

中图分类号_____

学校代码 10224

密 级 公开

学 号 130610506

東北農業大學

硕士学位论文

检测大肠杆菌菌毛的新型凝集技术研究

作 者 李星月

导 师 师东方 教授

学位类别 农学硕士

所在学院 动物医学学院

一级学科 兽医学

二级学科 预防兽医学

二〇一六年六月

Classified Index:
Confidential (yes/no): no

Code: 10224
NO.: 130610506

Dissertation for the Master Degree

**Research of New Agglutination Technology
for the Detection of ETEC Fimbriae**

Candidate: Li Xingyue

Supervisor: Prof. Shi Dongfang

Degree Category: Master of Agriculture

College: College of Veterinary Medicine

First level discipline: Veterinary Science

Second level discipline: Preventive Veterinary Medicine

Harbin China

June 2016

**本研究受到国家科技支撑计划项目
(2012 BAD12B03-3, 2012 BAD12B05-2)
资助**

独 创 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含未获得

(注：如没有其他需要特别声明的，本栏可空)或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：李星月

日期：2016年6月14日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权学校可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：李星月

日期：2016年6月14日

导 师 签 名：

李星月

日期：2016年6月14日

目 录

摘要	I
英文摘要	III
1 引言	1
1.1 致病性大肠杆菌及其毒力因子	1
1.1.1 大肠杆菌概述	1
1.1.2 产肠毒素性大肠杆菌及其毒力因子	1
1.1.3 菌毛黏附素的检测技术	4
1.2 凝集试验	6
1.2.1 直接凝集试验	6
1.2.2 间接凝集试验	6
1.3 单因子血清制备技术	7
1.4 二氧化硅微球的制备及应用	8
1.4.1 二氧化硅微球	8
1.4.2 二氧化硅微球的制备技术	8
1.4.3 二氧化硅微球的应用	10
1.5 研究的目的意义	10
2 材料与方法	12
2.1 材料	12
2.1.1 菌株与实验动物	12
2.1.2 PCR 引物	12
2.1.3 主要试剂	12
2.1.4 仪器设备	13
2.2 试验方法	13
2.2.1 四种菌毛的 PCR 鉴定	13
2.2.2 电镜观察	14
2.2.3 大肠杆菌生长曲线的测定	15
2.2.4 大肠杆菌菌毛的提取	15
2.2.5 SDS-PAGE 鉴定	16
2.2.6 Western blot 鉴定	16
2.2.7 抗血清的制备	16
2.2.8 抗血清效价的测定	16
2.2.9 单因子血清的制备	17
2.2.10 免疫彩色二氧化硅微球(ICSN)的制备	18
2.2.11 不同颜色微球的凝集试验	18
2.2.12 特异性试验	19

2.2.13 菌毛 ICSN 凝集试验条件的优化	19
2.2.14 敏感性试验	20
2.2.15 直接凝集与间接凝集效果的比较	20
2.2.16 稳定性试验	20
2.2.17 双盲样品检测	20
3 结果	21
3.1 四种菌毛的 PCR 鉴定	21
3.2 电镜观察	22
3.3 K88ab、K99、987p、F41 生长曲线的测定	23
3.4 SDS-PAGE 鉴定	24
3.5 Western blot 鉴定	24
3.6 抗血清效价测定	25
3.6.1 玻片凝集试验	25
3.6.2 间接 ELISA 检测抗体效价	25
3.7 单因子血清的制备	25
3.7.1 交叉凝集反应	25
3.7.2 交叉抗体的吸收	26
3.7.3 单因子血清效价检测	26
3.8 CSN 形态观察	27
3.9 不同颜色微球凝集试验	27
3.10 特异性试验	28
3.11 凝集条件的优化	30
3.11.1 最适菌液与 ICSN 浓度的确定	30
3.11.2 最适反应温度的确定	31
3.11.3 不同稀释液的凝集效果	32
3.12 敏感性试验	32
3.13 直接凝集与间接凝集效果的比较	33
3.14 稳定性试验	34
3.15 双盲样品检测	34
4 讨论	36
4.1 菌毛的表达条件和提取技术的选择	36
4.2 新型凝集技术的研究	36
4.3 有机活性染料	37
4.4 二氧化硅微球的制备及其应用前景	37
5 结论	39
致谢	40
参考文献	41
攻读硕士学位期间发表的学术论文	47

CONTENTS

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
1 Introduction	1
1.1 Pathogenic Escherichia coli and pathogenic factors	1
1.1.1 Overview of E.coli	1
1.1.2 Enterotoxigenic E.coli and virulence factors	1
1.1.3 Detection technology pili adhesins	4
1.2 Agglutination test.....	6
1.2.1 Direct agglutination test	6
1.2.2 Indirect agglutination test	6
1.3 Preparation technology of mono-specific serum	7
1.4 Preparation and application of silica nanoparticles	8
1.4.1 Silica nanoparticles	8
1.4.2 Preparation technology of silica nanoparticles	8
1.4.3 Application of silica nanoparticles.....	10
1.5 Purpose and significance of the research	10
2 Materials and Methods	12
2.1 Materials	12
2.1.1 Strains and experimental animals	12
2.1.2 Primers for PCR	12
2.1.3 Reagents.....	12
2.1.4 Apparatus.....	13
2.2 Methods	13
2.2.1 Determination four fimbriae by PCR	13
2.2.2 Observation by electron microscope	14
2.2.3 Determination of growth curve of E.coli.....	15
2.2.4 Extraction of E.coli fimbriae	15
2.2.5 Determination by SDS-PAGE.....	16
2.2.6 Determination by Western blot	16
2.2.7 Preparation of antiserum.....	16
2.2.8 Detection of antiserum titer	16
2.2.9 Preparation of mono-specific serum	17
2.2.10 Preparation of immune color silica nanoparticles(ICSN)	18
2.2.11 Agglutination test of nanoparticles with different colors	18
2.2.12 Specificity test.....	19
2.2.13 Optimization of pili ICSN agglutination test conditions	19

2.2.14 Sensitivity test.....	20
2.2.15 Comparison of agglutination effect between direct and indirect agglutination.....	20
2.2.16 Stability test	20
2.2.17 Detection of double blind simples.....	20
3 Results	21
3.1 Identification of four fimbriae by PCR	21
3.2 Observation by electron microscope.....	22
3.3 Determination growth curves of K88ab,K99,987p and F41	23
3.4 Identification by SDS-PAGE.....	24
3.5 Identification by Western blot	24
3.6 Detection of antiserum titer	25
3.6.1 Slide agglutination test.....	25
3.6.2 Detection antibody titer by indirect ELISA.....	25
3.7 Preparation of mono-specific serum	25
3.7.1 Cross agglutination reaction	25
3.7.2 Absorption of cross antibody	26
3.7.3 Detection of mono-specific serum titer	26
3.8 Observation of CSN	27
3.9 Agglutination test of nanoparticles with different colors	27
3.10 Specificity test	28
3.11 Optimization of aggregation conditions	30
3.11.1 Determination of the optimum concentration of bacterial and ICSN	30
3.11.2 Determination of optimum reaction temperature	31
3.11.3 Agglutination effect of different determination diluent	32
3.12 Sensitivity test.....	32
3.13 Comparison of agglutination effect between direct and indirect agglutination	33
3.14 Stability test.....	34
3.15 Detection of double blind simples	34
4 Discussions	36
4.1 Selection of expression conditions and extraction technology of fimbriae	36
4.2 Research of agglutination test	36
4.3 Organic reactive dyes	37
4.4 Preparation and application prospect of silica nanoparticles application	37
5 Conclusion.....	39
Aknowledgement.....	40
References	41
Paper published in the period of Ph.M.education	47

摘要

产肠毒素性大肠杆菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)作为最主要的肠道病原菌,常引起犊牛、羔羊、仔猪等幼畜腹泻,在世界大部分地区广泛流行,具有高发病率和死亡率,给畜牧业带来严重的损失,因此建立一种快速、简便、灵敏、特异的诊断技术对防治该病具有重要意义。ETEC 可在菌毛黏附素协助下定植在肠道内,继而产生肠毒素,引起幼畜腹泻。许多 ETEC 菌株带有菌毛黏附素,如 K88、K99、987p 和 F41,因此,通过快速检测菌毛黏附素,可为 ETEC 的检测提供重要的参考依据。

本研究旨在通过提取 ETEC 菌毛 K88ab、K99、987p 和 F41,免疫新西兰白兔制备单因子血清;以彩色二氧化硅微球(Colored Silica Nanoparticles, CSN)为载体,将单因子血清修饰到微球表面,制备免疫彩色二氧化硅微球(Immune Colored Silica Nanoparticles, ICSN),建立一种新型间接凝集技术用于 K88ab、K99、987p 和 F41 菌毛的快速检测。

单因子血清的制备。分别提取四种菌毛,免疫新西兰白兔,每隔 21 d 免疫一次,共免疫 3 次;无菌采集兔心血制备抗血清,玻片凝集试验结果显示,抗 K88ab、K99、987p 和 F41 血清凝集价分别为 1:256、1:512、1:128 和 1:4096。交叉凝集试验结果显示, K88ab 抗血清与 K99 抗原凝集价为 1:32, K99、987p 和 F41 抗血清均与 K88 抗原交叉凝集,凝集价分别为 1:8、1:16 和 1:16。通过反应条件优化,最终确定将抗血清和与之有交叉凝集的菌体压积 1:1 混合,4℃ 48h 吸收交叉抗体。结果显示,吸收后的抗 K88ab、K99、987p 和 F41 血清只与自身抗原发生凝集反应,特异性良好,凝集价分别为 1:64、1:256、1:32 和 1:2048。

ICSN 的制备及应用。用反相微乳液法制备的 CSN 与单因子血清结合制备了不同颜色的 K88ab、K99、987p 和 F41 ICSN,同时使用三种不同颜色的 ICSN 检测抗原,结果显示颜色对凝集效果没有影响。通过反应条件优化,最终确定玻片凝集试验的反应体系和反应条件为: ICSN 20 μ L、菌液 20 μ L(菌液浓度范围为 $10^6 \sim 10^9$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$), 25℃~37℃ 反应 1 min。特异性实验结果显示, K88ab、K99、987p 和 F41 ICSN 与 ETEC C83903(K88ab $^{+}$)、C82529(K99 $^{+}$)、C83915(987p $^{+}$)、O142(F41 $^{+}$)、大肠杆菌 DN69-A、大肠杆菌 DN89-B、绿脓杆菌(SD004)、猪丹毒杆菌(CVCC124)、猪霍乱沙门氏菌(CVCC503)、巴氏杆菌(CVCC430)、生理盐水不发生交叉凝集反应。敏感性实验结果显示, K88ab、K99、987p 和 F41 ICSN 对菌液的最小检出浓度为 $1.0 \sim 5.1 \times 10^6$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 。制备的 ICSN 在 4℃ 保存 30 d,其特异性、敏感性没有明显变化,具有良好的稳定性。对双盲样品的检测结果同实际样品的检测结果,100%符合。新型凝集试验结果直观、易于判断,且每次使用的抗体量为玻片凝集试验的 1/500,适用于抗体量少而检测样品多的情况。

本研究建立了一种以 CSN 为载体,用于检测 ETEC K88ab、K99、987p、F41 菌毛的新型间接凝集试验,为幼畜大肠杆菌性腹泻的诊断与防治提供了简便、快速、敏感、特异的检测方法。

关键词: 产肠毒素性大肠杆菌; 菌毛; 单因子血清; 二氧化硅微球; 间接凝集技术

Research of New Agglutination Technology for the Detection of ETEC Fimbriae

Abstract

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) is one of major pathogens that causes newborn animals (calves, lambs, piglets) diarrhea. It's popular widely in most parts of the world and its high morbidity and mortality caused serious damage to livestock. It's of great significance to establish a rapid, simple, sensitive and specific diagnostic technique for the prevention and treatment of the disease. ETEC colonized in the intestine in the assistance of pili adhesin, then produced toxin, causing diarrhea in young animals. Many ETEC strains carried pili adhesins, such as K88, K99, 987p and F41. Therefore, the rapid detection of fimbriae could provide important reference for the detection of ETEC.

This study aimed to extract enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae K88ab, K99, 987p and F41 to immunize New Zealand white rabbits to prepare mono-specific serum, then colored silica microspheres (Colored Silica Nanoparticles, CSN) as the carrier, mono-specific serum modified to the nanoparticles surface to prepare immune colored silica microspheres (Immune Colored Silica Nanoparticles, ICSN), establishing a new indirect agglutination technology for the rapid detection of K88ab, K99, 987p and F41 fimbriae.

Preparation of mono-specific serum. Extracted four types fimbriae to immunize New Zealand white rabbits three times at intervals 21 d. Sterile collection rabbit blood for preparing antiserum, the results slide agglutination test showed that anti K88ab, K99, 987p and F41 serum agglutination titer were 1:256, 1:512, 1:128 and 1:4096. The results of cross-agglutination test showed that the K88ab antiserum and K99 antigen agglutination titer was 1:32, what's more, K99, 987p, F41 antiserum and K88 antigen were cross-agglutination, and agglutination titer were 1: 8, 1: 16 and 1:16, respectively. By optimizing the reaction conditions, we determined to mix antiserum with cross agglutination cell hematocrit at volume ratio 1:1, and absorbed cross antibody 48 h at 4°C. The results showed that K88ab, K99, 987P and F41 only reacted with corresponding antigen with great specificity after absorption, and agglutination titer were 1:64, 1:256, 1:32 and 1:2048, respectively.

Preparation and application of ICSN. CSN prepared by reverse microemulsion method bound to mono-specific serum to prepare different color of K88ab, K99, 987p and F41 ICSN, while using three different colors ICSN detecting antigen showed that the color had no effect on agglutination results. By optimizing the reaction conditions, we determined the reaction system and the reaction conditions for the slide agglutination test, which acquired that 20 μL ICSN was mixed with 20 μL bacteria (the concentration range of bacterial solution was $10^6 \sim 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) at $25^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ for 1

min. The results of specificity test showed that K88ab, K99, 987p, F41 ICSN had no cross agglutination reaction with ETEC C83903(K88ab⁺), C82529(K99⁺), C83915(987p⁺), O142(F41⁺), E.coli DN69-A, E.coli DN89-B, Pseudomonas aeruginosa (SD004), Bacillus erysipelatos-suis(CVCC124), Salmonella choleraesuis(CVCC503), Pasteurella(CVCC430) and physiological saline. The results of sensitivity test showed that the minimum detectable concentration of bacilli of K88ab, K99, 987p and F41 ICSN was $1.0\sim5.1\times10^6\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$. ICSN stored at 4 °C for 30 d, but its specificity, sensitivity did not change significantly, with good stability. The detection results of the double blind samples were in accordance with the actual samples. The results of new agglutination test were intuitive and easy to judge, and the amount of antibody of 1/500 of slide agglutination test could detect antigen, thus, it was suitable for the situation that the quantity of the antibody was small and the sample is was much.

This study established an indirect agglutination test which regarded CSN as the carrier, for detecting ETEC K88ab, K99 and F41 fimbriae, and provided a rapid, simple, specific and sensitive detection method for the diagnosis, prevention and treatment of diarrhea of pup Escherichia coli.

