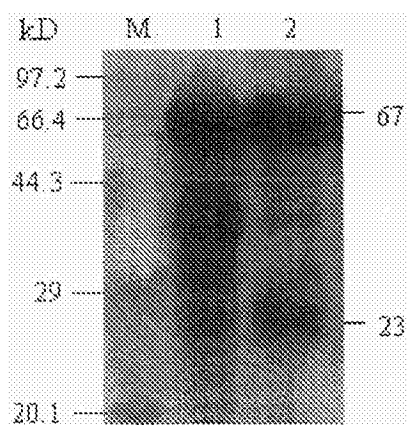


图9

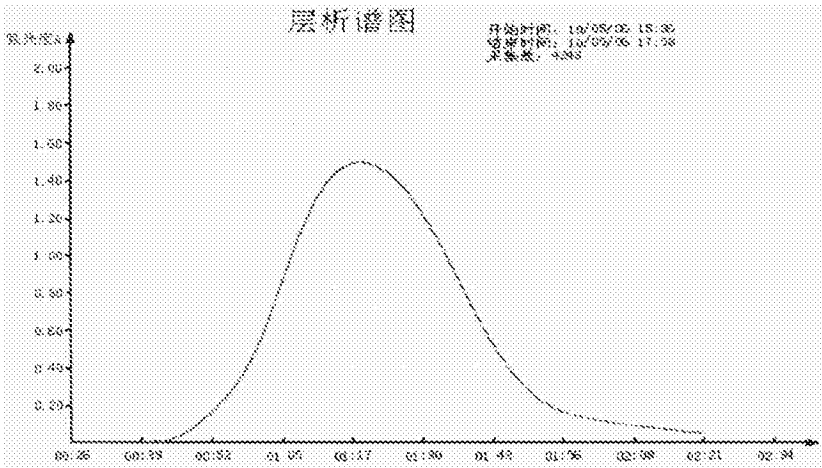


图10

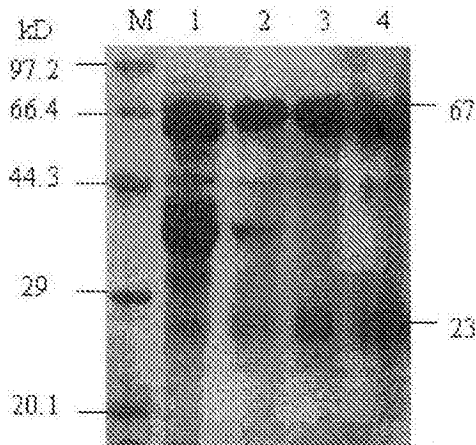


图11

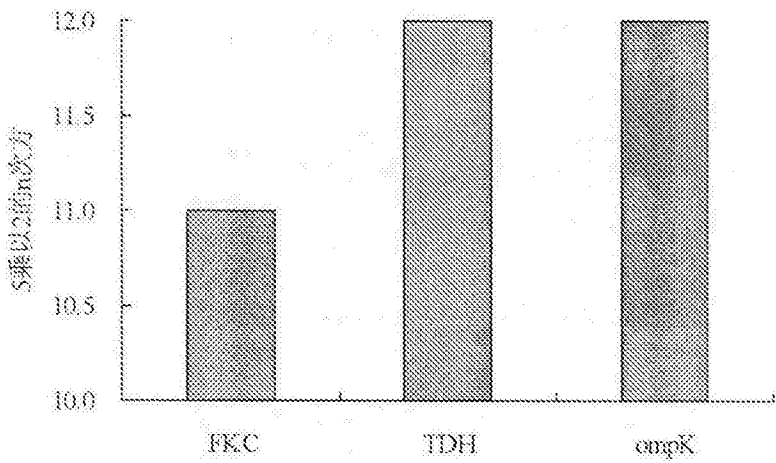


图12

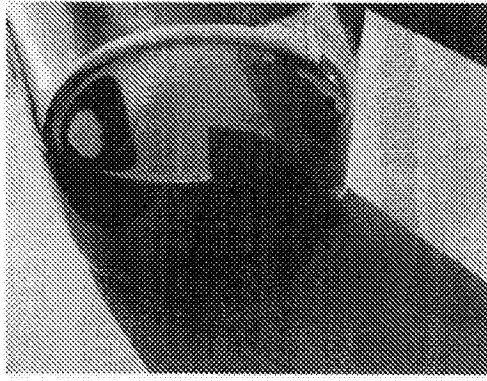


图13

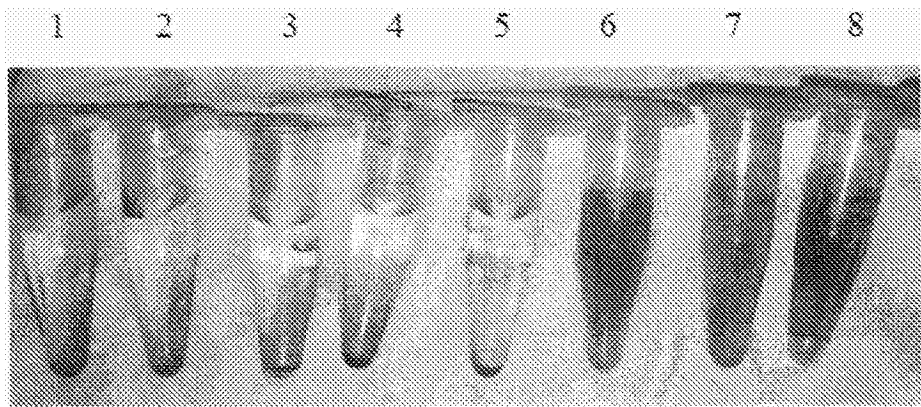


图14

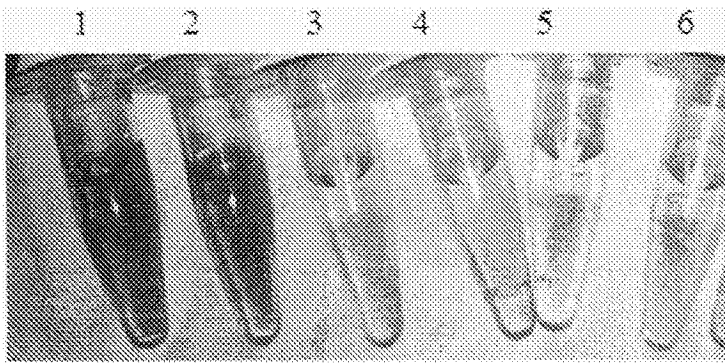


图15

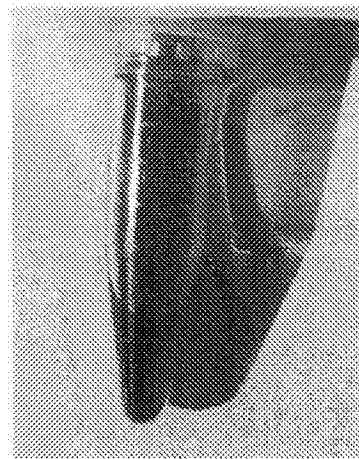


图16

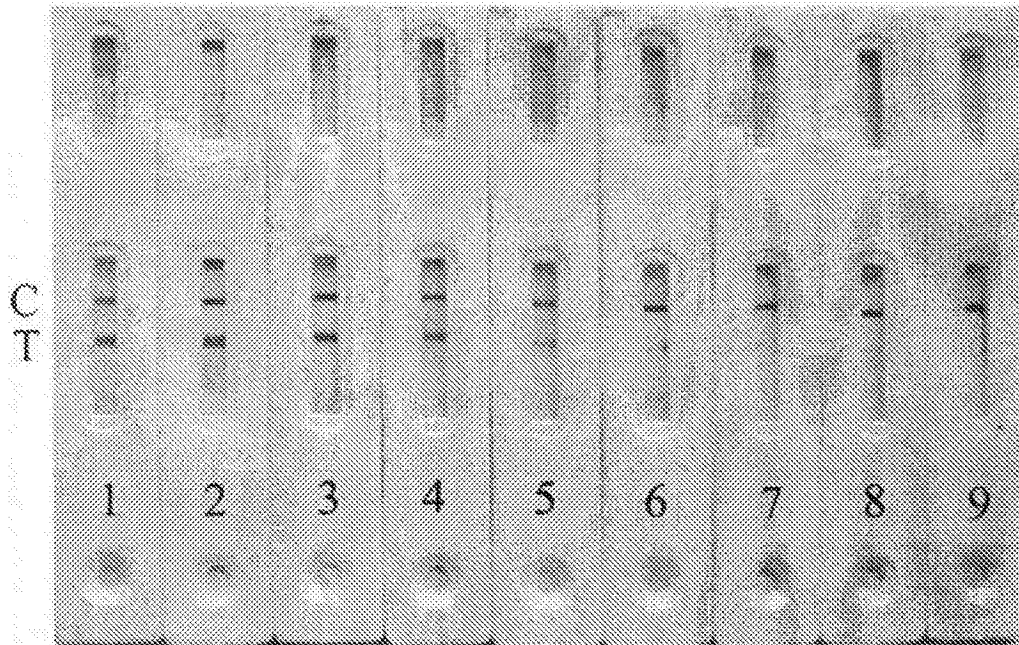


图17

