

时间分辨荧光免疫法检测日本鳗鲡的产酸克雷伯氏菌

卢洁 郭松林 冯建军 王艺磊 朱洪泉 林鹏*

(集美大学水产学院,农业部东海海水健康养殖重点实验室,水产科学技术与食品安全省高校重点实验室,厦门 361021)

摘要 从皮肤点状出血的日本鳗鲡中分离出产酸克雷伯氏菌株 B12,经福尔马林灭活后,注射新西兰兔,制备免疫抗血清,G 蛋白亲和层析纯化得到抗体(IgG),以固定于微孔板的 IgG 作为捕获抗体, Eu^{3+} 螯合物标记的 IgG 作为检测抗体,建立了产酸克雷伯氏菌的夹心型时间分辨荧光免疫检测法(TRFIA),并研究了抗体浓度、免疫时间及离解时间对检测的影响。本方法检出限为 5.0×10^3 cfu/mL; 线性范围 $5.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$ cfu/mL,相关系数达 0.99 以上。交叉反应表明其具有较高的特异性,板内和板间相对标准偏差分别为 5.64% 和 2.27%。将本方法标准化后,检测了 29 份人工感染的日本鳗鲡样品,包括鳃、肾、肠、肝和肌肉组织,结果满意。

关键词 时间分辨荧光免疫检测; 产酸克雷伯氏菌; 日本鳗鲡

1 引言

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)属鳗鲡科(*Anguillidae*)鳗鲡属(*Anguilla*),在养殖鳗鲡中经济价值最高^[1],是中国的主要品种之一。但在目前高密度的集约化养殖生产过程中,病害频繁发生,尤以细菌病最为严重。本研究在皮肤点状出血的日本鳗鲡组织内,分离出产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*),并通过人工感染确定为病原菌。产酸克雷伯氏菌^[2]是重要的条件致病菌,可导致人畜患病,引起食物中毒等,但在患病的日本鳗鲡组织内发现该菌尚为首次。建立灵敏、特异、快速的产酸克雷伯氏菌检测技术,对鳗鲡病害防治无疑能起到积极的指导作用。

免疫检测技术由于具有特异性强、方法简单的优势,在水产养殖病原菌检测中得到广泛应用,其中又以酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[3,4]和荧光抗体法^[5,6]最为常用。ELISA 是以酶为标记物,但酶为生物大分子,容易失活,不易保存,大分子的酶易对免疫反应造成空间位阻效应,同时该法必须通过显色进行信号测定。荧光抗体法是以荧光物质为标记物,这种标记物分子量小,稳定,标记到抗原或抗体后对免疫反应影响小,可以直接测量荧光信号,不需要显色,弥补了 ELISA 法的不足。但由于生物样品中的一些蛋白本身可以发荧光,因此使用传统的发色团进行荧光检测时,背景荧光的干扰会使灵敏度降低。时间分辨荧光免疫检测(Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是用稀土离子螯合物作为标记物,该螯合物是一种长寿命的荧光物质,采用具有时间分辨功能的荧光仪,可将其与短寿命的背景荧光分开,有效消除背景荧光的干扰,显著提高测定灵敏度,该法已在化学^[7]、医学^[8]、烟草^[9]、食品^[10]和环境^[11]等领域得到广泛应用,但对水产养殖病原菌的检测从未见报道。病原菌是一种颗粒性抗原,TRFIA 的测定对象主要为可溶性抗原^[7],在离解增强 TRFIA 系统中^[12],通过免疫反应后加入离解增强液,与稀土离子形成微胶囊螯合物测量荧光,但颗粒性抗原在增强液中的微环境不同,有可能使得离解效果改变。本实验通过严格控制解离及测定时间,较为有效地避免了颗粒状病原菌对荧光测定的干扰,首次建立了一种检测日本鳗鲡产酸克雷伯氏菌的 TRFIA 新方法,线性范围宽,检出限为 5.0×10^3 cfu/mL,远高于 ELISA 法及荧光抗体法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

VICTOR X4 多标记分析仪(Perkins-Elmer 公司); AKTA Purifier 100 蛋白纯化系统(GE Healthcare 公

2012-02-25 收稿; 2012-06-05 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 30972281, 31001136)、福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(闽教科[2007] 20 号)和集美大学创新团队基金项目(No. 2010A001)资助