Key words: Enterotoxigenic *Escherichia coli*; Fimbriae; Mono-specific serum; Silica nanoparticles; Indirect agglutination technique

Candidate: Li Xingyue

Speciality: Preventive Veterinary Medicine

Supervisor: Prof. Shi Dongfang

1 引言

1.1 致病性大肠杆菌及其毒力因子

1.1.1 大肠杆菌概述

大肠杆菌(*Escherichia coli*, E.coli)是 Escherich 于 1885 年从婴儿腹泻粪便中分离出来的, 在其后很长一段时期里, 被当作是人和动物肠道正常菌群之一。直到 20 世纪中叶, 才发现有些是正常菌群, 有些却是致病菌群。致病性大肠杆菌主要引起婴儿和幼畜(禽)严重的腹泻和败血症。大肠杆菌属革兰氏阴性短杆菌, 大小为 $0.5 \times 1 \sim 3 \mu\text{m}$ 。大多数菌株周身鞭毛, 能运动, 无芽孢, 能发酵多种糖类产酸产气。根据生物学特性和致病机理的不同主要将致病性大肠杆菌分为产肠毒素性大肠杆菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)、肠致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)、肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)、肠侵袭性大肠杆菌(*Enteroinvasive Escherichia coli*, EIEC)和肠黏附性大肠杆菌(*Enteroadherent Escherichia coli*, EAEC)^[1]。

1.1.2 产肠毒素性大肠杆菌及其毒力因子

ETEC 是引起人和动物腹泻的重要病原体, 具有高发病率和死亡率, 世界上每年有成百上千万的人感染, 主要是发展中国家的游客和孩子。ETEC 主要是通过食用污染的水和食物定植在小肠, 分泌耐热肠毒素或不耐热肠毒素, 进而引起腹泻。ETEC 表达的菌毛定植因子具有种属特异性, 可黏附定植在肠道^[2]。人源 ETEC 的菌毛定植因子有 20 余种, 动物源性 ETEC 的致病菌毛有 F4 (K88)、F5 (K99)、F6 (987p)、F17、F18、F41 等。常见的引起家畜腹泻的菌毛主要有 K88、K99、987p 和 F41, 其中 K88、987p 多见于引起仔猪腹泻的 ETEC, 而 K99、F41 多见于引起犊牛、羔羊和仔猪腹泻的 ETEC。

菌毛黏附素、肠毒素、志贺毒素和溶血素等是常见的 ETEC 毒力因子, 其中引起发病的主要毒力因子是菌毛黏附素和肠毒素。ETEC 菌毛与相应的特异性受体结合后促进菌体在宿主小肠上皮细胞上定植, 大量繁殖, 产生肠毒素。肠毒素通过破坏宿主小肠上皮细胞, 造成体液失衡、电解质紊乱进而导致腹泻^[3]。

1.1.2.1 菌毛

菌毛, 又称菌毛黏附素, 位于 ETEC 菌体表面。目前, 国内外流行病学调查资料显示引起幼畜腹泻的 ETEC 菌毛以 K88、K99、987p、F41 为主^[4,5]。

(1)K88(F4)菌毛

K88 菌毛是 Rskov 等在 1961 年首先发现的。在电子显微镜下, 其菌毛呈柔软、丝状结构, 直径约 2.1 nm。不同的 K88 菌毛在 SDS-PAGE 中呈现的条带不同, 大小为 23.5~26.0 ku, 等电点为 3.92。K88 菌毛是猪源 ETEC 的一种主要蛋白质菌毛。根据抗原决定簇的不同, 将 K88

分为 K88ab、K88ac、K88ad 三个血清亚型^[6,7]，其中 K88ab 又被分为 K88ab1 和 K88ab2^[6]。K88 菌毛由 *fae* 操纵子编码，包括 *faeA*-*faeJ* 10 个基因，分别表达 FaeA-FaeJ 10 种蛋白。FaeA 和 FaeB 为调控蛋白；FaeC 是微小亚基，在菌毛的最外层；FaeD 是外膜蛋白，起支持作用；FaeE 为分子伴侣，与 FaeD 可协助 FaeG 组装出 K88 不同的突变体；FaeF 和 FaeH 主要参与菌毛的装配过程；FaeG 是菌毛的主要亚单位蛋白，FaeI 和 FaeJ 是小亚单位蛋白，其作用尚不清楚^[8-13]。K88 的特异性受体位于肠绒毛上皮细胞的刷状缘上，含有 β -1-半乳糖^[14]。K88 三种突变体的刷状缘上的糖蛋白分子量大小为 45~70 ku，两种肠黏液素型唾液酸蛋白 (IMTGP1 和 IMTGP2) 分别为 K88ab 和 K88ac 的受体，肠铁传递蛋白 (GP47) 为 K88ab 的特异性受体，肠中性鞘糖脂 (IGLad) 是 K88ad 的特异性受体。Van Zijderveld 等应用单抗鉴定出 K88 至少有 11 个表位，称为 a1~a7、b1、b2、c 和 d，并推测 K88ab、K88ac 和 K88ad 由这些表位构成^[15]。K88 菌毛免疫原性良好，免疫动物可产生高效价的相应抗体。K88 菌毛是甘露糖抗性菌毛，其血凝特性的差异与 K88 的受体和黏附素的结构有关^[16]。由于编码 K88 的基因与发酵棉子糖的基因存在于同一质粒 DNA 上，因此可根据分离到的大肠杆菌是否发酵棉子糖确定是否为 K88 阳性菌株。

(2) K99(F5)菌毛

Smith 和 Linggoog 在 1972 年首先从腹泻的犊牛和羔羊中分离得到 K99 菌毛。该菌毛在电子显微镜下呈杆状微丝结构，长度约 130 nm，直径约 4.3 nm，具有很强的聚集倾向。K99 菌毛的分子量大小约为 18 ku，等电点为 9.75。编码 K99 的基因位于分子量为 75 kb 的接合质粒上或 87.8 kb 的非接合质粒上，在接合质粒上还能同时编码 ST 和一些抗生素抗性。K99 菌毛的合成主要与 *fanA*~*fanH* 8 种特异性基因有关，但菌毛的表达还需依赖某些宿主特异性基因，如 cAMP 受体蛋白 (Crp) 和亮氨酸应答蛋白 (Lrp)。K99 的 8 种特异性基因分别属于 3 种不同的调节簇，其中 I 型和 II 型调节簇依赖于 Crp，Lrp 对 I 型调节簇的表达也是必不可少的。K99 的特异性受体是唾液酸半乳糖，其主要作用是调节糖基转移酶的活性，进而可改变受体对 K99 的易感性。羊扬等从猪源 ETEC K99 菌毛基因组中克隆了除 *fanA*、*fanB* 以外的全部操纵子基因，插入 pBR322 表达质粒，结果显示 K99 菌毛在非致病性大肠杆菌获得非诱导性的高效表达^[17]。K99 是甘露糖抗性菌毛，可以凝集绵羊和马的红细胞，具有血凝作用的活动中心是其 132 和 133 位氨基酸^[18]。K99 菌毛具有良好的免疫原性，常见于主要引起感染犊牛、羔羊和仔猪严重腹泻的 ETEC。

(3) 987p(F6)菌毛

该菌毛是由 Nagy 等人在 1976 年首先发现并命名。在电子显微镜下，987p 菌毛是一种呈中空结构、长而坚硬的丝状物。987p 菌毛的分子量大小约为 20 ku，其等电点为 3.7。编码 987p 的基因位于质粒上，987p 菌株在传代过程中可能会出现质粒丢失，因而不产生菌毛，因此在实验前需对菌株进行鉴定。

987p 菌毛的生物合成主要与基因 *fasA*~*fasH* 有关，这些基因分别表达 FasA-FasH 8 种蛋白。FasA 是菌毛的主要结构亚基，与 FasF 和 FasG 共同介导 987p 菌毛对仔猪小肠上皮细胞相应受体的结合^[19]；FasD 是引导蛋白，位于外膜蛋白上，在生物合成过程中指引细胞周质的亚基移位^[20]；*fasH* 基因的表达受培养基中碳氮含量和 pH 的影响，*fasA* 的表达需要 FasH 的活化；FasE 为分子伴侣，存在于周间隙外膜蛋白内侧；FasF 位于 FasA 和 FasG 之间，与

FasG 共同参与菌毛的延长过程；FasG 是菌毛合成中必不可少的，可识别仔猪小肠上皮细胞和刷状缘上的糖蛋白。

彭姣等分离出一株同时含有 K88 和 987p 菌毛基因的菌株，纯化后具有较强的免疫原性，免疫获得的 IgY 对 K88 和 987p 的效价可达到 1:64 000，可特异的与 K88 和 987p 结合，与 K99 和 F41 无交叉反应，5 mg/mL 的分离株菌毛 IgY 在体外具有良好的抑菌作用^[21]。贺志良等构建表达了 6×His-FasA 融合蛋白，通过免疫小鼠检测血清效价为 1:125 000^[22]。

(4) F41 菌毛

F41 菌毛是由 Morris 等于 1978 在从牛源大肠杆菌 B41(O141: K99)菌株中发现的。在电子显微镜下，F41 菌毛直径约 3.2 nm，呈丝状结构，蛋白分子量约为 29.5 ku。F41 菌毛主要作用于幼畜的空肠和回肠，其特异性受体为血型蛋白 AM。

Van Zijderveld 等用单克隆抗体鉴定出 F41 的 5 个抗原决定簇(F41-1~F41-5)，并证明了 F41-1 在 F41 黏附仔猪小肠上皮细胞和凝集猪红细胞中起决定作用^[23]。F41 菌毛的编码基因位于染色体上。含有 F41 菌毛的菌株通常只产生耐热肠毒素。F41 菌毛对豚鼠和人 A 型红细胞具有较强的凝集活性，对马和绵羊的红细胞凝集活性较弱^[24]。F41 菌毛抗原可单独存在于一株菌中，也可与其他菌毛共同表达，一般与 K99 菌毛共同表达。在 18℃时，F41 菌毛不表达，丙氨酸可抑制菌毛的生成。

1.1.2.2 肠毒素

肠毒素是 ETEC 在生长繁殖过程中释放的一种外毒素，根据对热稳定性不同分为耐热肠毒素(ST)和不耐热肠毒素(LT)两种。ST 和 LT 可单独存在与 ETEC 菌株中，也可共同存在于 ETEC 菌株中。

(1) 耐热肠毒素(ST)

ST 是由 ETEC 分泌的一种热稳定性的肠毒素，100℃加热 30 min 仍具有生物活性，而且还能抗酸碱和抗各种蛋白酶的水解。ST 广泛存在于自然界中，大约 75%的 ETEC 菌株中都含有 ST。成熟的 ST 是由 18 或 19 个氨基酸组成的小肽。ST 是小分子抗原，大小约为 2 ku。其毒性很强，但免疫原性很差。根据在甲醇中的溶解度和生物学活性分为 STa 和 STb 两类^[25]，它们的编码基因均位于质粒上。STa 可溶于甲醇，只有与大分子物质偶联时才可具有免疫原性，可通过乳鼠灌胃试验对其进行检测^[25, 26]。ETEC 进入机体后定植在肠黏膜上释放 STa，STa 与肠黏膜上皮细胞受体鸟苷酸环化酶(GC)结合，激活 GC 系统，水解 ATP 生成 cAMP，cAMP 水平的增高，激活蛋白激酶 G，引起肠道细胞内电解质失衡，水代谢紊乱，进而导致腹泻^[27]。STb 前体是由 71 个氨基酸组成的，大小为 8.1 ku，在切除信号肽后变为成熟的 STb，由 48 个氨基酸组成，大小为 5.2 ku。与 STa 不同，STb 不溶于甲醇，在乳鼠灌胃试验中无活性，但在断乳仔猪空肠环结扎试验中可检测到^[28]。STb 对一些蛋白酶和有机溶剂较敏感，如胰蛋白酶和 β 巯基乙醇，经其处理后就会丧失活性。STb 在引起腹泻时，首先与小肠上皮细胞膜表面的硫酸脑苷脂结合，激活 G 蛋白，致使细胞膜上的 Ca²⁺通道打开，Ca²⁺吸收增多，进一步激活钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II，并触发磷脂酶 A₂ 和磷脂酶 C，这两种酶促使花生四烯酸从膜脂上释放，刺激前列腺素 E₂(PGE₂)和其它促分泌素的合成，引起腹泻^[29]。

(2) 不耐热肠毒素(LT)

LT 是由 ETEC 分泌的一种存在于菌体周质中的肠毒素, 其对热不稳定, 65℃ 加热 30 min 即可完全灭活。LT 在结构、生理功能、抗原性上均与霍乱毒素(CT)十分相似^[30]。其分子量大小为 84 ku, 由 A、B 两个亚单位(LTA 和 LTB)组成 AB₅ 型六聚体蛋白。根据宿主差异可将 LT 分为人源(LT-h)和猪源(LT-p)两类, 它们在理化性质和免疫原性上极其相似, 基因序列具有很高的同源性。根据编码基因和生物学特性的差异, 又可将 LT 分为 LT-I 和 LT-II 两种类型, 前者由胞浆中的大质粒编码, 而后者由染色体 DNA 编码^[31]。尽管 LT-I 和 LT-II 在组成和作用方式上相似, 但在基因序列同源性和交叉免疫原性上却没有相似性。LT-I 在自然界很常见, 一般常说的 LT 指的就是 LT-I, 而 LT-II 只是近年来才在人、鸵鸟和牛等动物的腹泻粪便中分离鉴定^[32-34]。LT 的 B 亚基先与小肠上皮细胞膜上的受体神经节苷脂 GM1 结合, 然后 A 亚基激活腺苷酸环化酶, 导致 cAMP 水平增高, 刺激肠粘膜过度分泌水和电解质, 小肠内大量液体滞留, 当超过肠道吸收能力, 就会导致水样腹泻^[35]。LT-I 是目前发现的最强的免疫原之一, 具有良好的黏膜佐剂作用, 但由于 LT 的 A 亚基具有强毒性使其在疫苗研制中的应用受到限制^[36]。

1.1.3 菌毛黏附素的检测技术

1.1.3.1 血清学检测技术

(1) 玻片凝集试验

玻片法是将抗体与抗原滴加在载玻片上, 抗原抗体在玻片上发生凝集反应, 产生肉眼可见的凝集颗粒。该方法操作简单、省时, 但结果判定需要肉眼观察, 有一定的人为因素, 且易出现假阳性。Guinée 等使用玻片凝集试验检测了大肠杆菌菌毛抗原^[37]。

(2) 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验(ELISA)是 20 世纪 70 年代发展起来的一种检测技术。其方法为抗原与辣根过氧化物酶标记的抗体反应后, 加入底物显色液, 通过颜色的深浅判定结果。后来根据实验需要又对 ELISA 方法进行了改进, 建立了间接 ELISA、竞争 ELISA 和夹心 ELISA 等。Mills 等使用单抗隆抗体 ELISA 鉴定从牛群中分离出的 K99 阳性株, 结果表明该方法具有高敏感性^[38]; Schneider 等应用 ELISA 法检测粪便中大肠杆菌 K99 菌毛抗原^[39]; Jäkel 等利用单克隆抗体建立夹心 ELISA 法检测 K88、K99 和 987p 菌毛抗原, 表明该技术具有很好的重复性^[40]。该方法费时, 且对操作者的技术要求较高, 所以只适用于实验室操作, 不适合临床快速检查和流行病学调查。

(3) 免疫电镜观察

电子显微镜可以直接观察菌毛黏附素的形态和特征, 但只能判断是否有黏附素, 不能确定黏附素的类型。Hernández 等应用免疫电镜证明了大肠杆菌 K99 菌毛的存在^[41]。

(4) 琼脂扩散沉淀试验

琼脂扩散沉淀试验(AGID)是可溶性抗原与相应抗体在含有电解质的半固体凝胶中相遇, 出现肉眼可见的沉淀线的一种免疫血清学技术。这种方法可以鉴定大肠杆菌菌毛类型、测定菌毛或抗血清的纯度和检测菌毛抗血清的效价。此法操作简便, 结果易观察, 但灵敏度不高, 且外界环境因素、抗原抗体比例等因素可能造成假阳性或假阴性的结果。房海等建立了鉴定

大肠杆菌菌毛抗原的琼脂双相双扩散法,菌毛单因子血清与相应的菌毛反应出现明显的沉淀线,而不与其他菌毛抗原反应,具有良好的特异性^[42]。

(5) 免疫印迹

免疫印迹,又称蛋白质印迹(Western blotting),是将抗原经过 SDS-PAGE 电泳后,电转印到硝酸纤维素膜上,封闭后与单因子血清反应,再与酶标抗体结合,最后置于显色液中显色。这种方法具有良好的特异性和敏感性,但操作繁琐、需要特殊仪器,不适用于临床检测。周碧君^[43]和 Westerman 等^[44]使用免疫印迹法检测了大肠杆菌 K88 菌毛,抗血清可与 K88 特异性结合,出现明显的条带。

(6) 荧光抗体法

荧光抗体技术,即抗原与荧光素标记的抗体结合后,在荧光显微镜下可看到特异性荧光,用来检测抗原的免疫学技术。Mullaney 等通过比较血凝试验、ELISA 和间接荧光抗体染色试验三种方法检测 K88、K99 和 987p,结果表明间接荧光抗体法最灵敏^[45]。

(7) 免疫胶体金标记技术

免疫胶体金标记技术(ICGT)是一种新型免疫标记技术,其基本原理是以胶体金为示踪标记物,定性或半定量检测抗原或抗体。免疫胶体金技术具有易制备、操作简便、结果易观察等优点^[46]。杨旭东等制备了检测大肠杆菌 F5 菌毛的免疫胶体金试纸条,结果表明试纸条特异、敏感且稳定^[47]。

1.1.3.2 分子生物学检测技术

(1) 聚合酶链式反应

聚合酶链式反应(PCR)是 20 世纪 80 年代中期发展起来的一种体外核酸扩增方法,该方法操作简便,具有良好的敏感性和特异性。华荣虹等为对猪源大肠杆菌的四种主要菌毛进行快速检测和分型,建立了检测菌毛的多重 PCR 方法,结果表明该方法灵敏度和特异性良好,可用于临床诊断 ETEC 性腹泻和对菌毛的分型鉴定^[48]。Campos 等应用 PCR 技术检测从患败血症、鸡肿头综合征、脐炎的鸡中分离的病菌,检测到禽源大肠杆菌的相关黏附素基因^[49]; Byun 等为检测引起仔猪腹泻的 ETEC K88 菌毛突变体 K88ab、K88ac 和 K88ad,建立了一步法实时 PCR 方法^[50]。尽管 PCR 方法可以直接对样品进行检测,然而,由于需要昂贵的仪器,且操作严格,不能广泛的应用到临床和现场诊断中。

(2) 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增法(LAMP)是 Notomi T 等在 2000 年首先提出来的一种新的核苷酸扩增技术,该技术原理是针对靶基因的 6 个区域设计的 4 种特异性引物,利用链置换型 DNA 聚合酶,在恒温条件下完成 DNA 分子的核酸扩增。LAMP 技术的特异性和敏感性良好,无需特殊仪器,结果易于判定,肉眼观察即可。江馥语等建立了检测大肠杆菌 F5 菌毛基因的 LAMP 法,该方法检测的灵敏度比 PCR 检测高 10 倍^[51]。但该方法需在扩增后加入荧光染料,容易造成工作区的基因扩散和污染,使以后的检测出现假阳性。现在已建立了检测其它病原体的 LAMP 方法,事先加入显色物质,扩增后直接观察颜色判定结果,可减少基因扩散和污染^[52,53]。