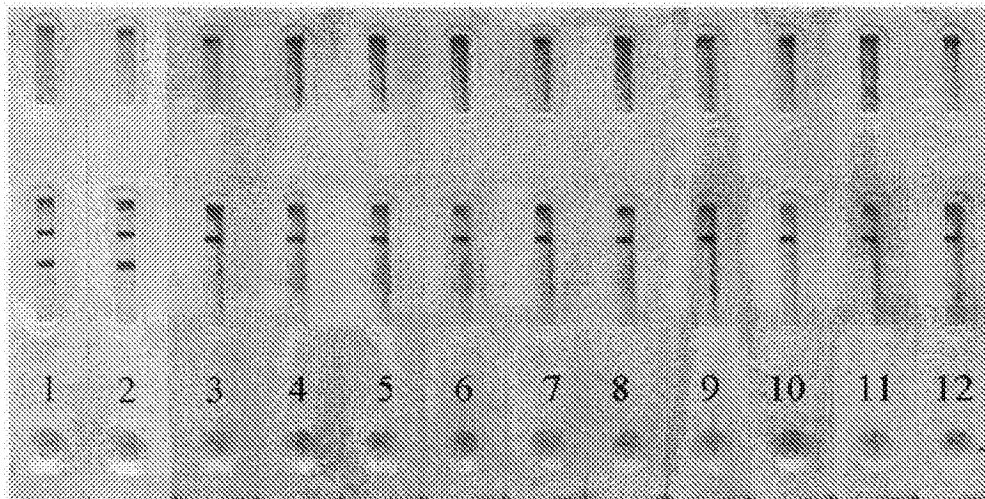


图18-1

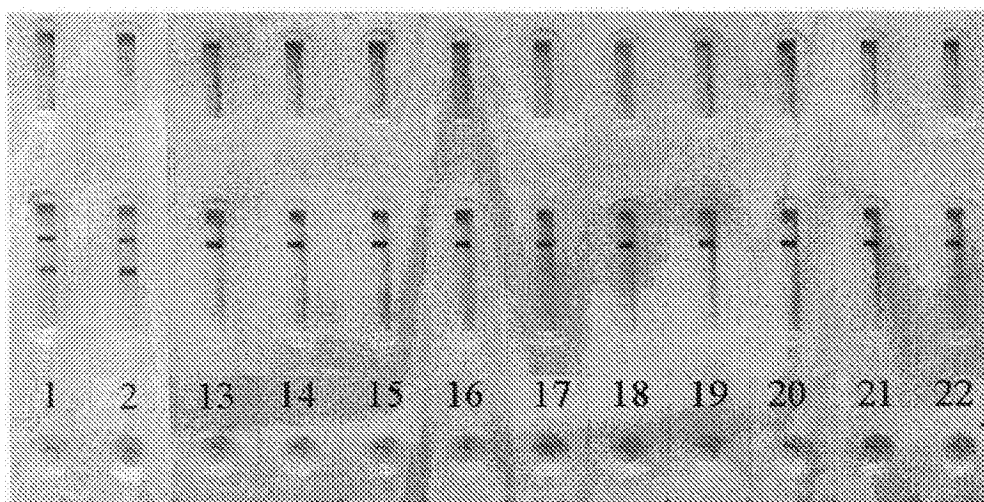


图18-2

专利名称(译)	副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸及制备方法		
公开(公告)号	CN106336458A	公开(公告)日	2017-01-18
申请号	CN201610634643.0	申请日	2016-07-29
申请(专利权)人(译)	浙江省海洋水产养殖研究所		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省海洋水产养殖研究所		
[标]发明人	闫茂仓 张赛乐 王瑶华 陈然 於俊琦 张翔		
发明人	闫茂仓 张赛乐 王瑶华 陈然 於俊琦 张翔		
IPC分类号	C07K16/12 C07K16/02 C12N15/70 C12N15/31 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种副溶血弧菌的胶体金-卵黄抗体快速检测试纸及制备方法，通过以副溶血弧菌为研究对象，采用外膜蛋白和溶血素为免疫原制备卵黄抗体，依次利用水提取法、饱和硫酸铵沉淀法和SephadexG-75葡聚糖凝胶层析提取得到高纯度的ompK卵黄抗体和TDH卵黄抗体。以副溶血弧菌TDH卵黄抗体为捕获抗体，副溶血弧菌ompK卵黄抗体为检测抗体，研制副溶血弧菌的快速检测试纸条，该快速检测试纸条，具有灵敏、方便使用的优点，可广泛地应用于水产养殖动物疾病的早期快速检测，具有良好的应用前景。

EP 管编号	1	2	3	4	5	6	7	8
1% K ₂ CO ₃ (μl)	0	1	3	6	9	12	15	18
胶体金溶液体积 (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
抗体(μg)	10	10	10	10	10	10	10	10