* E-mail: linpeng@jmu.edu.cn

司);SPA 亲和层析柱、Sephadex G-50(GE Healthcare 公司);Eu³⁺ 标记试剂盒(1244-302)、增强液(Perkins-Elmer 公司);牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司);96 孔白色微孔板(厦门怡佳美公司)。交叉实验所用的菌株(西班牙普通微生物保藏中心(CECT))。其它相关试剂均为分析纯。

菌株 B12 分离于皮肤点状出血的日本鳎鲷,并经 Biolog 自动生化鉴定系统(Gene III)鉴定为产酸克雷伯氏菌,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,登记入册编号为 CGMCC No.5060。菌株接种于斜面培养基培养后,采用平板菌落计数法确定浓度,并调整浓度至 1×10^8 cfu/mL 备用。免抗产酸克雷伯氏菌抗体(IgG)据文献[13]制得,其效价为 1:2560,经蛋白 A 亲和层析并冻干得纯化抗体。

2.2 实验方法

2.2.1 IgG 的 Eu³⁺ 标记及纯化 1 mg IgG 抗体溶于 250 μ L Na₂CO₃-NaHCO₃ (0.1 mol/L, pH 9.1) 缓冲溶液中,与 Eu³⁺ 标记试剂盒中 0.2 mg 的 Eu³⁺ 标记试剂充分混匀,在 4 $^{\circ}$ C 磁力搅拌 12 h,在 pH 7.8 的 Tris-HCl (0.05 mol/L, 0.9% NaCl) 缓冲液中透析 24 h,其间换透析液两次。通过蛋白纯化系统用 Sephadex G-50 柱层析(20 cm $\times$ 1 cm)分离,洗脱液仍为 Tris-HCl 缓冲液,收集流出液,监测 280 nm 处吸光度(A_{280})并收集蛋白峰,得 IgG 标记复合物 Eu³⁺-IgG。

2.2.2 TRFIA 法的建立 用碳酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 9.6)稀释免抗 IgG,加入到 96 孔微孔板中,每孔 100 μ L,在 4 $^{\circ}$ C 保温 12 h,用洗涤液冲洗 3 次,每孔加入 200 μ L 3% BSA,37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,洗涤 3 次,加入用分析缓冲液稀释的一定浓度 B12 菌悬液 100 μ L,对照孔以分析缓冲液代替,37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 105 min,洗涤 3 次,加入工作浓度的 Eu³⁺-IgG 溶液 100 μ L,25 $^{\circ}$ C 振荡孵育 135 min,洗涤 6 次,每孔加入 200 μ L 增强液,室温振荡 10 min,多标记分析仪上测量时间分辨荧光(Time-resolved fluorometry, TRF),测量参数设置如下:激发波长 340 nm,发射波长 615 nm,延迟时间 0.4 ms,测量时间 0.4 ms。

3 结果与讨论

3.1 Eu³⁺-IgG 的纯化结果

图 1 为 Eu³⁺-IgG 在 Sephadex G-50 凝胶过滤层析中产生的 2 个洗脱峰,第一个洗脱峰为 Eu³⁺-IgG 样品,包含了 IgG 和 Eu³⁺ 标记试剂的共同吸收;第二个洗脱小峰为未标记到 IgG 上的 Eu³⁺ 标记试剂的吸收。由图 1 可见。Eu³⁺-IgG 主要集中在 5~9 mL 处,收集合并 6~8 mL 处的溶液,按照试剂盒说明书的方法计算标记比,得到合并液中 Eu³⁺ 和 IgG 浓度分别为 4.5×10^{-6} 和 1.5×10^{-6} mol/L,标记比约为 3。

3.2 TRFIA 法检测产酸克雷伯氏菌条件优化

3.2.1 包被 IgG 的最适工作浓度^[14] 固定细菌抗原浓度为 1×10^5 cfu/mL, Eu³⁺-IgG 浓度选择 1:1280,包被 IgG 用碳酸盐缓冲液分别稀释成 20, 10, 5.0, 2.5, 1.0, 0.5 和 0.25 mg/L,包被于 96 孔微孔板中,每孔 100 μ L,对照孔加碳酸盐缓冲液,TRFIA 法测定包被 IgG 最适工作浓度。在低浓度时 TRF 值随包被 IgG 浓度增加而增大,到达 1 mg/L 后 TRF 值变化较小,选择包被 IgG 的浓度为 1 mg/L。