(3) 基因探针技术

基因探针,是一段带有检测标记的、与目的基因互补配对的核酸序列(DNA 或 RNA),因

此能检测出被检样品中的特定 DNA 序列，进而从基因水平做出诊断。基因探针检测 ETEC，对细菌的纯度要求不高，可直接检测临床样品。Lanser^[54]和 Moseley^[55]应用基因探针技术建立了检测 ETEC 菌毛粘附素的方法。

1.2 凝集试验

凝集试验是指抗原与相应抗体结合后出现肉眼可见的凝集现象的血清学试验。19 世纪初，Horrocks 等从污水中分离培养伤寒杆菌，首次使用凝集技术检测了伤寒杆菌，伤寒杆菌与 20 倍稀释的伤寒杆菌血清反应 30 分钟后完全凝集^[56]。

根据反应过程中是否需要载体，分为直接凝集试验和间接凝集试验。

1.2.1 直接凝集试验

直接凝集试验是指颗粒性抗原与相应抗体反应出现肉眼可见凝集现象，主要分为玻片法和试管法。玻片法主要用于定性检测抗原，主要应用于血型鉴定、细菌鉴定等；试管法主要用于半定量或定量实验，常用于检测抗体效价。玻片法操作简单、省时，但可能因为观察者的不同的影响而发生误判。试管法结果比玻片法更易观察，但操作麻烦、浪费时间，不适用于临床大规模检测。

1.2.2 间接凝集试验

间接凝集试验是指可溶性抗原与相应抗体结合后不出现凝集现象，但是当可溶性抗原附着于某种与免疫无关、颗粒状载体的表面，然后再与相应抗体结合，在有适当电解质的条件下，可出现肉眼可见的凝集现象。常用的载体有绵羊红细胞、聚苯乙烯乳胶颗粒等，根据载体的不同，间接凝集试验主要分为血凝试验、乳胶凝集试验等。由于载体颗粒增大了可溶性抗原的接触面积，抗原与微量抗体结合即可出现明显的凝集现象，其敏感性比直接凝集试验高很多。通常将抗原附着于载体后与抗体结合的凝集反应称为正向间接凝集反应；将抗体与载体附着后与抗原结合进行的反应称为反向间接凝集反应。

1.2.2.1 间接血凝试验

间接血凝试验是以红细胞为载体结合抗原（或抗体），与相应抗体（或抗原）反应出现红细胞凝集现象的血清学技术，是实验室常用的检测方法。主要分成三种类型的血凝试验：

（1）正向间接血凝反应，即将抗原与红细胞结合，用其检测与相应抗体的凝集反应；（2）反相间接血凝反应，即抗体与红细胞结合，检测相应抗原的反应；（3）正向（反相）间接血凝抑制反应，即抗原（抗体）加入相应抗体（抗原），抑制原本应该与抗体（或抗原）致敏的红细胞发生的凝集反应。该技术具有快速、经济、简便的特点。缺点是容易受外界环境影响，出现非特异性反应。Hernández 等通过比较甘露糖抵抗凝集试验、酶联免疫吸附试验、免疫电泳三种检测 K99 和 F41 菌毛抗原的方法，其中间接血凝试验在检测培养物上清的敏感性高于 ELISA 法，但会出现很多非特异性结合^[41]。郭景煜等建立了测定 K88 菌株的反相间

接血凝试验, 结果显示该方法具有良好的特异性^[57]。

1.2.2.2 乳胶凝集试验

乳胶凝集试验(LAT)是将抗原(或抗体)与聚苯乙烯乳胶颗粒结合, 然后将其与相应抗体(或抗原)反应, 出现肉眼可见的凝集现象。Singer 等在 1957 年首次成功地应用该技术检测类风湿性关节炎。该技术最大的优点是能快速检测出结果, 且易操作, 但由于聚苯乙烯乳胶微球无色、易膨胀, 致使结果不易观察。刘利芳利用竞争乳胶凝集试验检测了鸭肝炎病毒抗体, 结果显示该方法敏感性高、特异性强、重复性好, 适用于临床流行病学调查^[58]。郝成武等比较 LAT 和间接 ELISA 两种方法检测猪胸膜肺炎放线杆菌, 符合率为 80%, 尽管 LAT 的敏感性低于间接 ELISA, 但由于具有良好的特异性、操作简单、经济的优点, 可用于临床快速诊断^[59]。

1.2.2.3 协同凝集试验

协同凝集试验是指金黄色葡萄球菌中的 A 蛋白(SPA)与抗体的 Fc 段结合后暴露的两个 Fab 段仍能保持抗体活性, 当与相应抗原结合时出现特异性凝集反应。该技术由 Kronvall 等首次提出, 他使用协同凝集试验检测了肺炎双球菌, 具有快速检测、操作简单的优点^[60]。Murray 等应用协同凝集试验检测了 K88 和 K99 菌毛抗原, 此法与酶免疫试验(EIA)的检测结果相同^[61]。

1.2.2.4 以二氧化硅微球为载体的凝集试验

二氧化硅微球问世以来, 因其稳定、易制备、储存时间长等优点, 一直备受各领域关注。二氧化硅微球表面有很多活性基团, 其表面易于通过物理或化学方法进行改性, 使其具有特殊的功能。杨磊等制备了二氧化硅微球, 并以其作为载体与鸡白痢血清结合, 建立了检测鸡白痢沙门氏菌的快速、简便、灵敏的新型凝集技术^[62]。

1.3 单因子血清制备技术

单因子血清是指只针对一种凝血因子的血清。单因子血清特异性好、抗原亲和性高, 这些特点使其可广泛应用于血清型鉴定和临床检测。免疫流程: 首先选取新西兰白兔, 将抗原与佐剂等量混合乳化, 于兔背部皮下多点免疫, 二免时, 将抗原与佐剂等量混合乳化后于兔背部皮下多点注射, 三免时于兔耳缘静脉注射抗原进行加强免疫, 1 w 后少量采血, 检测抗体效价较高时, 采集兔心血, 制备抗血清。交叉反应确定抗血清的交叉凝集原及交叉凝集价, 然后用相应交叉凝集原对抗血清进行吸收, 获得单因子血清。

吸收交叉凝集抗体时血清与交叉凝集原的比例因细菌种类和交叉凝集价高低不同有所不同。吴福林将制备的钩端螺旋体抗血清与相应抗原菌体压积以 1:4 混合, 首先将抗血清与二倍体积的菌体压积混合, 作用 4 h 后再加入与之前等量的菌体压积, 振荡混匀后室温静置, 结果表明吸收效果较好, 而且吸收后的血清效价依然很高^[63]。李祖盛等为制备肠结肠炎耶尔辛氏菌单因子血清, 将抗血清与等量交叉凝集原菌体压积混合进行吸收, 4℃作用 72h~96h, 成功制备了不与其他抗原出现交叉凝集现象的单因子血清^[64]。路明华将副猪嗜血杆菌抗血清

和与其发生交叉反应的菌株菌液混合, 37℃孵育过夜, 收集上清检测, 若还出现交叉反应, 再次吸收, 直至无交叉反应, 制备 15 个血清型的单因子血清^[65]。一般情况下, 单因子血清的凝集价较吸收之前的凝集有所下降。

1.4 二氧化硅微球的制备及应用

1.4.1 二氧化硅微球

二氧化硅微球是近年来流行起来的一种无定型的白色粉末, 属非金属材料, 呈絮状或网状的颗粒样结构, 具有粒径可控、形状均一、比表面积大、良好的分散性和化学稳定性等特点, 广泛应用于陶瓷、橡胶、塑料、防晒剂、涂料等行业, 在催化剂载体、生物材料、生物检测、医学工程等领域也具有潜在的应用价值^[66]。

1.4.2 二氧化硅微球的制备技术

二氧化硅微球的制备技术有很多种, 根据物理性质的不同主要分为气相法和液相法。

1.4.2.1 气相法

气相法是指气体或物质变成的气体, 在气态下发生了反应, 遇冷后凝聚形成纳米微粒的方法。气相沉积法是气相法中制备微球的常用方法。

气相沉积法制备二氧化硅微球通常是以卤硅烷为原料, 在混合氧气和氢气的条件下, 高温水解生成二氧化硅粒子。王明聪等^[67]采用火焰水解法制备了超微细二氧化硅。由于气相对原料的纯度要求较高, 且在反应过程中引入杂质的可能性较小, 因此制备出的二氧化硅微粒的纯度也很高, 而且粒径分布均匀, 具有良好的重复性。但气相法需要高温反应, 对仪器设备的要求过高, 同时操作繁琐, 原料成本高, 产量低^[68]。

1.4.2.2 液相法

液相法是制备二氧化硅微球的常用方法, 主要包括溶胶-凝胶法、沉淀法、超声水解法、溶胶种子法、反相微乳液法等。

(1) 溶胶-凝胶法

溶胶-凝胶法是目前合成二氧化硅微球的主要方法, 主要是将含有高化学活性的化合物在液相下混匀, 经水解、缩聚反应, 形成溶胶体系, 再通过凝胶化、干燥、热处理形成固体。

段涛等通过改进溶胶-凝胶法, 研究了正硅酸乙酯(TEOS)滴加方式对微球形貌、粒径的影响^[69]。李朝毅等为制备单分散二氧化硅微球, 研究了 TEOS 滴加方式、反应温度、溶剂对微球形成的影响, 结果表明, 在常温 25℃或恒温水浴 25~35℃条件下, 以乙醇作为溶剂, 连续滴定或分步滴定 TEOS 制备微球^[70]。

溶胶-凝胶法制备微球具有仪器简单、粒径可控、副反应少等优点, 但制备过程中的影响因素较多, 反应重复性不易控制, 因此, 目前该技术只用于实验室, 无法用于工业生产。

(2) 化学沉淀法

化学沉淀法是指将硅酸盐原料溶解于含有表面活性剂的溶剂中，再与酸性溶液混合发生沉淀反应，沉淀物经分离、干燥即可获得二氧化硅微球。

李筱等用沉淀法制备了二氧化硅微球，研究表明，不同的表面活性剂，加入量不同，制备出的微球的粒径范围为 80~600 nm^[71]。李曦等在化学沉淀法的基础上进行超声分散，制备的二氧化硅微球粒径更小且分散^[72]。文彬在常温下采用化学沉淀法以硅酸钠为硅源，以聚乙醇-1000 和十二烷基苯磺酸钠组成的复配型表面活性剂为形貌控制剂，无水乙醇为分散剂，乙酸乙酯为沉淀剂成功制备了超细球形 SiO₂ 粒子^[73]。

化学沉淀法具有操作简单、原料丰富、对设备要求低等优点，但制备出的二氧化硅微球杂质多、团聚严重，不适合用于制备高要求的微球。

(3) 超声水解法

超声水解法是指配制一定量溶液，在超声条件下，向体系中匀速滴加 TEOS，经干燥获得二氧化硅微球。

颜培力等通过超声水解法，在 10℃ 以 5 g/min 的速度加料，以氨作为催化剂水解乙醇介质中的 TEOS，成功制备了 300 nm 的二氧化硅微球，结果表明，超声水解 4h 的微球质量最好^[74]。

该方法具有操作方便、设备简单、反应速度快、合成的微球均一等特点，但由于试验的不可控因素太多，不适合临床应用。

(4) 溶胶种子法

溶胶种子法，又称为播种法，是以一定粒径的单分散性胶粒作为种子，然后不断提供硅源（如 TEOS），使其在种子上同步生长，从而获得单分散性的二氧化硅微球。

孙立国等采用一步法和改进的溶胶种子法成功地制备了粒径可控的二氧化硅亚微米微球^[75]。

溶胶种子法适用于制备较大粒径的微球，但对该法对反应条件较苛刻，操作条件不易控制，导致新核的形成，对制备粒径均一的二氧化硅微球有很大影响。

(5) 反相微乳液法

反相微乳液法是近几年发展起来的由表面活性剂、有机溶剂、助表面活性剂、水组成的油包水型微乳液制备二氧化硅微球的方法。在反应体系中，被表面活性剂包围的水相是一个独立的“微反应器”，TEOS 在碱性条件下就会在“微反应器”中水解，通过丙酮或无水乙醇进行破乳获得的沉淀即为二氧化硅微球^[76]。由于二氧化硅微球的粒径小，表面有大量羟基，因此极易发生团聚。为制备出单分散的二氧化硅微球，可通过化学方法对其表面改性。偶联剂是二氧化硅表面改性的常用试剂之一，以硅烷偶联剂 KH-550 为例，硅烷偶联剂 KH-550 水解出的氨基可与二氧化硅微球表面的硅羟基脱水缩合，偶联剂上的氨基即结合到微球表面，微球表面电位发生改变进而引起微球间的作用力增大，从而使微球分散形成单个微球。

微球的形成主要分为两步：①水解反应。此过程正硅酸酯被碱水解成硅酸单体。②聚合反应。水解后的硅酸单体通过硅氧键聚合成球^[77]。

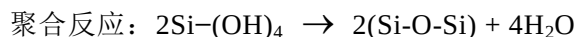
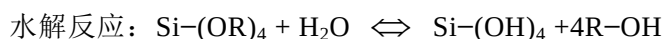


图 1-1 硅酸酯水解、聚合反应方程式

Fig.1-1 The hydrolysis and polymerization of silica acid ester

He 等使用水/环己烷/ TritonX-100/正己醇/水溶性染料制备了彩色二氧化硅微粒，由氨水的浓度控制 TEOS 的水解速度，制备的微球粒径为 28.4 nm^[78]。范艳玲等采用反相微乳液法制备二氧化硅粒子，探讨了[n(水): n(表面活性剂)]（用 R 表示）和[n(水): n(TEOS)]（用 H 表示）对二氧化硅粒子粒径的影响，结果表明，粒径随着 R 和 H 的增大而增大^[79]。张敬辉等采用反向微乳液法制备了二氧化硅颗粒，探索了表面活性剂的种类、浓度以及反应时间对二氧化硅颗粒粒径及形貌的影响^[80]。

反相微乳液法有以下三大优点：①可通过调整反应参数，获得不同粒径的微球；②由于其体系中含有偶联剂，不易出现团聚沉降现象，有利于制备单分散的微球；③微球表面可被一些有机基团所取代，从而可制备具有某些功能的微球。

1.4.3 二氧化硅微球的应用

近年来，关于二氧化硅微球的研究越来越多，二氧化硅微球在化工、材料、医学、生物等领域的应用受到了广泛关注。

Lu 等研究了多孔二氧化硅纳米颗粒在小鼠异种移植中的应用，将其作为一种药物递呈媒介，传递抗肿瘤药物以抑制肿瘤的生长^[81]。王刚制备了荧光二氧化硅微球，并用其检测生物体内的次氯酸根，为其在生理学和病理学的研究提供了新的方法^[82]。薛蕾通过化学修饰将十八烷基三氯硅烷修饰到二氧化硅微球表面，并将其应用于液相色谱技术中^[83]。Zhao 等使用流式光学系统，将 O157:H7 抗体与荧光纳米颗粒相结合，建立了一种快速检测大肠杆菌 O157:H7 的方法^[84]。

1.5 研究目的与意义

ETEC 是引起幼畜（犊牛、羔羊、仔猪）腹泻的主要病原菌，常引起新生家畜水样腹泻、脱水，甚至死亡，发病率和死亡率均很高，给家畜养殖业造成了严重损失。菌毛是 ETEC 主要毒力因子之一，常见于产 LT 和 ST 的 ETEC。目前，检测大肠杆菌菌毛的常用快速方法有 PCR、玻片凝集试验等，但 PCR 检测需要特殊仪器设备，仅限于在实验室使用。玻片凝集试验具有快速、简便等特点，一直是大肠杆菌菌毛血清型鉴定的主要方法，但国内所使用的单因子血清来源较少，价格昂贵，且凝集颗粒无明显颜色，不同检测者的判定结果可能出现差异。因此，制备大肠杆菌菌毛单因子血清，并在此基础上建立一种快速、简便、特异、敏感的菌毛检测方法，对幼畜大肠杆菌性腹泻的诊断和防治具有重要的意义。

本研究旨在通过提取 ETEC 菌毛 K88ab、K99、987p 和 F41，免疫新西兰白兔制备单因子血清；以彩色二氧化硅微球为载体将单因子血清修饰到微球表面，制备免疫彩色二氧化硅微球，建立一种快速、简便、特异、敏感的新型间接凝集技术用于 K88ab、K99、987p 和 F41

菌毛的快速检测。该研究不仅可以为大肠杆菌菌毛研究提供特异的单因子血清，还可为幼畜大肠杆菌腹泻的诊断与防治提供一种新型检测方法。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌株与实验动物

E.coli 参考菌株 C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)菌株购自中国兽医药品监察所；大肠杆菌 O142(F41⁺)是由东北农业大学动物医学学院兽医传染病学教研室（以下称本实验室）保存的菌株；DN69-A(ler⁺,eaeA⁺,hlyA⁺)、DN89-B(stx1⁺,ler⁺,irp2⁺,hlyA⁺,EAST1⁺)、DN1502(LT-II⁺,F17)由本实验室从腹泻犊牛粪便中分离鉴定；绿脓杆菌(SD004)由本实验室从貂肺脏分离鉴定；参考菌株猪丹毒杆菌(CVCC124)、巴氏杆菌(CVCC430)、猪霍乱沙门氏菌(CVCC503)由东北农业大学动物医学学院药理与毒理学教研室张秀英教授提供。