3.2.2 最佳免疫反应时间^[14] 当包被 IgG 与菌发生免疫反应时,荧光值随时间延长而不断升高,并在 105 min 达到最大值,故这一步免疫反应时间定为 105 min。当 Eu³⁺-IgG 与菌-包被 IgG 形成夹心复合物发生免疫反应时,荧光值在 135 min 达到最大值,故标记抗体与捕获的菌体抗原反应时间定为 135 min。

3.2.3 Eu³⁺-IgG 的最适稀释度 Eu³⁺-IgG 分别稀释成 1:320, 1:640, 1:1280 和 1:2560,包被 IgG 浓度为最适工作浓度。菌浓度($1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^3$ cfu/mL)作一系列的 10 倍稀释,比较不同 Eu³⁺-IgG 稀释度下的工作曲线,结果见图 2。最适稀释度在最大和最小稀释度中间取值,稀释度过高,会导致检测信号不

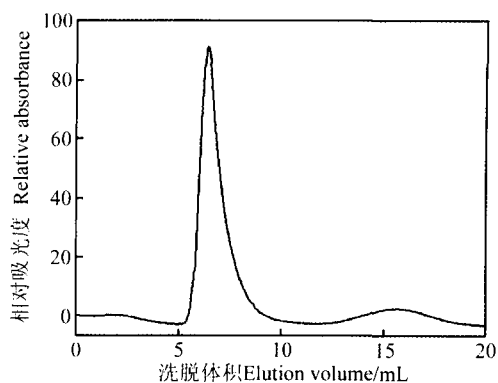


图 1 Eu³⁺-IgG 的 Sephadex G-50 凝胶过滤层析色谱图
Fig. 1 Gel filtration elution profiles of Eu³⁺-IgG on Sephadex G-50 column

灵敏; 稀释度过低, 会增加非特异吸附。本研究选取 Eu^{3+} -IgG 稀释度为 1:1280, 此时线性关系最好。

3.2.4 增强液离解时间的优化 当在免疫体系中加入离解增强液时, 与常规 TRFIA 不同^[15,16], 发现荧光值有两个特点: 一是荧光强度随时间延长而增加, 通过 24 h 的动力学曲线观察, 响应值在前 10 min 内增加很快, 之后的增幅在 20% 以内, 这说明虽然微环境改变, 离解增强液仍旧能够将稀土离子从颗粒性抗原抗体复合物中离解出来, 形成新的强荧光微胶囊螯合物, 并且在前 10 min 内大部分稀土离子离解出来, 然而并没有解离完全, 剩余的少量稀土离子继续缓慢解离, 但引起荧光强度的变化幅度较小; 二是荧光改变值对样品孔和对照孔是同步的, 通过测量不同时间的荧光响应值, 以样品孔的 $\text{TRF}(P)$ 与对照孔的 $\text{TRF}(N)$ 之比大于 2 (即 $P/N > 2$) 判断为阳性^[17,18], 发现不同时间的 P/N 值改变不大, 在 10 min 以后测量时更为如此, 这说明只要严格控制离解时间和测量时间, 仍旧有可能用 TRFIA 法进行颗粒性抗原的检测。据此将增强液反应时间严格控制在 10 min, 然后测量 TRF。

3.2.5 微孔板的影响 考察了透明微孔板与白色微孔板对荧光测量的影响, 发现在完全相同的条件下, 白色微孔板的读数明显高于透明微孔板。其原因是: 因为荧光读数采用顶读模式读取, 光源和检测器都在微孔板的上方, 光源激发微孔板中的强荧光微胶囊螯合物, 荧光向各个方向发射, 对于透明酶标板, 只有向上的荧光被检测到, 但是对于白色的酶标板, 向下的荧光由于反射作用同样也能被检测到, 荧光读数高。因此采用专用的非透明微孔板。