新西兰白兔购自辽宁长生生物技术有限公司。

2.1.2 PCR 引物

参照文献[85]中 K88、K99、987p 和 F41 菌毛的鉴定引物序列，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列见表 2-1。

表 2-1 PCR 引物
Tab. 2-1 Primer sequences of PCR

引物名称	上、下游引物	引物序列	片段大小	参考文献
Primer	Upstream primer	Sequence(5'-3')	Size(bp)	Reference
	Downstream primer			
K88	K88-F	GATGAAAAAGACTCTGATTGCA	841	Cheng et al. (2006)
	K88-R	GATTGCTACGTTTCAGCGGAGCG		
K99	K99-F	CTGAAAAAAACACTGCTAGCTATT	543	
	K99-R	CATATAAGTGACTAAGAAGGATGC		
987p	987p-F	GTTACTGCCAGTCTATGCCAAGTG	463	
	987p-R	TCGGTGTACCTGCTGAACGAATAG		
F41	F41-F	GATGAAAAAGACTCTGATTGCA	682	
	F41-R	TCTGAGGTCATCCCAATTGTGG		

2.1.3 主要试剂

Tran2K Plus DNA marker、Easy Taq 聚合酶，dNTPs 购自全式金生物公司；蛋白分子质量标准（Weight Marker Protein Molecular）购自 Thermo 公司；环己烷购自天津博迪化工股

份有限公司；正己醇、正硅酸乙酯(Tetraethyl orthosilicate, TEOS)购自天津光复精细化工研究所；Triton X-100 购自北京欣华绿源科技有限公司；N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF)、硅烷偶联剂 KH-550 购自北京博奥拓达科技有限公司；丙酮购自北京化工厂；3-[2-(2-氨基乙基氨基)乙基氨基]丙基-三甲氧基硅烷(3-[2-(2-Aminoethylamino)ethylamino]propyl-Trimethoxysilane, APTE)购自北京百灵威科技有限公司；96 孔聚苯乙烯反应板购自 JET 公司；免疫佐剂 QuickAntibody-Rabbit8W 购自北京博奥龙免疫技术有限公司；吗啉乙磺酸缓冲液(MES)、琥珀酸酐、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1-(3-Dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimide-hydrochloride, DEHE)、N-羟基琥珀酰亚胺购自北京索莱宝科技有限公司。

2.1.4 仪器设备

透射电子显微镜：H-7650，日本日立公司；
 场发射扫描电镜：S-4800，日本日立公司；
 小型台式离心机：1-14，美国 SIGMA 公司；
 生物安全柜：Thermo Fish 1300，北京诚茂兴业科技发展有限公司；
 凝胶成像系统：Alphamager TM2200 型，美国阿尔法科技公司；
 制冰机：HZB-12/A，HICON 惠康；
 超声破碎仪：XO-650D，南京先欧仪器制造有限公司；
 自动酶标检测仪：ELx808，美国伯腾仪器有限公司；
 核酸电源仪：DYCP-31BN，北京六一仪器厂；
 蛋白电泳仪：DYCP-24BN，北京六一仪器厂；
 电泳仪电源：Savant PS4000 型，LINE VOLTAGE 公司；
 PCR 仪：GeneAmp PCR System 9700，美国应用生物系统公司。

2.2 方法

2.2.1 四种菌毛的 PCR 鉴定

(1) K88 的鉴定 以 ETEC C83903(K88ab⁺)菌液为模板，K88ab-F/K88ab-R 为引物进行扩增。反应体系(25 μ L)如下：

10 $\times$ PS Buffer	2.5 μ L
dNTP	2.0 μ L
K88ab-F	1.0 μ L
K88ab-R	1.0 μ L
菌液	2.0 μ L
Easy Taq 聚合酶	0.5 μ L
ddH ₂ O	16 μ L

反应条件：95℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，54℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，30 个循环后 72℃延伸 7 min。

(2) K99 的鉴定 以 ETEC C83529(K99⁺)菌液为模板，K99-F/K99 为引物进行扩增。反应体系 (25 μL) 如下：

10×PS Buffer	2.5 μL
dNTP	2.0 μL
K99-F	1.0 μL
K99-R	1.0 μL
菌液	2.0 μL
Easy Taq 聚合酶	0.5 μL
ddH ₂ O	16 μL

反应条件：95℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，51℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，30 个循环后 72℃延伸 7 min。

(3) 987p 的鉴定 以 ETEC C83915(987p⁺)菌液为模板，987p-F/987p-R 为引物进行扩增。反应体系 (25 μL) 如下：

10×PS Buffer	2.5 μL
dNTP	2.0 μL
987p-F	1.0 μL
987p-R	1.0 μL
菌液	2.0 μL
Easy Taq 聚合酶	0.5 μL
ddH ₂ O	16 μL

反应条件：95℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，30 个循环后 72℃延伸 7 min。

(4) F41 的鉴定 以 ETEC O142(F41⁺)菌液为模板，F41-F/F41-R 为引物进行扩增。反应体系 (25 μL) 如下：

10×PS Buffer	2.5 μL
dNTP	2.0 μL
F41-F	1.0 μL
F41-R	1.0 μL
菌液	2.0 μL
Easy Taq 聚合酶	0.5 μL
ddH ₂ O	16 μL

反应条件：95℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，52℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，30 个循环后 72℃延伸 7 min。

2.2.2 电镜观察

将 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)和 O142(F41⁺)分别划线于麦康凯平板, 37℃培养 18 h, 分别挑取 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、O142(F41⁺)单菌落接种于改良 Minca 液体培养基, 挑取 ETEC C83915(987p⁺)单菌落接种于胰酪胨大豆肉汤培养基, 37℃静置培养 24 h, 连续传代 2 次, 取第 3 代培养物电镜观察菌毛的生长状况。具体操作如下: 将细菌稀释液滴到有膜的铜网上, 放置 10 min, 用滤纸吸去多余的液体, 滴加负染液, 染色 1~2 min 后用滤纸吸去多余负染液, 待晾干后置于透射电子显微镜下进行观察。

2.2.3 大肠杆菌生长曲线的测定

将 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)和 O142(F41⁺)接种至 3 ml 改良 Minca 液体培养基, ETEC C83915(987p⁺)接种至 3 ml 胰酪胨大豆肉汤培养基, 每株菌接种 13 管, 37℃静置培养, 分别于 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h 时取出, 用生理盐水倍比稀释后涂布于 LB 固体培养基, 采用平板计数法进行活菌计数。

2.2.4 大肠杆菌菌毛的提取

K88ab 菌毛的提取: 将 ETEC C83903(K88ab⁺)接种于改良 Minca 液体培养基, 37℃静置培养 18 h, 连续传代 2 次, 取第 3 代菌液涂布于改良 Minca 固体培养基, 37℃静置培养 18 h, 用 2 M 尿素 PBS 洗下菌苔, 5000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 2 M 尿素 PBS 重悬菌体, 于 62℃水浴振荡 30 min, 以脱去菌毛, 8000 r/min 离心 15 min, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤以除去菌体, 向滤液中加入硫酸铵至终浓度为 30%, 振荡混匀, 4℃静置过夜, 使 K88ab 菌毛沉淀, 8000 r/min 离心 40 min, 菌毛用少量 PBS 悬起, 透析除去残留的硫酸铵, -20℃保存备用。

K99 菌毛的提取: 将 ETEC C83529(K99⁺)接种于改良 Minca 液体培养基, 37℃培养 18 h, 连续传代 2 次, 取第 3 代培养物涂布于改良 Minca 固体培养基, 37℃培养 18 h, 用 2 M 尿素 PBS 洗下菌苔, 5000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 2 M 尿素 PBS 重悬菌体, 于 60℃水浴振荡 30 min, 以脱去菌毛, 8000 r/min 离心 15 min, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤以除去菌体, 向滤液中加入硫酸铵至终浓度为 30%, 振荡混匀, 4℃静置过夜, 使 K99 菌毛沉淀, 8000 r/min 离心 40 min, 菌毛用少量 PBS 悬起, 透析除去残留的硫酸铵, -20℃保存备用。

987p 菌毛的提取: 将 ETEC C83915(987p⁺)接种于胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB), 37℃静置培养 18 h, 连续传代 2 次, 取第 3 代培养物涂布于胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA), 37℃培养 18 h, 用 2 M 尿素 PBS 洗下菌苔, 5000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 2 M 尿素 PBS 重悬菌体, 于 60℃水浴振荡 30 min, 以脱去菌毛, 8000 r/min 离心 15 min, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤以除去菌体, 向滤液中加入硫酸铵至终浓度为 30%, 振荡混匀, 4℃静置过夜, 使菌毛沉淀, 8000 r/min 离心 40 min, 菌毛用少量 PBS 悬起, 透析除去残留的硫酸铵, -20℃保存备用。

F41 菌毛的提取: 将 ETEC O142(F41⁺)接种于改良 Minca 液体培养基, 37℃培养 18 h, 连续传代 2 次, 取第 3 代培养物涂布于改良 Minca 固体培养基, 37℃静置培养 18 h, 用 2 M 尿素 PBS 洗下菌苔, 5000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 2 M 尿素 PBS 重悬菌体, 于 60℃水浴振荡 30 min, 以脱去菌毛, 8000 r/min 离心 15 min, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤以除去菌体, 向滤液中加入硫酸铵至终浓度为 30%, 振荡混匀, 4℃过夜, 使 F41 菌毛沉淀, 8000 r/min 离

心 40 min, 菌毛用少量 PBS 悬起, 透析除去残留的硫酸铵, -20℃ 保存备用。

2.2.5 SDS-PAGE 鉴定

分别提取四种菌毛进行 SDS-PAGE 电泳。ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)和 O142(F41⁺)分别涂布于相应固体培养基, 37℃ 培养 24 h, 2 M 尿素 PBS 洗下菌体, 通过热洗脱法、硫酸铵沉淀法获得菌毛沉淀, 用 1×PBS 悬起菌毛。取 20 μL 菌毛样品与等量 2×SDS 上样缓冲液混匀, 煮沸 10 min, 同时配制 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 取上清点样。

2.2.6 Western blot 鉴定

将菌毛蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后, Western blot 鉴定。具体步骤如下: 首先将菌毛蛋白凝胶、硝酸纤维素膜 (NC 膜) 和滤纸置于转印缓冲液中浸湿, 按照从下至上分别为滤纸、菌毛蛋白凝胶、NC 膜、滤纸的顺序置于转印仪上, 装好后连接电源, 50mA 转印 30min。转印结束后, 将 NC 膜用去离子水反复冲洗, 放在 5% 脱脂乳封闭液中 4℃ 封闭过夜。取出 NC 膜后, PBST 振荡洗涤 3 次, 每次 10min, 然后放入一抗 (单因子血清用 5% 脱脂乳 1:100 稀释) 中, 室温摇床振荡 2h。PBST 振荡洗涤 3 次, 每次 10min, 再将 NC 膜放到二抗 (辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 用 5% 脱脂乳 1:2000 稀释) 中, 室温摇床振荡 2h。PBST 振荡洗涤 3 次, 每次 10min, 最后用 4-氯-1-萘酚配制显色液, 将 NC 膜浸入显色液中避光显色, 出现条带后, 立即用去离子水冲洗 NC 膜, 终止反应。

2.2.7 抗血清的制备

2.2.7.1 免疫动物

取 50 μg 菌毛蛋白, 用 100 μL 生理盐水悬起, 与 100 μL QuickAntibody-Rabbit8W 佐剂混合乳化均匀, 于 2 kg 健康雌性新西兰白兔腿部肌肉注射。免疫后 21 d 和 42 d 按同样方式分别加强免疫, 注射部位同初次免疫。

2.2.7.2 抗血清的制备

第 3 次免疫后 14 d 无菌采集兔心血。将采集的兔子血液先置于 37℃ 3 h, 取出再放到 4℃ 静置过夜, 3000 r/min 10 min, 离心获得的上清即为抗血清, 小量分装, -20℃ 贮存备用。

2.2.8 抗血清效价的测定

2.2.8.1 玻片凝集试验

以 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)和 O142(F41⁺)四种菌液作为抗原, 调整菌液浓度为 10^9 CFU·mL⁻¹, 将对应的抗血清按 1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024 稀释。取 20 μL 4 种抗原分别与等量对应的不同稀释度抗血清滴加在洁净的玻

片上, 室温放置 3 min, 观察有无凝集现象。

2.2.8.2 间接 ELISA 方法检测血清效价

(1) ELISA 方法的建立 将 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)和 O142(F41⁺)四种菌液分别调整至 10^{11} CFU·mL⁻¹、 10^{10} CFU·mL⁻¹、 10^9 CFU·mL⁻¹ 包被聚苯乙烯反应板, 一抗为 1:100 稀释的对应兔的阳性、阴性血清, 二抗为 1:2000、1:5000、1:8000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 酶标仪测定每孔 OD_{450nm} 值, 确定最佳抗原包被量和二抗稀释度。

(2) 抗体效价的检测 用 pH 9.6 碳酸盐包被液稀释菌液, 包被到聚苯乙烯板上, 每孔 100 μ L, 4℃过夜; 弃掉孔中液体, PBST 洗板, 共洗 3 次, 每次 5 min; 5%脱脂乳 PBS 作为封闭液, 每孔 200 μ L, 4℃封闭 8 h; 弃封闭液, 洗板; 加入一抗(兔血清 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200, 5%脱脂乳 PBST 稀释), 每孔 100 μ L, 37℃孵育 1 h; 弃一抗, PBST 洗板; 加二抗(羊抗兔 IgG 最佳稀释度, 5%脱脂乳 PBST 稀释), 每孔 100 μ L, 37℃作用 1 h; 弃二抗, 洗板, 每孔加入 100 μ L TMB 显色液, 避光 10 min; 50 μ L 2 M 浓硫酸终止反应, 酶标仪测定各孔 OD_{450nm} 值, 以 P/N>2 的最高稀释度作为抗体效价。

2.2.9 单因子血清的制备

2.2.9.1 交叉反应

将 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)和 O142(F41⁺)菌液浓度调整为 10^9 CFU·mL⁻¹ 作为凝集原, 将对应抗血清分别按 1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512 稀释。采用常规的玻片凝集试验, 将不同稀释度的抗血清分别与其它三种菌液反应, 测其交叉反应的凝集价。

2.2.9.2 交叉抗体的吸收

分别取 100 μ L ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)和 O142(F41⁺)菌液涂布于改良 Minca 固体培养基, 取 100 μ L ETEC C83915(987p⁺)菌液涂布于胰酪胨大豆琼脂培养基, 培养 24 h 后, 用 PBS 洗下菌体, 每种菌按菌体压积分为两等份, 其中一份用 1%福尔马林溶液 37℃灭活 24 h, 期间振荡几次, 使菌体充分灭活, 备用。

将抗 K88ab 血清与等量与其有交叉凝集反应的活菌和灭活菌压积混匀, 置于 4℃条件下, 每隔 4 h 轻轻摇匀, 在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 分别取出 20 μ L 抗血清与等量相应菌液做玻片凝集试验, 根据凝集情况, 确定最适吸收时间。

同样, 将抗 K99、987p 和 F41 血清分别与等量与其有交叉凝集反应的活菌和灭活菌压积混匀, 置于 4℃条件下, 每隔 4 h 轻轻摇匀, 在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 分别取出 20 μ L 抗血清与等量相应菌液做玻片凝集试验, 根据凝集情况, 确定最适吸收时间。

2.2.9.3 单因子血清效价的检测

采用常规玻片凝集试验测定吸收后血清的效价。以 ETEC C83903(K88ab⁺)、

C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)和 O142(F41⁺)四种菌液作为抗原,将菌液浓度调整为 $10^9\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,对应的单因子血清稀释度分别为 1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024。取 20 μL 4 种抗原分别滴加在洁净的玻片上,然后取 20 μL 对应不同稀释度单因子血清与之反应,室温放置 3 min,观察有无凝集现象。

2.2.10 免疫彩色二氧化硅微球 (ICSN) 的制备

2.2.10.1 彩色二氧化硅微球的制备

采用反相微乳法制备彩色二氧化硅微球(CSN)^[78]。参照杨磊等^[62]优化的方法制备 CSN,具体操作如下:将 2 mL 正己醇、2 g Triton X-100 和 8 mL 环己烷振荡混匀,直至混合液澄清,向其中加入 400 μL 超纯水,形成稳定的油包水反相微乳体系,再向微乳液反应体系中加入 100 μL 反应前体 TEOS,振荡反应 30 min,使 TEOS 均匀分散,然后向体系中加入 100 μL 氨水以促进 TEOS 水解缩合形成微球。为使微球易于观察,分别向反应体系中加入有机活性染料活性大红、活性绿和活性藏青各 150 μL ;为消除微球之间的团聚,向体系中加入 20 μL 硅烷偶联剂 KH-550,形成单分散彩色二氧化硅微球。室温下反应 48 h 后加入 4 mL 丙酮破乳,5000 r/min 离心 5 min,收集沉淀 CSN,用超纯水将其悬起,4℃ 保存备用。

2.2.10.2 CSN 的形态观察

反复吹吸二氧化硅微球样品,使其均匀分散开,滴加到样品台上,自然干燥,通过场发射扫描电镜对其进行形态观察。

2.2.10.3 CSN 的活化

将合成后的 CSN 用超纯水反复清洗,用 20 mL 超纯水悬起 CSN 后超声 10 min (超声条件:超声 3 s,间歇 4 s),使微球均匀分散。向其中加入 1.4 mL 冰乙酸和 200 μL APTE,振荡搅拌 1 h。离心、清洗反应后的微球,并将其分散到 2 g 琥珀酸酐和 8 mL DMF 的混合液中,向容器中通氮气振荡反应 5 h,5000 r/min 离心 5 min,收集的微球用超纯水反复清洗,将微球置于 4℃ 保存备用。

2.2.10.4 ICSN 的制备

配制吗啉乙磺酸缓冲液(MES, pH 6.8, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$),将 0.5 g N-羟基琥珀酰亚胺和 0.5 g DEHE 溶解于 5 mL MES 缓冲液,将微球分散至其中,使微球表面基团活化,室温静置 1 h。5000 r/min 离心 5 min,得到的微球分散到 10 mL PBS (pH 7.4, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中,加入 10 μL 菌毛单因子血清,室温孵育 4 h,用 PBS 清洗、离心后获得 ICSN,用 5 mL PBS 悬起,4℃ 保存备用。

2.2.11 不同颜色微球的凝集试验

制备三种不同颜色的 K88ab、K99、987p 和 F41 ICSN,各取 20 μL 分别与等量相应抗原滴加在玻片上,混匀,在 1 min 内观察凝集现象,将生理盐水设为对照,所有凝集试验均在

室温下进行。

2.2.12 特异性试验

取 20 μL K88ab ICSN 分别与等量相同浓度的 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)、O142(F41⁺)、大肠杆菌 DN69-A、大肠杆菌 DN89-B、绿脓杆菌、猪丹毒杆菌、沙门氏菌和巴氏杆菌同时做凝集试验,将生理盐水设为对照,观察试验结果,测定其特异性。

取 20 μL K99 ICSN 分别与等量相同浓度的 ETEC C83529(K99⁺)、C83903(K88ab⁺)、C83915(987p⁺)、O142(F41⁺)、大肠杆菌 DN69-A、大肠杆菌 DN89-B、绿脓杆菌、猪丹毒杆菌、沙门氏菌和巴氏杆菌同时做凝集试验,将生理盐水设为对照,观察凝集现象,测定其特异性。

取 20 μL 987p ICSN 分别与等量相同浓度的 ETEC C83915(987p⁺)、C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、O142(F41⁺)、大肠杆菌 DN69-A、大肠杆菌 DN89-B、绿脓杆菌、猪丹毒杆菌、沙门氏菌和巴氏杆菌同时做凝集试验,将生理盐水设为对照,观察凝集现象,测定其特异性。

取 20 μL F41 ICSN 分别与等量相同浓度的 ETEC O142(F41⁺)、C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)、大肠杆菌 DN69-A、大肠杆菌 DN89-B、绿脓杆菌、猪丹毒杆菌、沙门氏菌和巴氏杆菌同时做凝集试验,将生理盐水设为对照,观察凝集现象,测定其特异性。

2.2.13 菌毛 ICSN 凝集试验条件的优化

2.2.13.1 最适菌液与 ICSN 浓度的确定

将 K88ab ICSN 按 4 倍、8 倍、16 倍、32 倍稀释,将稀释液分别与 $10^9 \sim 10^1 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ETEC C83903(K88ab⁺)做凝集试验,根据凝集现象,确定菌液和 K88 ICSN 的最适浓度。

将 K99 ICSN 按 4 倍、8 倍、16 倍、32 倍稀释,将稀释液分别与 $10^9 \sim 10^1 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ETEC C83529(K99⁺)做凝集试验,根据凝集现象,确定菌液和 K99 ICSN 的最适浓度。

将 987p ICSN 按 4 倍、8 倍、16 倍、32 倍稀释,将稀释液分别与 $10^9 \sim 10^1 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ETEC C83915(987p⁺)做凝集试验,根据凝集现象,确定菌液和 987p ICSN 的最适浓度。

将 F41 ICSN 按 4 倍、8 倍、16 倍、32 倍稀释,将稀释液分别与 $10^9 \sim 10^1 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ETEC O142(F41⁺)做凝集试验,根据凝集现象,确定菌液和 F41 ICSN 的最适浓度。

2.2.13.2 最适反应温度的选择

将 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 稀释到最适浓度,分别与最适浓度的相应菌液在 4℃、25℃、37℃、60℃ 条件下做玻片凝集,根据凝集情况,确定反应的最适温度。

2.2.13.3 不同稀释液的凝集效果

取相同浓度的 C83903(K88ab⁺)菌液分成两份,其中一份用生理盐水洗涤两次后再用生理盐水重悬至原体积。取 K88ab 菌液与生理盐水洗涤的 K88ab 分别与 K88ab ICSN 进行玻片凝集试验,比较两种菌液的凝集效果。

用同样的方法处理 ETEC C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)、O142(F41⁺),再与相应的 ICSN

进行玻片凝集试验。

2.2.14 敏感性试验

在优化反应条件下,取 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 分别与浓度为 $10^9 \sim 10^3$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 的相应菌液进行凝集反应,观察凝集现象,确定菌液的最小检出量。

2.2.15 直接凝集与间接凝集效果的比较

取相同浓度的 ETEC C83903(K88ab $^{+}$)、C83529(K99 $^{+}$)、C83915(987p $^{+}$)、O142(F41 $^{+}$)菌液分别与相应抗血清和 ICSN 进行玻片凝集试验,比较抗血清和 ICSN 与相应菌液的凝集效果。

2.2.16 稳定性试验

将制备好的 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 在 4℃ 条件下保存 30 d,取出分别与相应菌液做凝集试验,观察凝集效果,测定其稳定性。

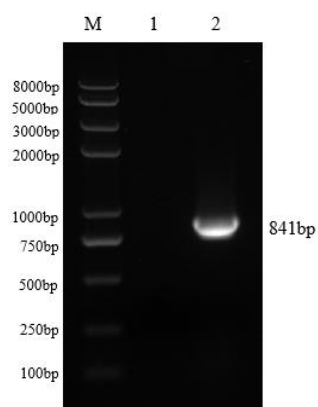
2.2.17 双盲样品检测

为证明新型凝集技术的有效性,使用本研究建立的 ICSN 检测方法进行随机双盲试验。首先将试验所需菌株 37℃ 培养 24 h,调整菌液浓度为 10^9 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 。选两名与本研究无关的硕士研究生,一名给 K88ab、K99、987p、F41 四种菌毛 ICSN 随机编号,另一名给 10 种待检菌随机编号。随机选取菌毛 ICSN 和菌液的号码,进行玻片凝集试验,观察凝集现象。

3 结果

3.1 四种菌毛的 PCR 鉴定

以 ETEC C83903(K88ab⁺)为模板, K88-F/K88-R 为引物扩增出一条 750 bp~1000 bp 之间的核酸片段, 与预期大小 (841 bp) 相符 (图 3-1)。



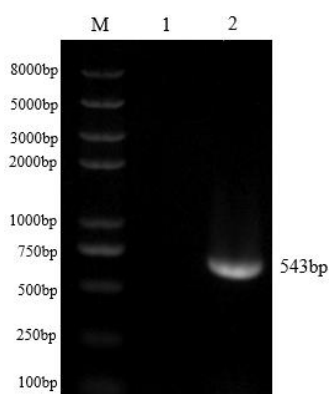
M. Trans2K Plus II DNA marker; 1.阴性对照; 2.K88ab 基因的 PCR 产物

M. Trans2K Plus II DNA marker; Line 1. Negative control; Line 2. PCR result of K88ab gene

图 3-1 K88ab 基因的 PCR 鉴定

Fig.3-1 Identification of K88ab gene by PCR

以 ETEC C83529(K99⁺)为模板, K99-F/K99-R 为引物, 在 500 bp~750 bp 之间靠近 500 bp 处扩增出一条核酸片段, 与预期大小 (543 bp) 相符 (图 3-2)。



M. Trans2K Plus II DNA marker; 1.阴性对照; 2.K99 基因的 PCR 产物

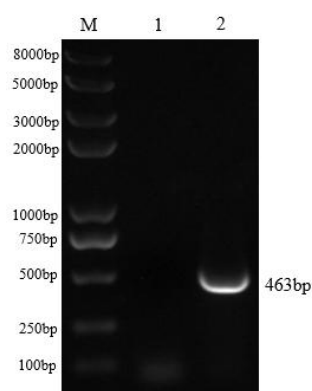
M. Trans2K Plus II DNA marker; Line 1. Negative control; Line 2. PCR result of K99 gene

图 3-2 K99 基因的 PCR 鉴定

Fig.3-2 Identification of K99 gene by PCR

以 ETEC C83915 (987p⁺)为模板, 987p-F/987p-R 为引物, 在 250 bp~500 bp 之间, 靠近

500 bp 处扩增出一条核酸片段，与预期大小（463 bp）相符（图 3-3）。



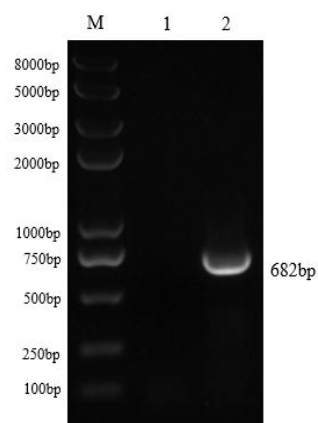
M. Trans2K Plus II DNA marker; 1.阴性对照; 2.987p 基因的 PCR 产物

M. Trans2K Plus II DNA marker; Line 1.Negative control; Line2. PCR result of 987p gene

图 3-3 987p 基因的 PCR 鉴定

Fig.3-3 Identification of 987p gene by PCR

以 ETEC O142(F41⁺)为模板，F41-F/F41-R 为引物扩增出一条 500 bp~750 bp 之间的核酸片段，与预期大小（682 bp）大小（图 3-4）。



M. Trans2K Plus II DNA marker; 1.阴性对照; 2.F41 基因的 PCR 产物

M. Trans2K Plus II DNA marker; Line 1. Negative control; Line 2. PCR result of F41 gene

图 3-4 F41 基因的 PCR 鉴定

Fig.3-4 Identification of F41 gene by PCR

3.2 电镜观察

将 ETEC C83903 (K88ab⁺)、C83529 (K99⁺)、和 O142 (F41⁺) 分别接种于改良 Minca 液体培养基，ETEC C83915 (987p⁺) 接种于胰酪胨大豆肉汤培养基，37℃ 静置培养 24 h，连续传代 2 次，取第 3 代培养物电镜观察，可以看到菌体周身有菌毛生长（图 3-5）。

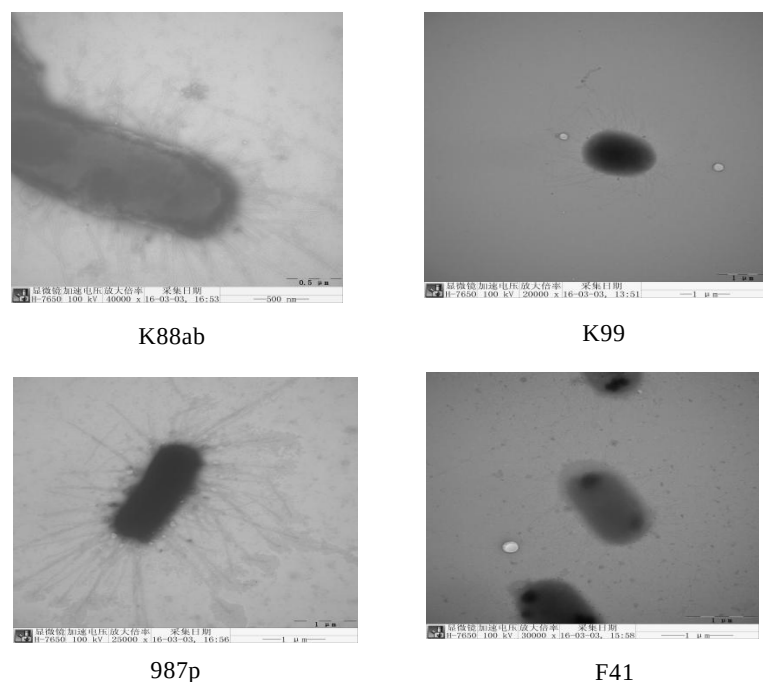


图 3-5 菌毛电镜观察

Fig.3-5 Observation of fimbriae by electron

3.3 K88ab、K99、987p、F41 生长曲线的测定

将 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)和 O142(F41⁺)接种至改良 Minca 液体培养基，ETEC C83915(987p⁺)接种至胰酪胨大豆肉汤培养基，37℃静置培养，定时取出培养液进行活菌计数，结果显示，ETEC C83903(K88ab⁺)生长至 14 h 时菌落数为 3.2×10^{15} CFU·mL⁻¹，直到 18 h 时菌落数达到峰值为 4.4×10^{16} CFU·mL⁻¹，期间菌数没有明显变化，在 20 h 时菌数有所下降，为 6.3×10^{15} CFU·mL⁻¹。ETEC C83529(K99⁺) 生长至 18h 时，菌落数达到峰值为 6.8×10^{16} CFU·mL⁻¹，到 20 h 时菌数没有显著变化，在 22 h 时菌数降为 1.1×10^{15} CFU·mL⁻¹。ETEC C83915(987p⁺)生长至 12 h 时菌数为 5.1×10^{13} CFU·mL⁻¹，直到 16 h 达到峰值，菌数为 8.0×10^{13} CFU·mL⁻¹，在 18 h 时开始下降，为 4.0×10^{13} CFU·mL⁻¹。ETEC O142(F41⁺)在 16 h 时菌落数为 1.5×10^{16} CFU·mL⁻¹，18 h 时达到峰值，为 8.0×10^{16} CFU·mL⁻¹，在 24 h 降至 1.68×10^{15} CFU·mL⁻¹（图 3-6）。

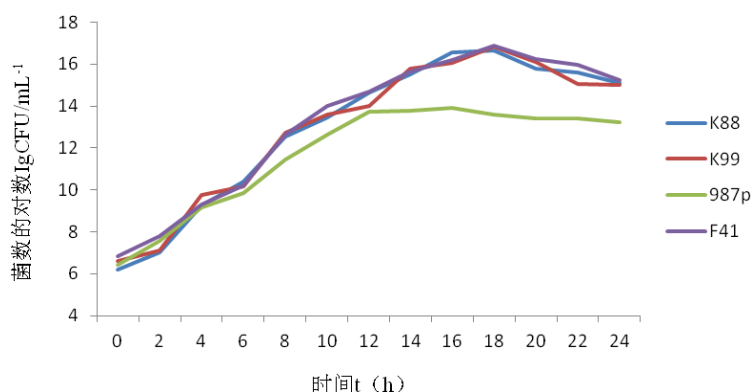
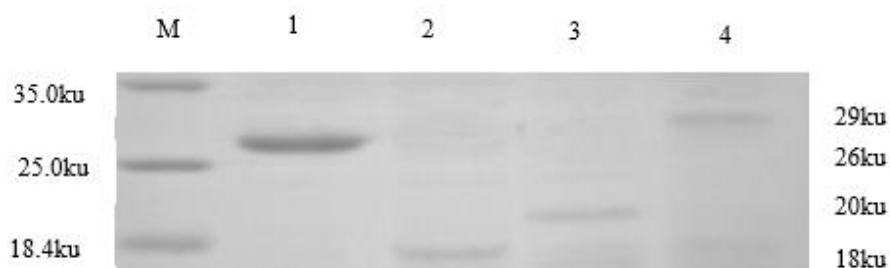


图 3-6 K88ab、K99、987p 和 F41 生长曲线

Fig.3-6 Growth curves of K88ab, K99, 987p and F41

3.4 SDS-PAGE 鉴定

用热洗脱法、硫酸铵沉淀法提取的菌毛与等量 $2\times$ SDS 上样缓冲液混匀，煮沸 10 min 后进行蛋白质电泳分析，结果显示，K88ab、K99、987p 和 F41 菌毛样品电泳后分别呈现明显的目的条带，与预期大小 26 ku、18 ku、20 ku 和 29 ku（图 3-7）。



M.蛋白标准分子质量; 1.K88ab; 2.K99; 3.987p; 4.F41

M. Molecular weight Marker; Line 1.K88ab; Line 2.K99; Line 3.987p;Line 4.F41

图 3-7 四种菌毛 SDS-PAGE 分析

Fig.3-7 The analysis of SDS-PAGE of four fimbriae

3.5 Western blot 鉴定

K88ab、K99、987p 和 F41 菌毛均能与相应菌毛单因子血清发生特异性反应。结果表明，四种菌毛蛋白得到表达，且具有抗原性（图 3-8）。



M. 蛋白标准分子质量; 1.K88ab; 2.K99; 3.987p; 4.F41

M. Molecular weight Marker; Line 1.K88ab; Line 2.K99; Line 3.987p; Line 4.F41

图 3-8 四种菌毛 Western blot 分析

Fig.3-8 The analysis of Western blot of four fimbriae

3.6 抗血清效价测定

3.6.1 玻片凝集试验

取制备的血清进行玻片凝集试验, K88ab、K99、987p、F41 四种血清的凝集价分别为 1:128、1:256、1:64、1:4096。

3.6.2 间接 ELISA 检测抗体效价

将阳性血清 OD_{450nm} 为 1.0、阴性血清 OD_{450nm} 最小时的抗原浓度和酶标二抗稀释浓度作为最佳工作浓度。根据检测结果确定, ETEC C83903(K88ab⁺)的包被浓度为 10^{11} CFU·mL⁻¹, 酶标二抗稀释度为 1:5000; ETEC C83529(K99⁺)的包被浓度为 10^{10} CFU·mL⁻¹, 酶标二抗稀释度为 1:5000; ETEC C83915(987p⁺)的包被浓度为 10^{10} CFU·mL⁻¹, 酶标二抗稀释度为 1:8000; ETEC O142(F41⁺)的包被浓度为 10^{11} CFU·mL⁻¹, 酶标二抗稀释度为 1:5000。