3.3 重复性实验

根据文献[3], 重复性通过板内相对标准偏差和板间相对标准偏差反映。固定包被 IgG, Eu^{3+} -IgG 和细菌浓度, 在同一块微孔板上进行 TRFIA 测定, 由每个微孔中的 TRF 值计算出平均值与标准偏差, 进而计算出板内相对标准偏差 (板内标准偏差/平均值 $\times 100\%$)。又固定包被 IgG, Eu^{3+} -IgG 和细菌浓度, 在 6 块板上进行 TRFIA 测定, 根据 TRF 值计算板间相对标准偏差。板内相对标准偏差为 5.64%。板间相对标准偏差为 2.27%。相对标准偏差较小, 说明微孔板的吸附稳定性好, 也说明 TRFIA 法可高度重复。

3.4 特异性测定

选取肺炎产酸克雷伯氏菌及 16 株鳗鲡病原菌菌株与菌株 B12 的抗体进行交叉反应的测定, 并同时菌株 B12 的测定, 菌浓度都为 1×10^8 cfu/mL, 同时肺炎产酸克雷伯氏菌和爱德华氏菌还检测了 1×10^9 cfu/mL 的反应, 包被 IgG 和 Eu^{3+} -IgG 都采用最适工作浓度, 同时设立重复组, 对照孔中加入 100 μL 分析缓冲液, 以 $P/N > 2$ 判断为阳性, 结果见表 1。结果表明, 抗体与菌株 B12 有较强的阳性反应, 与其它同浓度菌无交叉反应。然而当肺炎产酸克雷伯氏菌和爱德华氏菌浓度达到 1×10^9 cfu/mL 时出现假阳性结果, 但 P/N 不大。这说明制备的抗体特异性较好, 可用于快速检测鳗鲡产酸克雷伯氏菌。

3.5 工作曲线及敏感性测定

通过 TRFIA 测定不同浓度的产酸克雷伯氏菌 TRF 值, 以 $\log \text{TRF}$ 为纵坐标, 不同浓度细菌的对数值 ($\log \text{CFU}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见图 3。标准曲线在 $1.0 \times 10^3 \sim 7.0 \times 10^7$ cfu/mL 范围内线性良好, 线性方程为 $\log \text{TRF} = 0.5503 \log \text{CFU} + 2.3288$, $R^2 = 0.9955$ 。方法的灵敏度依据 ELISA 法确定^[17,18], 以 $P/N > 2$ 时所对应的最小浓度为检出限, 其检出限为 5.0×10^3 cfu/mL, 远低于荧光抗体法 (一般无法给出具体的灵敏度数值)^[5] 及 ELISA 法 (2.0×10^5 cfu/mL)^[4]。

3.6 TRFIA 检测法的实际应用

将体长 22~27 cm, 体重 12~26 g 的日本鳗鲡饲养在 50 L 桶内, 每天正常换水、投饵, 水温 23~28 $^{\circ}\text{C}$ 。将 B12 活菌用无菌生理盐水稀释为 1×10^9 cfu/mL, 腹腔注射, 每尾 0.2 mL, 对照组注射生理盐水, 观察人工感染后的鱼体变化。10d 后选用无明显症状及略有发病症状的日本鳗鲡, 取鳃、肝、肾、肌

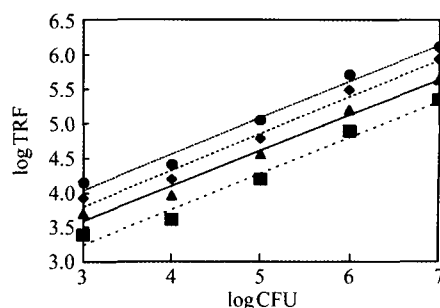


图 2 Eu^{3+} -IgG 的浓度对检测信号的影响

Fig. 2 Effect of concentration of Eu^{3+} -IgG on the signal

● 1:320; ◆ 1:640; ▲ 1:1280; ■ 1:2560.