用所建立的 ELISA 方法对抗 K88ab、K99、987p、F41 血清进行了测定, 结果显示, 抗 K88ab 血清效价为 1:51200, 抗 K99 血清效价为 1:25600, 抗 987p 血清效价为 1:12800, 抗 F41 血清效价为 1:25600 (表 3-1)。

3.7 单因子血清的制备

3.7.1 交叉凝集反应

K88ab、K99、987p、F41 四种抗血清分别与 4 株菌做交叉凝集试验, 结果显示, K88ab 血清与 ETEC C83529(K99⁺)有交叉凝集反应, K99、987p 和 F41 3 种血清与 ETEC C83903(K88ab⁺)均有不同程度的交叉凝集反应。4 种抗血清和 4 株菌的交叉凝集价结果见表 3-2。

表 3-1 抗 K88ab、K99、987p 和 F41 血清的效价
Tab.3-1 The titers of K88ab, K99, 987p and F41 antiserum

血清稀释度 Dilute multiple of serum	抗原包被浓度(CFU·mL ⁻¹) Concentration of antigen							
	K88ab 菌液 (10 ¹¹) K88ab bacterium(10 ¹¹)		K99 菌液 (10 ¹⁰) K99 bacterium(10 ¹⁰)		987p 菌液 (10 ¹⁰) 987p bacterium(10 ¹⁰)		F41 菌液 (10 ¹¹) F41 bacterium(10 ¹¹)	
	+	-	+	-	+	-	+	-
1:100	4.172	0.732	3.114	0.392	2.874	0.45	2.126	0.474
1:200	4.003	0.462	2.963	0.257	2.336	0.292	1.875	0.28
1:400	3.292	0.285	2.394	0.182	1.95	0.178	1.705	0.204
1:800	2.551	0.196	2.005	0.137	1.502	0.133	1.456	0.155
1:1600	1.96	0.149	1.529	0.121	0.633	0.108	0.966	0.12
1:3200	1.304	0.115	0.595	0.109	0.584	0.093	0.758	0.107
1:6400	0.845	0.097	0.351	0.108	0.376	0.086	0.548	0.106
1:12800	0.554	0.094	0.307	0.1	0.181	0.085	0.39	0.088
1:25600	0.345	0.082	0.198	0.098	0.143	0.078	0.177	0.087
1:51200	0.236	0.078	0.14	0.093	0.109	0.077	0.135	0.084

表 3-2 抗血清与其他菌液的交叉反应结果
Tab.3-2 The cross-reaction between anti-serum and the other strains

菌株	血清			
	K88ab	K99	987p	F41
C83903(K88ab ⁺)	1:128	1:8	1:16	1:16
C83529(K99 ⁺)	1:32	1:256	-	-
C83915(987p ⁺)	-	-	1:64	-
C83922(F41 ⁺)	-	-	-	1:4096

3.7.2 交叉抗体的吸收

通过对不同时间交叉吸收后的抗体检测,结果显示,活菌吸收 48 h 后的血清中交叉凝集抗体吸收完全,不再与原先有交叉凝集的菌液有交叉凝集反应。而灭活菌对交叉凝集抗体的吸收效果不好,始终不能完全吸收交叉凝集抗体。

经过交叉抗体吸收获得的 K88ab 单因子血清、K99 单因子血清、987p 单因子血清和 F41 单因子血清分别只与 C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)和 O142(F41⁺)发生特异性凝集反应,与其他菌不发生凝集反应。

3.7.3 单因子血清效价检测

交叉抗体被吸收后，K88ab、K99、987p 和 F41 单因子血清的凝集价用玻片凝集试验进行了检测，结果显示其凝集价分别为 1:64、1:128、1:32、1:1024，与吸收前的效价相比，K88、K99 和 987p 均降低 1 个稀释度，F41 下降了 2 个稀释度。

3.8 CSN 形态观察

通过反相微乳液法制备的 CSN 经扫描电镜观察可见，微球形状规则、大小均一，直径约 500 nm，但微球的分散度不好，有许多微球聚集在一起（图 3-9）。

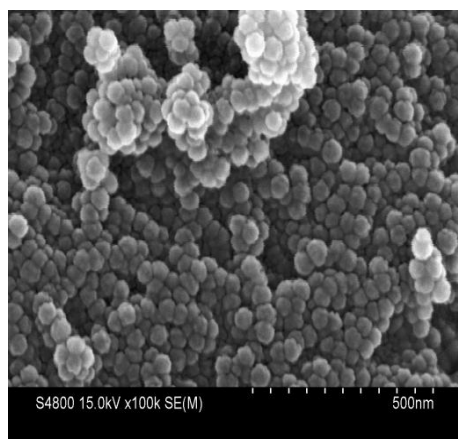
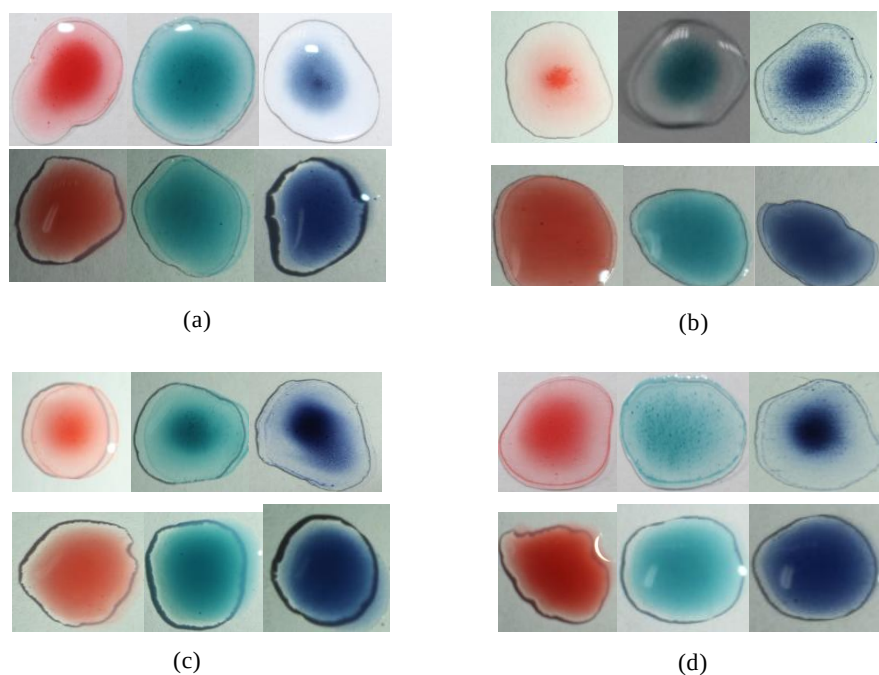


图 3-9 CSN 扫描电镜图

Fig.3-9 The SEM image of CSN

3.9 不同颜色微球凝集试验

本研究用红、绿、藏青三种颜色制备了 K88ab、K99、987p、F41 ICSN，与相应菌株进行了玻片凝集试验，结果显示，三种颜色的 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 均能与对应菌体发生凝集反应，在 1 min 内出现明显的絮状或颗粒状凝集现象。发生特异性凝集后，玻片上出现明显的凝集颗粒或在混合液中央呈絮状聚集，周边颜色变浅或透明。没有发生凝集的混合液颜色均一，无颗粒或中央聚集现象。肉眼观察发现藏青 ICSN 比红、绿 ICSN 更易观察凝集现象，周边液体澄清，凝集颗粒明显（图 3-10）。



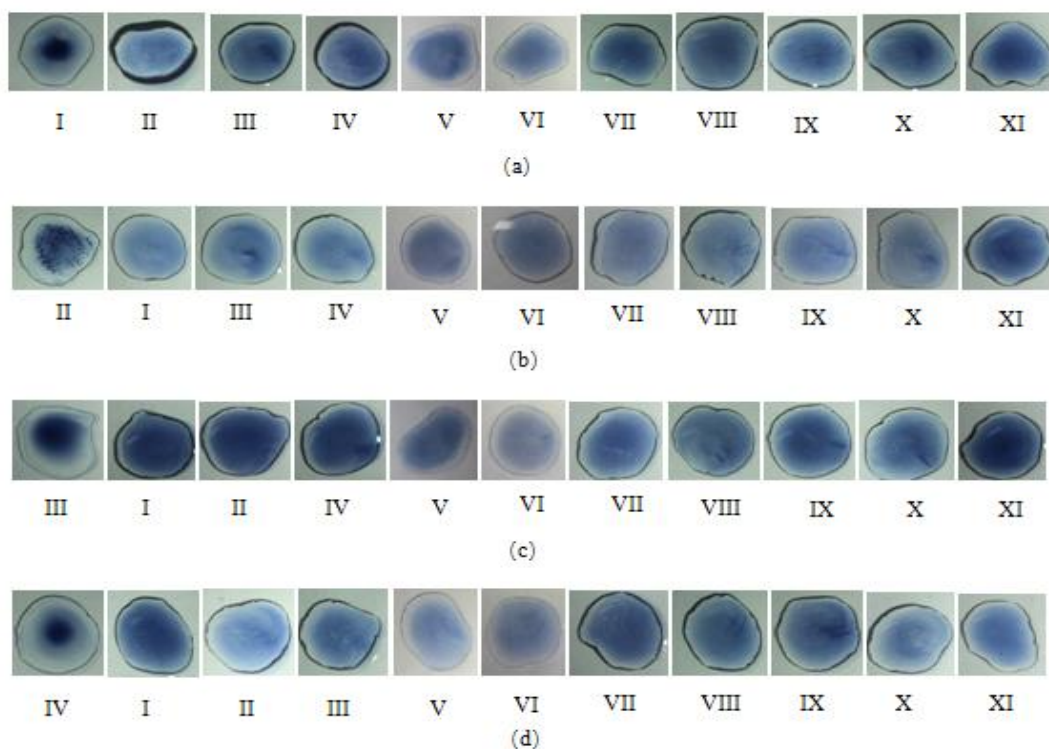
(a)K88ab ICSN 与 C83903(K88ab+)的凝集试验;(b)K99 ICSN 与 C83529(K99+)的凝集试验;
(c)987p ICSN 与 C83915(987p+)的凝集试验;(d)F41 ICSN 与 O142(F41+)的凝集试验;生理盐水为阴性对照
(a)The agglutination test of K88ab ICSN and C83903(K88ab+);(b) The agglutination test of K99 ICSN and C83529(K99+);(c) The agglutination test of 987p ICSN and C83915(987p+);(d) The agglutination test of F41 ICSN and O142(F41+);Physiological saline is negative control

图 3-10 三种颜色 ICSN 分别与菌毛的凝集试验

Fig.3-10 The agglutination test between three kinds of ICSN and fimbriae

3.10 特异性试验

分别用 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 与 ETEC C83903(K88ab⁺)、C83529(K99⁺)、C83915(987p⁺)、O142(F41⁺)、大肠杆菌 DN69-A、大肠杆菌 DN89-B、绿脓杆菌(SD004)、猪丹毒杆菌(CVCC124)、猪霍乱沙门氏菌(CVCC503)、巴氏杆菌(CVCC430)中其他菌株进行凝集试验,结果显示,K88ab、K99、987p、F41 ICSN 只与对应的菌株发生凝集反应出现凝集现象,与其他菌株混合后均不出现凝集现象(图 3-11)。



I.C83903(K88ab⁺); II.C83529(K99⁺); III.C83915(987p⁺); IV.O142(F41⁺);V.DN69-A; VI.DN89-B; VII.绿脓杆菌;
VIII.猪丹毒杆菌; IX.猪霍乱沙门氏菌;X.巴氏杆菌; XI 生理盐水

I. C83903(K88ab⁺); II. C83529(K99⁺); III. C83915(987p⁺); IV. O142(F41⁺); V.DN69-A; VI.DN89-B;
VII. *Pseudomonas aeruginosa*; VIII. *Bacillus erysipelatos-suis*; IX. *salmonella suipestifer*; X. *Pasteurella multocida*; XI. physiological saline

(a)K88ab ICSN 与 10 种菌液和生理盐水的凝集试验;(b)K99 ICSN 与 10 种菌液和生理盐水的凝集试验;(c)987p ICSN 与 10 种菌液和生理盐水的凝集试验;(d)F41 ICSN 与 10 种菌液和生理盐水的凝集试验

(a)The agglutination test of K88ab ICSN with ten different bacteria and physiological saline;

(b) The agglutination test of K99 ICSN with ten different bacteria and physiological saline;

(c) The agglutination test of 987p ICSN with ten different bacteria and physiological saline;

(d) The agglutination test of F41 ICSN with t different bacteria and physiological and saline;

图 3-11 特异性凝集试验结果

Fig.3-11 The results of specificity agglutination test

表 3-3 ICSN 特异性试验结果

Tab.3-3 The results of specificity test of CSN

ICSN 的类 型	抗原类型										
	C83903 (K88ab+)	C83529 (K99+)	C83915 (987p+)	O142 (F41+)	DN 69-A	DN 89-B	绿脓 杆菌	猪丹 毒杆 菌	沙门 氏菌	巴氏 杆菌	生理 盐水
K88ab	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K99	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
987p	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
F41	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-

3.11 凝集条件的优化

3.11.1 最适菌液与 ICSN 浓度的确定

取不同稀释度的 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 分别与不同稀释度的相应菌液做交叉凝集试验,结果显示,K88ab、K99、987p ICSN 8 倍稀释时可以与 10^6 CFU·mL⁻¹ 的相应菌液反应出现明显凝集现象,而与 10^5 CFU·mL⁻¹ 的相应菌液凝集现象不明显;F41 ICSN 8 倍稀释时可以与 10^7 CFU·mL⁻¹ 的 O142(F41⁺)反应出现明显凝集现象,而与 10^6 CFU·mL⁻¹ 的相应菌液凝集现象不明显(表 3-4)。结果表明,建立的新型凝集技术 ICSN 的使用量,相当于普通凝集试验的 1/500,节省了抗体的使用量,同时还不影响检测的敏感性。

表 3-4 玻片凝集方阵试验结果

Tab.3-4 The result of cross agglutination test of slide test

(a)										
K88ab ICSN	C83903(K88ab ⁺)抗原浓度 (CFU·mL ⁻¹)									阴性
稀释倍数	Concentration of C83903(K88ab ⁺) antigen									对照
Dilution of K88ab ICSN	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	Negative control
4	++++	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
8	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
16	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
32	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(转下页)

(接上页)

(b)										
K99 ICSN 稀 释倍数	C83529(K99 ⁺)抗原浓度 (CFU•mL ⁻¹) Concentration of C83529(K99 ⁺) antigen									阴性 对照
Dilution of K99 ICSN	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	Negative control
4	++++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-
8	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
16	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(c)										
987p ICSN 稀 释倍数	C83915(987p ⁺)抗原浓度 (CFU•mL ⁻¹) Concentration of C83915(987p ⁺) antigen									阴性 对照
Dilution of 987p ICSN	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	Negative control
4	++++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
8	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
16	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(d)										
F41 ICSN 稀 释倍数	O142(F41 ⁺)抗原浓度 (CFU•mL ⁻¹) Concentration of O142(F41 ⁺) antigen									阴性 对照
Dilution of F41 ICSN	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	Negative control
4	++++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
8	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
16	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
32	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

3.11.2 最适反应温度的确定

在不同温度下 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 与相应菌液进行凝集试验,结果显示,在 25℃和 37℃时的凝集效果最好,而 4℃和 60℃的凝集效果不明显(图 3-12)。因此,可选择在 25℃~37℃之间进行凝集试验。

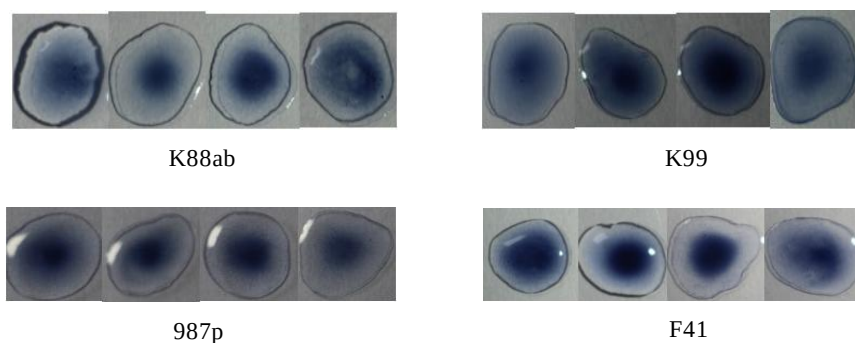


图 3-12 温度对凝集试验的影响

(从左至右分别为 4℃、25℃、37℃ 和 60℃)

Fig.3-12 The influence of different temperature on the agglutination
(the temperature from left to right are 4℃、25℃、37℃ and 60℃)

3.11.3 不同稀释液的凝集效果

用培养菌液和生理盐水洗涤再悬起的菌液与对应的 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 进行凝集试验，结果显示，生理盐水洗过的菌液与对应的 ICSN 凝集效果更好，絮状凝集清晰可见（图 3-13）。

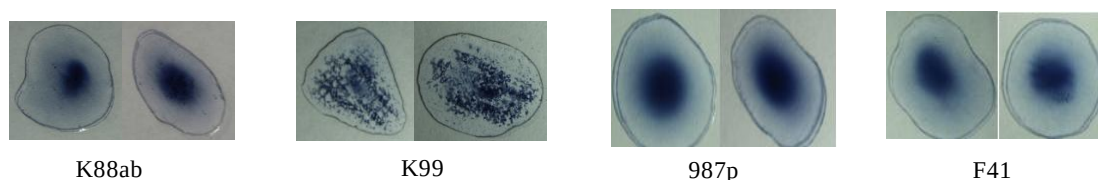


图 3-13 菌体稀释液对凝集的影响

(左边为培养基，右边为生理盐水)

Fig.3-13 The influence of bacterial diluent on the agglutination
(The left is culture medium, and the right is physiological saline)

3.12 敏感性试验

取 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 分别与对应的、不同稀释度的生理盐水菌悬液进行凝集试验，结果显示，当菌液浓度为 $1.0\sim 5.1\times 10^9\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，混合液呈絮状聚集，聚集在中央，周边液体透明，判定为“++++”；当菌液浓度为 $1.0\sim 5.1\times 10^8\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1.0\sim 5.1\times 10^7\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，混合液呈絮状凝集，聚集在中央，周边液体有少许浑浊，判定为“+++”；当菌液浓度为 $1.0\sim 5.1\times 10^6\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，混合液呈絮状凝集，聚集在中央，周边液体较浑浊，判定为“++”；当菌液浓度为 $10^5\sim 10^3\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，凝集现象不明显（图 3-14、表 3-4）。

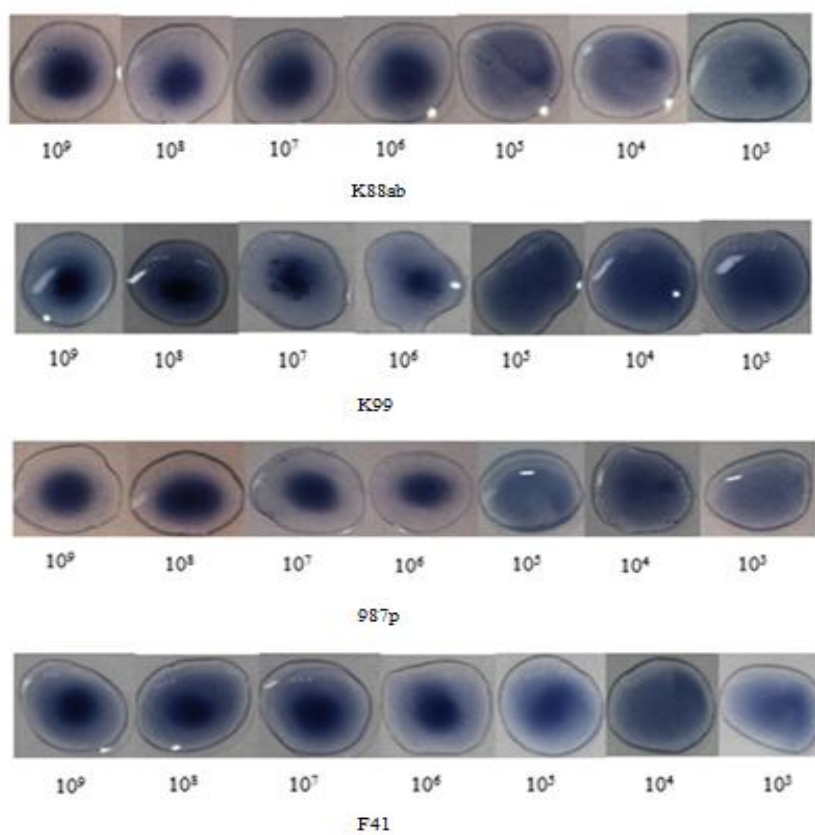


图 3-14 ICSN 与不同浓度抗原的凝集试验

Fig.3-14 The agglutination test between ICSN and antigen with different concentration

3.13 直接凝集与间接凝集效果的比较

分别取 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 和 K88ab、K99、987p、F41 单因子血清和对应菌液进行凝集，结果显示，ICSN 与菌液的凝集现象比单因子血清与对应菌液的凝集现象更加清晰可见（图 3-15）。

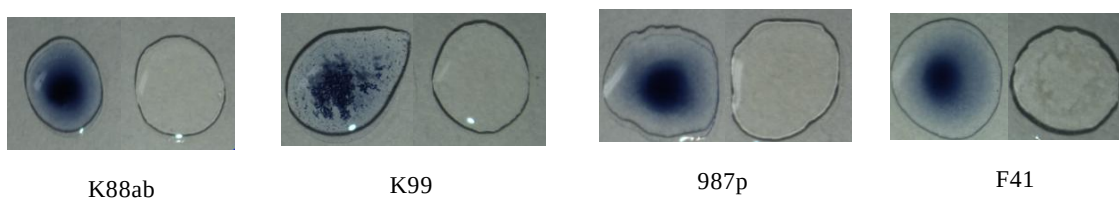


图 3-15 ICSN 和单因子血清与对应菌液的凝集结果

Fig.3-15 The results of ICSN and mono-specific binding to corresponding bacteria of the agglutination

表 3-5 ICSN 与不同浓度抗原的凝集试验的结果

Tab.3-5 The results of The agglutination test between ICSN and antigen with different concentration

(a)							
ICSN 类型		C83903(K88+)抗原浓度 (CFU·mL ⁻¹)					
The type of ICSN		Concentration of C83903(K88+) antigen					
		10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
K88ab		++++	+++	++	++	+	-
(b)							
ICSN 类型		C83529(K99+)浓度 (CFU·mL ⁻¹)					
The type of ICSN		Concentration of C83529(K99+) antigen					
		10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
K99		++++	+++	++	++	+	-
(c)							
ICSN 类型		C83915(987p+)浓度 (CFU·mL ⁻¹)					
The type of ICSN		Concentration of C83915(987p+) antigen					
		10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
987p		++++	+++	++	++	+	-
(d)							
ICSN 类型		O142(F41+)浓度 (CFU·mL ⁻¹)					
The type of ICSN		Concentration of O142(F41+) antigen					
		10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
F41		++++	+++	++	++	+	-

3.14 稳定性试验

将 K88ab、K99、987p、F41 ICSN 置于 4℃ 保存 30 d，取出后与对应的菌液进行凝集试验，凝集效果与新制备 ICSN 无明显差异，说明 ICSN 的稳定性良好。

3.15 双盲样品检测

用已建立的新型凝集技术对双盲样品进行了检测，结果显示，K88ab ICSN、K99 ICSN、987p ICSN 和 F41 ICSN 分别与样品 3 (C83903)、样品 6 (C83529)、样品 8(C83915)和样品 2 (O142) 出现明显的凝集现象，与其他样品未出现凝集现象，符合率为 100%。

表 3-6 双盲样品检测结果

Tab.3-6 The results of detection of double-blind samples

样品编号 Number of samples	ICSN 种类 Kinds of ICSN				样品名称 Name of samples
	K88ab	K99	987p	F41	
1	-	-	-	-	大肠杆菌 C83903(K88ab ⁺)
2	-	-	-	+	大肠杆菌 C83529(K99 ⁺)
3	+	-	-	-	大肠杆菌 C83915(987p ⁺)
4	-	-	-	-	大肠杆菌 O142(F41 ⁺),
5	-	-	-	-	大肠杆菌 DN1502(LT- II ⁺ , F17 ⁺)
6	-	+	-	-	绿脓杆菌(SD004)
7	-	-	-	-	猪丹毒杆菌(CVCC124)
8	-	-	+	-	巴氏杆菌(CVCC430)
9	-	-	-	-	猪霍乱沙门氏菌(CVCC503)
10	-	-	-	-	生理盐水

4 讨论

4.1 菌毛的表达条件和提取技术的选择

菌毛的体外表达主要受传代次数、培养基种类及培养温度等因素的影响,而且这些因素直接影响菌毛的表达量。贾静等发现菌株传代在三次之内表达量最大,随着传代次数的增多,菌毛表达量下降^[86]。由于 K88、K99、987p 的遗传基因位于质粒上,细菌在多次传代的过程中可能会导致质粒的丢失,一旦质粒丢失,菌毛表达量就会减少甚至不表达,因而有可能不产生菌毛。F41 的遗传基因位于染色体上,但是其表达仍受基因的调控。菌毛的表达同时也受温度的影响,在 18℃ 以下不产生菌毛,在 37℃ 菌毛表达量最大,28℃ 以下能形成少量菌毛^[87]。培养基的种类直接影响菌毛的表达量,LB、营养肉汤、TSB、改良 Minca 均能生长菌毛,但产生量不同,出现时间也不同。K88、K99、F41 三种菌毛在改良 Minca 培养基中长势良好,987p 菌毛可在 TSB 中大量繁殖。

菌毛的提取方法主要有 60℃ 水浴振荡法、4℃ 组织捣碎法、4℃ 万能混合器混合法、4℃ 高速搅拌法、冰浴匀浆法。

崔玉东等应用热处理法对不同缓冲液提取的 K99 和 F41 菌毛进行比较研究,发现两种菌毛蛋白使用尿素缓冲液提取的蛋白量最大,而且简单易行、对条件要求不高^[88]。彭皎等将从猪场分离到的 ETEC 通过 PCR 鉴定含有 K88 和 987p 两种菌毛基因,采用热洗脱、硫酸铵沉淀法制备并纯化菌毛蛋白,免疫蛋鸡制备 IgY 的效价可达 1:64 000,表明纯化后的菌毛蛋白免疫原性较强^[21]。Curtis 等介绍了一种简单改进的纯化大肠杆菌菌毛的方法,重组大肠杆菌在剪切作用下除去细胞,采用离心、沉淀、离子交换和膜层析法纯化菌毛蛋白,应用该方法获得了两株 F5 型菌毛,菌毛大小与预期相符^[89]。

本研究采用 2 M 尿素磷酸盐缓冲液悬浮菌体,60℃ 水浴震荡、硫酸铵沉淀获得粗提菌毛,菌毛蛋白表达量较高,将其作为免疫原免疫新西兰白兔获得了效价理想的抗血清。

4.2 新型凝集技术的研究

目前,国内外在大肠杆菌菌毛或菌毛编码基因的检测中常用的实验技术主要有酶联免疫吸附试验^[40]、PCR^[48]、LAMP^[51]、免疫胶体金^[47]等,前三种方法需要操作者具备相应的实验技能或者需要特定的仪器设备,且耗时较长,后一种只能检测菌毛蛋白,不能直接检测菌体,因此,并不能对临床分离菌株的菌毛进行快速、简便、特异地检测。玻片凝集试验虽可直接对菌体进行快速检测,但由于菌株无明显颜色,在结果判定时可能因操作者不同而对较弱凝集或非特异性凝集产生误判。试管凝集试验耗时较长,而且单因子血清的使用量较多,本研究开始使用试管凝集试验检测菌毛抗血清的效价,但是凝集效果并不明显。

本研究在常规玻片凝集试验的基础上引入二氧化硅微球作为载体,通过化学交联法将单因子血清修饰到二氧化硅微球上获得 ICSN,ICSN 可与对应的菌体混合出现明显凝集现象。通过反应条件优化建立了检测大肠杆菌菌毛的新型凝集技术。该检测方法的敏感性较好,对

菌液的最低检出浓度为 $1.0 \sim 5.1 \times 10^6 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。细菌生长曲线测定结果显示, 常规条件下培养 4~6 h, 菌液浓度即可达到 $10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 完全满足该检测方法对菌液浓度的要求。

该检测方法中所用的 ICSN, 在制备过程中所用的单因子血清与 CSN 溶液的体积比为 1:500, 是常规玻片凝集试验中单因子血清用量的 1/500, 大大降低了检测成本。

4.3 有机活性染料

有机活性染料 (Organic reactive dyes, ORD), 又称为反应染料, 是一种分子中含有化学性活泼基团的水溶性染料, 可与氨基、羧基、羟基发生化学反应。自从 1956 年问世以来, 由于其具有色泽鲜艳、种类繁多、化学性质稳定、价格经济等优点, 现已取代很多传统染料, 广泛应用于各大行业。活性染料分子主要由母体染料和活性基团两个部分组成, 母体染料主要起着色作用, 赋予染料不同的颜色; 活性基团是与被染物直接结合的集团, 活性基团的不同、与不同的基团结合均会直接影响染料色工艺。

由于二氧化硅微球表面有大量的羟基, 容易被有机活性染料修饰, 因此微球被赋予了不同的颜色, 改善了以其作为凝集试验载体无色的缺点。

本研究将有机活性染料与二氧化硅微球结合, 制备了一种新型凝集试验载体, 建立新型凝集技术检测大肠杆菌菌毛。凝集试验结果通过肉眼即可观察, 而且具有快速、灵敏、经济、对实验设备要求低等优点, 在生物医药、兽医学、环境等领域都具有良好的应用前景。

4.4 二氧化硅微球的制备及其应用前景

自 1968 年 Stober 等首次合成出单分散二氧化硅以来, 二氧化硅微球的一些特殊性能及其在应用方面的研究一直是人们研究的热点。在微生物学中, 二氧化硅微球可广泛应用于病原体检测、标记疾病^[90]、药物缓释^[91]、生物传感器^[92]、催化剂载体^[93]、DNA 芯片^[94]等。

崔媛等利用二氧化硅纳米微球为模板制备能够装载 DNA 的微胶囊, 实验结果表明, 微胶囊是具有中空结构的球形胶囊, 分散性良好, 能够阻滞 DNA 并可以实现基因转染^[95]。Yu 等制备了两种颜色的二氧化硅微球, 通过玻片凝集试验用于同时检测阪崎肠杆菌和沙门氏菌, 检测敏感性可达到 $4 \times 10^3 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[96]。

本研究在制备 CSN 过程中遇到以下几种问题: (1) CSN 分散性不好, 尽管在制备时加入了能使微球分散的硅烷偶联剂 KH-550, 但扫描电镜结果显示的微球形态是团聚在一起的; (2) 微球在加入不同颜色活性染料后, 在活化时会出现浅颜色微球丢失的现象, 染料颜色越深, 制备出的微球效果越好; (3) 微球活化时 (通 N_2 前), 离心获得的沉淀不是颗粒状, 与抗体结合后不能与相应抗原发生凝集现象。正常制备出的微球静置一段时间后会分层现象, 下层为可见的彩色微球颗粒, 上层为无色透明液体。分析认为, CSN 分散性不好可能是由于硅烷偶联剂 KH-550 的加入量不足造成的, 陈磊等使用硅烷偶联剂对纳米 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 表面改性, 发现偶联剂质量分数为 4.5% 时, 分散效果最好。同时, 硅烷偶联剂还能辅助有机活性染料给微球染色。活性染料颜色对微球的影响尚不清楚。

随着科技的不断发展, 二氧化硅微球的制备方法会越来越多, 越来越稳定, 其应用领域也在相应扩大。但是, 目前二氧化硅微球的制备技术仍处在发展阶段, 还有很多问题尚需解

决。例如如何使二氧化硅微球能一直保持单分散状态，延长保存时间？如何更好的控制二氧化硅微球的粒径，使微球形貌保持不变？如何实现二氧化硅微球在实际应用中的大规模生产？很多研究人员为优化微球的制备方法，将几种传统的制备方法结合起来，取每种方法的优点，同时弃掉缺点，制备出形貌粒径适当、分散性良好的二氧化硅微球^[97]。随着研究人员对二氧化硅微球制备技术的不断探索，以上所述的问题都将会逐步解决。

5 结论

(1) 本研究在兔抗 K88ab、K99、987p 和 F41 血清基础上, 以 ETEC C83903(K88ab⁺)、ETEC C83529(K99⁺)、ETEC C83915(987p⁺)、ETEC 0142(F41⁺)为凝集原吸收血清中交叉抗体, 制备了 K88ab、K99、987p 和 F41 4 种单因子血清, 为 ETEC 菌毛研究提供了特异性试剂。

(2) 采用反相微乳液法制备了形状规则、性状稳定的二氧化硅微球, 为间接凝集技术提供了有应用前景的微载体。

(3) 利用 K88ab、K99、987p 和 F41 4 种单因子血清和彩色二氧化硅微球制备的 K88ab、K99、987p 和 F41 免疫彩色二氧化硅微球建立了一种检测大肠杆菌菌毛的新型凝集技术, 该方法在 1 min 内即可判定结果, 特异性良好, 对细菌培养液的最小检出量为 $10^6\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 彩色免疫二氧化硅微球在 4℃ 条件下保存 30 d 不影响凝集试验结果, 具有良好的稳定性。该技术可用于 ETEC 菌毛的临床和实验室检测。

致 谢

白驹过隙，日月穿梭，三年的研究生生活即将划上句号，在此期间我在学习上、生活上都有很多收获。值此论文完成之际，在此我想向那些曾经帮助我的人们表达我最真挚的谢意。

首先，我要感谢师东方教授，本研究是在师老师的悉心指导下完成的。老师严谨的学风、渊博的学识、豁达的心态、处事的原则深深的影响着我，让我受益匪浅，一直是我学习的榜样。在此我要对老师表达致以衷心的感谢。