表 1 TRFIA 法测定产酸克雷伯氏菌抗体的交叉反应
Table 1 Cross reaction of *Klebsiella oxytoca* antibody using time resolved fluoroimmunoassay (TRFIA)

菌名称 Species	菌号 Lab code	P/N 值 P/N values	结果 Results	菌名称 Species	菌号 Lab code	P/N 值 P/N values	结果 Results
产酸克雷伯氏菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	B12	142.48	+	肠棕色气单胞菌 <i>Aeromonas enteropelo-</i> <i>genes</i>	B4255	1.07	—
肺炎产酸克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	B39	1.18	—	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	B1003	1.36	—
肺炎产酸克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> *	B39*	3.70	+	嗜生气单胞菌 <i>Aeromonas bestiarum</i>	B4227	0.99	—
嗜泉气单胞菌 <i>Aeromonas eucrenophila</i>	B4224	1.05	—	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>	B4232	1.15	—
爱德华氏菌 <i>Edwardsiella</i>	B81	1.36	—	嗜水气单胞菌嗜水亚种 <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>subsp. hydrophila</i>	B839	1.09	—
爱德华氏菌 <i>Edwardsiella</i> *	B81*	2.96	+	波波夫气单胞菌 <i>Aeromonas popoffii</i>	B4995	1.06	—
豚鼠气单胞菌 <i>Aeromonas caviae</i>	B838	1.05	—	杀鲑气单胞菌无色亚种 <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>achromogenes</i>	B895	1.11	—
鲁氏耶尔森氏菌 <i>Yersinia ruckeri</i>	B04	1.02	—	温和气单胞菌 <i>Aeromonas sobria</i>	B4245	1.13	—
维隆气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	B5761	1.04	—	溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	B1002	1.18	—
简达气单胞菌 <i>Aeromonas jandaei</i>	B4228	1.29	—	副溶血弧菌 <i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	B1001	1.61	—

注：+代表阳性结果，—代表阴性结果。* 代表菌浓度为 1×10^9 cfu/mL，其它菌浓度为 1×10^8 cfu/mL。
Note: +, Represents positive result; —, Represents negative result. *, Represents 1×10^9 cfu/mL of bacterial concentration, the concentration of the others is 1×10^8 cfu/mL.

肉、肠等部位组织 0.05 g，分别置于 700 μ L 无菌的 0.85% 生理盐水，匀浆、离心，上清液备检。以同样处理的对照组鳗鲡组织样品为阴性对照，利用建立的 TRFIA 法检测了人工感染后鳗鲡组织样品 29 个，结果见图 4，样品均呈阳性，并与间接 ELISA 法^[3]进行对比(图 5)，阳性检出率高于 ELISA 法(约 70%)。

4 结 论

TRFIA 法相较于荧光抗体法及 ELISA 法进行水产养殖病原菌检测，具有灵敏度高，检测范围宽的优点。本研究采用 TRFIA 法检测日本鳗鲡产酸克雷伯氏菌，并讨论分析了颗粒性抗原对时间分辨荧光的影响，实际样品检测结果可靠，结果证明，TRFIA 同样适用于颗粒性抗原的检测，有可能成为继荧光抗体法、ELISA 法之后的适用于水产养殖的常规方法，是今后水产养殖病原菌检测技术的一个重要发展方向。

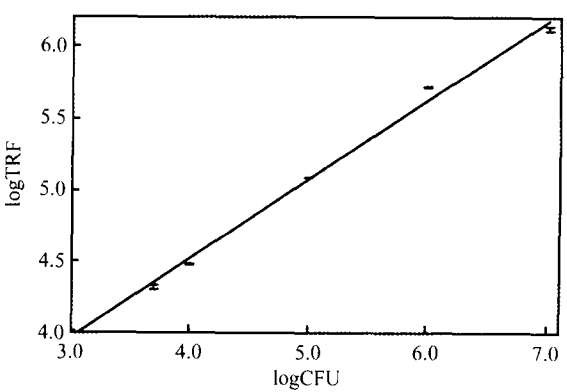


图 3 TRFIA 法检测产酸克雷伯氏菌的标准曲线
Fig. 3 Calibration curve of TRFIA for *K. oxytoca*

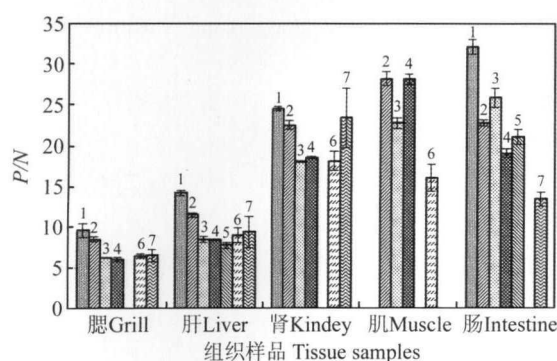


图 4 鳗鲡样品 TRFIA 法检测结果

Fig. 4 Detective results of *A. japonica* samples using TRFIA

1—7 分别代表 7 条感染后的鳗鲡

Number 1—7 represent the seven infected *A. japonica*.

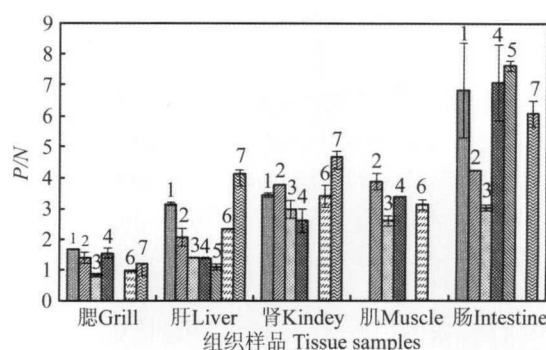


图 5 鳗鲡样品 ELISA 法检测结果

Fig. 5 Detective results of *A. japonica* samples using ELISA

1—7 分别代表 7 条感染后的鳗鲡。

Number 1—7 represent the seven infected *A. japonica*.

References

- LIANG Xu-Fang. *Fisheries Science*, **2005**, 24(4): 24—26
梁旭方. 水产科学, **2005**, 24(4): 24—26
- DONG Jie, YU Lan, ZHAO Yu, FAN Hai-Jun, ZHAO Yue-Ping. *Chinese Journal of Infectious Diseases*, **2002**, 20(5): 315—316
董捷, 于兰, 赵郁, 樊海军, 赵月萍. 中华传染病杂志, **2002**, 20(5): 315—316
- FAN Jing-Feng, LI Guang, WANG Bin, MA Cheng, LIANG Yu-Bo. *Journal of Fisheries of China*, **2006**, 30(1): 113—117
樊景凤, 李光, 王斌, 马成, 梁玉波. 水产学报, **2006**, 30(1): 113—117
- LI Chong-Shi, LI Qiang, LIU Hai-Yan, YE Shi-Gen, LI Hua. *Journal of Guangdong Ocean University*, **2010**, 30(4): 17—21
李重实, 李强, 刘海燕, 叶仕根, 李华. 广东海洋大学学报, **2010**, 30(4): 17—21
- BAI Xue-Mei, LI Tai-Yuan, YANG Xing, LI Yan-Ru, SUN Dan-Dan, DONG Dan. *Fisheries Science*, **2010**, 29(10): 613—615
白雪梅, 李太元, 杨兴, 李艳茹, 孙丹丹, 董丹. 水产科学, **2010**, 29(10): 613—615
- WANG Jun, YAN Qing-Pi, SU Yong-Quan, ZHANG Wen. *Marine Sciences*, **2002**, 26(007): 1—4
王军, 鄢庆彬, 苏永全, 张纹. 海洋科学, **2002**, 26(007): 1—4
- Jiang H F, Wang G L, Zhang W Z, Liu X Y, Ye Z Q, Jin D Y, Yuan J L, Liu Z G. *J. Fluoresc.*, **2010**, 20(1): 321—328
- Kupstat A, Kumke M U, Hildebrandt N. *Analyst*, **2011**, 136(5): 1029—1035
- LIU Yuan, LIU Rong-Rong, LIU Xian-Jin, FANG Dun-Huang, SONG Cun-Man, Huovinen Tuomas, Vehniäinen Markus, Lövgren Timo. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(7): 1114—1117
刘媛, 刘蓉蓉, 刘贤金, 方敦煌, 宋春满, Huovinen Tuomas, Vehniäinen Markus, Lövgren Timo. 分析化学, **2012**, 40(7): 1114—1117
- Chafer-Pericas C, Maquieira A, Puchades R, Miralles J, Moreno A, Pastor-Navarro N, Espinos F. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, 662(2): 177—185
- Zhang Z, Liu J F, Shao B, Jiang G. *Environ. Sci. Technol.*, **2009**, 44(3): 1030—1035
- WANG Hao-Dan, ZHOU Shen. *Labeling Techniques in Biomedical Domain*. Beijing: Peoples Health Press, **1995**: 165
王浩丹, 周申. 生物医学标记示踪技术. 北京: 人民卫生出版社, **1995**: 165