感谢东北农业大学动物医学学院的李一经教授、王君伟教授、魏萍教授、宋铭忻教授、朱妍副教授、董秀梅老师、周晗老师和张萍老师对我无私的帮助和指导。

感谢东北农业大学动物医学学院刘文鑫师兄、关玮琨师兄、杜元策师兄、韩林林师兄、李金萍师姐、孟相秋师姐、袁超文师兄、唐杰师兄、周兴东师姐在实验和生活中对我的关心和照顾；感谢赵志腾、王宗莹、刘文娜、罗修鑫、李婷婷、陶婧、唐毓、苏瑞红、侯美佳等同学，一直在我身边支持鼓励我。

最后我要感谢我的家人，是他们一直默默支持着我，给我源源不断前进的动力，我会继续努力，一定不辜负他们的期望。

参考文献

- [1] Lorenz H. Theodor Escherich--a pediatrician and bacteriologist. Observations on the 100th anniversary of the discovery of the Bacterium coli commune[J]. Zeitschrift für die gesamte Hygiene und ihre Grenzgebiete, 1986, 32(10): 630.
- [2] Moonens K, Van den Broeck I, De Kerpel M, et al. Structural and Functional Insight into the Carbohydrate Receptor Binding of F4 Fimbriae-producing Enterotoxigenic Escherichia coli[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(13): 8409-8419.
- [3] Nataro J P, Kaper J B. Diarrheagenic escherichia coli[J]. Clinical microbiology reviews, 1998, 11(1): 142-201.
- [4] Flores-Abuxapqui J J, De Jesus Suarez-Hoil G, Puc-Franco M A, et al. Frequency of adhesive factors and entero-toxins in strains of Escherichia coli isolated from piglets with diarrhea[J]. REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA-MEXICO-, 1997, 39: 145-152.
- [5] 陈祥, 高崧, 王雷, 等. 华东地区致初生仔猪腹泻大肠杆菌的 O 血清型和毒力因子[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 96-100.
- [6] Guiné P A, Jansen W H. Behavior of Escherichia coli K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and hemagglutination[J]. Infection and Immunity, 1979, 23(3): 700-705.
- [7] Ørskov I, Ørskov F. Serology of Escherichia coli fimbriae[J]. Prog Allergy, 1983, 33: 80-105.
- [8] Mol O, Oudega B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in Escherichia coli[J]. FEMS microbiology reviews, 1996, 19(1): 25-52.
- [9] Oudega B, Graaf M, Boer L, et al. Detection and identification of FaeC as a minor component of K88 fibrillae of Escherichia coli[J]. Molecular microbiology, 1989, 3(5): 645-652.
- [10] Valent Q A, Zaal J, Graaf F K, et al. Subcellular localization and topology of the K88 usher FaeD in Escherichia coli[J]. Molecular microbiology, 1995, 16(6): 1243-1257.
- [11] Bakker D, Vader C E M, Roosendaal B, et al. Structure and function of periplasmic chaperone-like proteins involved in the biosynthesis of K88 and K99 fimbriae in enterotoxigenic Escherichia coli[J]. Molecular microbiology, 1991, 5(4): 875-886.
- [12] Bakker D, Willemsen P T, Willems R H, et al. Identification of minor fimbrial subunits involved in biosynthesis of K88 fimbriae[J]. Journal of bacteriology, 1992, 174(20): 6350-6358.
- [13] Bakker D, Willemsen P T J, Simons L H, et al. Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 fimbriae[J]. Molecular microbiology, 1992, 6(2): 247-255.
- [14] Payne D, O'Reilly M, Williamson D. The K88 fimbrial adhesin of enterotoxigenic Escherichia coli binds to beta 1-linked galactosyl residues in glycosphingolipids[J]. Infection and immunity, 1993, 61(9): 3673-3677.
- [15] Van Zijderveld F G, Anakotta J, Brouwers R A, et al. Epitope analysis of the F4 (K88)

- fimbrial antigen complex of enterotoxigenic *Escherichia coli* by using monoclonal antibodies[J]. *Infection and immunity*, 1990, 58(6): 1870-1878.
- [16] Payne D. A study of K88-mediated haemagglutination by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)[J]. *The new microbiologica*, 1994, 17(2): 99-110.
- [17] 羊扬, 厚华艳, 郁磊, 等. 大肠杆菌 K99 菌毛 *fliC* 操纵子的克隆, 表达及活性[J]. *微生物学报*, 2012, 52(012): 1524-1530.
- [18] Berger S, Karamanos Y, Schoentgen F, et al. Characterization and use of biotinylated *Escherichia coli* K99 lectin[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1994, 1206(2): 197-202.
- [19] Cao J, Khan A S, Bayer M E, et al. Ordered translocation of 987P fimbrial subunits through the outer membrane of *Escherichia coli*[J]. *Journal of bacteriology*, 1995, 177(13): 3704-3713.
- [20] Schifferli D M, Alrutz M A. Permissive linker insertion sites in the outer membrane protein of 987P fimbriae of *Escherichia coli*[J]. *Journal of bacteriology*, 1994, 176(4): 1099-1110.
- [21] 彭姣, 李职, 祁振强, 等. 共表达 K88/987p 菌毛产肠毒素性大肠杆菌的分离鉴定及其卵黄抗体的制备[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(2): 303-308.
- [22] 贺志良, 姜柯安, 宋方洲, 等. 产肠毒素大肠杆菌 987P 菌毛蛋白 *FasA* 亚单位的原核表达及其免疫原性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 9: 005.
- [23] Van Zijderveld F G, van Zijderveld-van Bommel A M, Bakker D. The F41 adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*: inhibition of adhesion by monoclonal antibodies[J]. *Veterinary quarterly*, 1998, 20(sup3): 73-78.
- [24] De Graaf F K, Roorda I. Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M[J]. *Infection and Immunity*, 1982, 36(2): 751-758.
- [25] Taxt A, Aasland R, Sommerfelt H, et al. Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* as a vaccine target[J]. *Infection and immunity*, 2010, 78(5): 1824-1831.
- [26] 王玉炯, 许崇波. 大肠杆菌耐热性肠毒素 (ST) 的分子生物学研究进展[J]. *宁夏大学学报: 自然科学版*, 2001, 22(3): 331-336.
- [27] Fairbrother J M, Nadeau É, Gyles C L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2005, 6(01): 17-39.
- [28] Kennedy D J, Greenberg R N, Dunn J A, et al. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets[J]. *Infection and immunity*, 1984, 46(3): 639-643.
- [29] 尤建嵩, 牛冬燕, 崔乃忠, 等. 大肠杆菌耐热肠毒素 b 及其致动物腹泻的机理[J]. *中国兽医科学*, 2006, 36(10): 847-851.
- [30] Qadri F, Svennerholm A M, Faruque A S G, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in

- developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention[J]. *Clinical microbiology reviews*, 2005, 18(3): 465-483.
- [31] Spicer EK, Kavanaugh WM, Dallas WS, et al. Sequence homologies between A subunits of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78(1): 50-54.
- [32] Guth BE, Pickett CL, Twiddy EM, et al. Production of type II heat-labile enterotoxin by *Escherichia coli* isolated from food and human feces[J]. *Infect Immun*, 1986, 54(2): 587-589.
- [33] Nardi AR, Salvadori MR, Coswig LT, et al. Type 2 heat-labile enterotoxin (LT-II)-producing *Escherichia coli* isolated from ostriches with diarrhea[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 105(3-4): 245-249.
- [34] 袁超文, 刘文鑫, 关玮琨, 等. 牛源产 II 型不耐热肠毒素大肠杆菌的分离鉴定及重组毒素制备[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, (08): 1336-1341.
- [35] Gill DM, Richardson SH. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin[J]. *J Infect Dis*, 1980, 141(1): 64-70.
- [36] Tochikubo K, Isaka M, Yasuda Y, et al. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin[J]. *Vaccine*, 1998, 16(2-3): 150-155.
- [37] PAM Guinée WHJ. Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea: current topics in veterinary and animal science[J]. 1981.
- [38] KW Mills KLT. Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for identification of K99-positive *Escherichia coli* isolates from calves[J]. *J Clin Microbiol*, 1984.
- [39] E Schneider HF, Pfister H. ELISA for the detection of K99 fimbrial antigen of enterotoxic *E. coli* in feces[J]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 1984, 126(12): 607-620.
- [40] Jäkel C. Development of a sandwich ELISA for detection of specific antibodies against fimbrial antigens K88, K99 and 987p of *Escherichia coli*[J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1995, 108(6): 221-223.
- [41] F Hernández MC, Rivera P. Mannose-resistant hemagglutination, enzyme-linked immunosorbent assay, and immune electron microscopy for detection of K99 fimbrial antigen in *Escherichia coli* ...[J]. 1989.
- [42] 房海. 应用琼脂双相双扩散法鉴定大肠杆菌菌毛抗原[J]. *中国兽医科技*, 1992, (03): 29-30.
- [43] 周碧君, 王开功. 仔猪腹泻源大肠杆菌贵州株 K(88)菌毛研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, (04): 52-57.
- [44] RB Westerman GWF, Mills KW. Use of monoclonal antibodies specific for the a determinant of K88 pili for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs[J]. 1993.
- [45] CD Mullaney DHF. Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88, and 987P pilus antigens of *Escherichia*

- coli[J]. 1991.
- [46] 林彤, 独军政, 丛国正, 等. 胶体金标记免疫层析技术的最新应用进展[J]. 安徽农业科学, 2010, (16): 8429-8431.
- [47] 杨旭东, 刘文鑫, 冯瑜菲, 等. 大肠杆菌 F5 菌毛胶体金免疫层析检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2010, (11): 1166-1170.
- [48] 华荣虹, 张书霞, 何孔旺. 猪源肠毒素性大肠杆菌菌毛基因多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2006, (02): 162-164.
- [49] TA de Campos EGS, Ferreira A. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian Escherichia coli strains[J]. 2005.
- [50] JW Byun BYJ, HY Kim JMF. Real-time PCR for differentiation of F4 (K88) variants (F4ab, F4ac, F4ad) of enterotoxigenic Escherichiacoli from diarrhoeic piglets[J]. Vet J, 2012.
- [51] K Jiang YZ, W Liu YF, L He WG, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of F5 Fimbriae gene in Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)[J]. 2012.
- [52] 张丽娜, 王明义, 杨小蕾, 等. 海洋创伤弧菌 LAMP 快速诊断方法的建立与评价[J]. 国际检验医学杂志, 2016, (05): 577-579+582.
- [53] 王贤达, 郑巧美, 陈婷, 等. 葡萄炭疽病可视化 LAMP 检测体系的建立及应用[J]. 果树学报, 2016, (03): 366-373.
- [54] JA Lanser PAA. Detection of Escherichia coli adhesins with DNA probes[J]. J Clin Microbiol, 1985.
- [55] SL Moseley IH, ARMA Alim MS. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hybridization[J]. 1980.
- [56] Horrocks WH. On the Value of the Agglutination Test as a Means of Diagnosis of the B. Typhosus from Coliform Organisms[J]. Br Med J (Clin Res Ed), 1900.
- [57] 郭景煜, 潘松年. 用反向间接血凝技术定量艾希氏大肠杆菌“K88”抗原试验[J]. 畜牧兽医学报, 1982, (04): 45-50.
- [58] 刘利芳. 乳胶凝集试验、间接 ELISA 诊断鸭病毒性肝炎方法的建立. (11), 2008.
- [59] 郝成武, 马勋. 检测猪胸膜肺炎放线杆菌 ApxIV 抗体乳胶凝集试验方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2012, (03): 383-386.
- [60] Kronvall G. A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A-containing staphylococci[J]. J Med Microbiol, 1973, 6(2): 187-190.
- [61] Murray CJ. Detection of K88 and K99 fimbrial antigens on Escherichia coli by coagglutination[J]. Aust Vet J, 1987.
- [62] 杨磊, 赵广英, 窦文超. 新型凝集技术快速检测鸡白痢、鸡伤寒沙门菌[J]. 畜牧兽医学报, 2013, (12): 1994-1999.
- [63] 吴福林. 钩端螺旋体波摩那群及各型单因子血清的试制. 兽医科技杂志. 1983. (10): 15-17.

- [64] 李祖盛, 廖延雄. 肠结肠炎耶尔辛氏菌研究——IV. 肠结肠炎耶尔辛氏菌单因子血清的研制[J]. 江西科学, 1989, (04): 31-35.
- [65] 路明华. 副猪嗜血杆菌分离鉴定及血清学分型方法的建立. (03), 2014.
- [66] Lee JE, Lee N, Kim T, et al. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications[J]. Acc Chem Res, 2011, 44(10): 893-902.
- [67] 王明聪, 安杉. 超微细二氧化硅的生产及应用[J]. 有机硅材料及应用, 1997, (05): 13-14.
- [68] 王纪霞, 张秋禹, 苗振华, 等. 单分散二氧化硅微球的制备及粉体分散方法的研究进展[J]. 材料科学与工程学报, 2008, (05): 798-801.
- [69] 段涛, 彭同江, 马国华. 二氧化硅微球的制备与形成机理[J]. 中国粉体技术, 2007, (03): 7-10.
- [70] 李朝毅, 段涛, 杨玉山. 单因素对单分散二氧化硅微球制备的影响[J]. 材料导报, 2009, (S1): 151-153+164.
- [71] 李筱, 杜芳林. 表面活性剂对球形二氧化硅制备的影响[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2014, (02): 141-145.
- [72] 李曦, 刘连利, 王莉丽. 沉淀-超声法制备纳米二氧化硅[J]. 化学世界, 2007, (12): 705-708.
- [73] 文彬. 化学沉淀法制备超细球形二氧化硅的工艺研究. (S2), 2013.
- [74] 颜培力, 郭爽, 孙大航, 等. 超声水解法制备单分散二氧化硅微球[J]. 无机盐工业, 2007, (08): 16-18+38.
- [75] 孙立国, 赵冬梅, 玄立春, 等. 二氧化硅微球的制备及自组装[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2012, (01): 99-105+109.
- [76] 邹鑫. 磁性二氧化硅微球在生物学中的应用. (08), 2013.
- [77] 孙艳华. 荧光二氧化硅纳米粒子的制备及生物检测的应用. (05), 2010.
- [78] He X, Wang K, Tan W, et al. Photostable luminescent nanoparticles as biological label for cell recognition of system lupus erythematosus patients[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2002, 2(3-4): 317-320.
- [79] 范艳玲, 刘艺芳, 吕雪莉, 等. 硅酸乙酯为原料反相微乳液法制备纳米二氧化硅[J]. 化学工业与工程, 2010, (05): 387-390+410.
- [80] 张敬辉, 常松松, 徐海, 等. 反相微乳液制备纳米 SiO₂ 颗粒[J]. 化工新型材料, 2014, (11): 35-38.
- [81] Lu J, Li Z, Zink JJ, et al. In vivo tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug-delivery system: enhanced efficacy by folate modification[J]. Nanomedicine, 2012, 8(2): 212-220.
- [82] 王刚. 荧光二氧化硅微球的制备及其在检测次氯酸根方面的应用. (02), 2015.
- [83] 薛蕾. 微米级单分散二氧化硅微球的制备改性及其在液相色谱中的应用, 2015.
- [84] Zhao X, Hilliard LR, Mechery SJ, et al. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(42): 15027-15032.
- [85] Cheng D, Sun H, Xu J, et al. PCR detection of virulence factor genes in Escherichia coli

- isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 115(4): 320-328.
- [86] 贾静, 熊焰. 猪源致病性大肠杆菌菌毛的提取及菌毛蛋白抗原交叉性研究[J]. *畜牧与兽医*, 2007, (07).
- [87] 崔德凤, 张永红. 肠毒素型大肠杆菌菌毛的研究进展[J]. *北京农学院学报*, 2001, (03).
- [88] 崔玉东, 朱战波, 朴范泽. 大肠杆菌 K99 和 F41 菌毛抗原的不同缓冲液热处理提取方法比较的研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1998, (05): 26-28.
- [89] Curtis B, Grassel C, Laufer RS, et al. Simple method for purification of enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae[J]. *Protein Expr Purif*, 2016, 119: 130-135.
- [90] Santra S, Zhang P, Wang K, et al. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Anal Chem*. 2001. 73(20): 4988-4993.
- [91] Brunner TJ, Wick P, Manser P, et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol*. 2006. 40(14): 4374-4381.
- [92] Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008. 60(11): 1278-1288.
- [93] 方永勤, 张爱华, 荆鑫. 单分散疏水 SiO₂ 改性苯丙乳液的制备及其性能. *常州大学学报 (自然科学版)*. 2014. 26(4): 6-10.
- [94] Fan H, Jiao F, Chen H, et al. Qualitative and quantitative detection of DNA amplified with HRP-modified SiO₂ nanoparticles using scanning electrochemical microscopy[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 47: 373-378.
- [95] 崔媛, 赵鑫, 王琳, 等. 以纳米二氧化硅微球为模板的基因载体的制备与表征[J]. *硅酸盐学报*, 2015, (04): 418-423.
- [96] Yu H, Zhao G, Dou W. Simultaneous detection of pathogenic bacteria using agglutination test based on colored silica nanoparticles[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015, 16(8): 716-723.
- [97] 姜小阳, 李霞. 纳米二氧化硅微球的应用及制备进展. *硅酸盐通报*. 2011. (03): 577-582.

攻读硕士学位期间发表的学术论文

- [1] Liu W, Li X, Bao J, et al. Construction and evaluation of a fluorescence-based live attenuated *Escherichia coli* delivery system for generating oral vaccine candidate. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015. 99(9): 4005