- 13 ZHU Li-Ping, CHEN Xue-Qing. *Experimental Methods Used in Immunology*. Beijing: People's Military Medical Press, **2000**: 18–22
朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, **2000**: 18–22
- 14 Niu C G, Liu J, Qin P Z, Zeng G M, Ruan M, He H. *Anal. Biochem.*, **2011**, 409(2): 244–248
- 15 Caruhel P, Mazier C, Kunde J, Morgenthaler N G, Darbouret B. *Clin. Biochem.*, **2009**, 42(7-8): 725–728
- 16 Sellrie F, Beck M, Hildebrandt N, Micheel B. *Anal. Methods*, **2010**, 2(9): 1298–1301
- 17 HU Da-Yan, QIAN Dong, LIU Wen, ZHANG You-Ping, PAN Qing-Qing, CHEN Chang-fu. *Journal of Huazhong Agricultural University*, **2008**, 27(1): 80–85
胡大雁, 钱冬, 刘问, 张友平, 潘清清, 陈昌福. 华中农业大学学报, **2008**, 27(1): 80–85
- 18 WANG Chong-Ming, YANG Bing, SONG Xiao-Ling, Huan Jie. *Marine Fisheries Research*, **1999**, 20(1): 30–34
王崇明, 杨冰, 宋晓玲, 黄健. 海洋水产研究, **1999**, 20(1): 30–34

Time-Resolved Fluoroimmunoassay for Detecting *Klebsiella Oxytoca* in *Anguilla Japonica*

LU Jie, GUO Song-Lin, FENG Jian-Jun, WANG Yi-Lei, ZHU Hong-Quan, LIN Peng*
(Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture,
Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety,
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract *Klebsiella Oxytoca* B12, isolated from diseased *Anguilla japonica*, was used for rabbit anti-serum preparation by injecting the formalin-inactivated bacteria. The rabbit immunoglobulin (IgG) was purified by SPA affinity column. A microplate sandwich immunoassay for the detection of *K. Oxytoca* was developed utilizing time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA). Antibodies immobilized on microtiter plates were used to capture the bacteria. The bound antigen-antibody complexes were then detected using the same antibodies labeled with Eu^{3+} chelates. The effects of antibody concentration, immunoreaction time and dissociation time on assay were studied during assay development. The limit of detection was 5.0×10^3 cfu/mL and the linear range was $5.0 \times 10^3 - 1.0 \times 10^7$ cfu/mL with the correlation coefficients more than 0.99. Cross reaction showed that it had high specificity. The intra-assay and inter-assay standard deviation were 5.6% and 2.3%, respectively. The method was optimized to detect the tissues including gill, kidney, intestine, liver and muscle from infected *K. Oxytoca* with satisfactory results.

Keywords Time-resolved fluoroimmunoassay; *Klebsiella Oxytoca*; *Anguilla japonica*

(Received 25 February 2012; accepted 5 June 2012)

《制备色谱技术及应用》(第二版) (ISBN 978-7-122-11958-2)

该书从色谱科学的角度详细地阐述了制备色谱的原理、重要的实验技术、关键性色谱分离技巧及其应用。内容包括制备色谱的基础知识、制备薄层色谱、常压柱色谱、低压及中压柱色谱、高压制备液相色谱、高速逆流色谱、模拟移动床色谱、顶替色谱、制备气相色谱、电泳以及与制备色谱技术紧密相关的生物代谢产物的提取分离技术等。本书对制备色谱技术的系统介绍具有简明、系统、全面的特点。

该书适用于有机合成、植物化学、生物工程、精细化工、药物化学、生命科学以及色谱领域的读者,也可供有机化学、分析化学、农业、环境、食品、医学、材料等不同领域的科研人员、研究生、大学生、技术员和实验员学习参考。

该书由袁黎明 编著,化学工业出版社出版,定价 48.00 元