

江地科,尹清清,项明源,等. 检测猪瘟病毒胶体金和量子点试纸条的初步研制[J].江苏农业学报,2020,36(1):116-121.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.01.016

检测猪瘟病毒胶体金和量子点试纸条的初步研制

江地科^{1,2}, 尹清清^{1,2}, 项明源^{1,2}, 王 印^{1,2}, 姚学萍¹, 罗 燕¹, 杨泽晓¹,
张鹏飞^{1,2}, 张保海^{1,2}, 周丽军^{1,2}

(1.四川农业大学动物医学院,四川 成都 611130; 2.动物疫病与人类健康四川省重点实验室,四川 成都 611130)

摘要: 为建立快速、简便检测猪瘟病毒(CSFV)抗体的方法,本研究采用胶体金和量子点免疫层析技术,将纯化的重组 CSFV E2 蛋白作为捕捉抗原,以纯化的抗 CSFV E2 蛋白多克隆抗体和 HRP 兔抗猪 IgG 分别包被于硝酸纤维素膜上,作为质控线(C线)和检测线(T线),优化反应条件,制备免疫层析试纸条,用于临床检测。结果表明,制备的2种试纸条都可用于检测 CSFV 标准阳性血清,使用不同批次试纸条进行检测,结果无差异。2种试纸条与 CSFV 阳性血清反应呈阳性,与伪狂犬病毒(PRV)、猪乙型脑炎病毒(JEV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和圆环病毒2型(PCV2)反应呈阴性;胶体金试纸条在临床样品中阳性检出率为84.38%(81/96),与 CSFV 抗体检测 ELISA 试剂盒检测阳性符合率为92.05%(81/88);量子点试纸条阳性检出率为87.50%(84/96),与 ELISA 试剂盒检测阳性符合率为95.45%(84/88)。本研究制备的2种试纸条都具有较好的特异性、敏感性、重复性和稳定性。

关键词: 猪瘟病毒; E2 蛋白; 胶体金; 量子点

中图分类号: S852.65⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2020)01-0116-06

Development of colloidal gold and quantum dot test strip for detection of classical swine fever virus

JIANG Di-ke^{1,2}, YIN Qing-qing^{1,2}, XIANG Ming-yuan^{1,2}, WANG-Yin^{1,2}, YAO Xue-ping¹, LUO-Yan¹,
YANG Ze-xiao¹, ZHANG Peng-fei^{1,2}, ZHANG Bao-hai^{1,2}, ZHOU Li-jun^{1,2}

(1.College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2.Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, China)

Abstract: Two test strips for rapid detection of the classical swine fever virus (CSFV) antibody were developed based on colloidal gold and quantum dots immunochromatographic assay. The recombinant CSFV E2 protein was incubated on test strip as capture antigen, and the rabbit anti-pig IgG was immobilized on the test line as detection antibody. In addition, anti-CSFV E2 protein polyclonal antibody was blotted on the control line of the nitrocellulose membrane. The results showed that the two test strips could be used to detect the CSFV positive serum. The test strips did not capture unspecific virus proteins which derived from pseudorabies virus

(PRV), Japanese encephalitis virus (JEV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). In the detection of clinical samples, the positive detection rate of colloidal gold immunochromatographic strip was 84.38% (81/96), and the coincidence rate was 92.05% (81/88) compared with

收稿日期:2019-05-28

基金项目:国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP)

作者简介:江地科(1993-),男,四川乐山人,硕士研究生,主要从事动物传染病病原微生物研究。(E-mail) 1192828928@qq.com。尹清清为共同第一作者。

通讯作者:王 印,(E-mail) yaanwangyin@tom.com

CSFV antibody IDEXX kit (ELISA). The positive detection rate of quantum dot immunochromatographic strip was 87.50% (84/96), and the coincidence rate was 95.45% (84/88) compared with CSFV antibody IDEXX kit (ELISA). The two test strips prepared in this study have good specificity, sensitivity, repeatability and stability.

Key words: classical swine fever virus; E2 protein; colloidal gold; quantum dots

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的猪的一种急性、热性、高度接触性传染病,该病发病率和病死率都在90%以上,给养猪业造成了极大经济损失,并且被世界动物卫生组织(Office International des Epizooties, OIE)列为通报疾病,被中国列为一类动物疫病^[1-2]。目前,针对CSFV最有效的防控措施就是采用疫苗免疫。农业部宣布2020年底争取全国所有种猪场和部分区域达到猪瘟净化标准,并且从2017年开始取消对该病毒的强制免疫,意味着在未来猪群体内存在较少或无CSFV抗体,通过检测抗体就能判断该猪群是否感染CSFV病毒。目前,ELISA是检测CSFV抗体的主要方法,但该方法需要实验室仪器支撑,且存在操作繁琐、耗时长等问题,无法满足中小型猪场及临床兽医工作人员的需求,因此建立一种快速、简便、灵敏和特异的CSFV抗体检测方法是有必要的。已有研究结果表明,猪瘟病毒的E2囊膜糖蛋白能刺激宿主产生大量的中和抗体,可用于建立血清学检测方法^[3-4]。

胶体金免疫层析(Colloidal-gold immunochromatography assay, GICA)技术具有快速、简便、灵敏等特点^[5-6],适用于临床大量样品检测,在畜禽疾病监测上已得到广泛的研究与引用。量子点(quantum dots, QDs)又名无机半导体纳米晶体,是近年来发展起来的一种新型荧光纳米材料,组成的元素一般在II—VI族,组成的球形颗粒直径在1~10 nm^[7]。与传统的有机染料相比,该技术具有颜色丰富、光化学性质稳定、不宜被分解等特点,将其与免疫层析技术结合,不仅可提高检测的灵敏性和稳定性,而且还能进行定量检测^[8-9]。

本研究采用胶体金和量子点免疫层析技术,选用CSFV E2蛋白作为捕捉抗原,将纯化的抗CSFV E2蛋白多克隆抗体和HRP兔抗猪IgG分别包被质控线(C线)和检测线(T线),并对HRP兔抗猪IgG浓度优化和CSFV E2重组蛋白多克隆抗体进行稀释倍数优化,制备胶体金和量子点免疫层析试纸条,用于临床检测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)阳性血清、猪乙型脑炎病毒(Swine japanese encephalitis virus, JEV)阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)阳性血清、猪瘟病毒(CSFV)阳性血清、猪瘟病毒(CSFV)阴性血清、圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2, PCV2)阳性血清由本实验室保存,聚乙二醇20000(PEG20000)、牛血清白蛋白(BSA)、氯金酸、柠檬酸三钠购自博大万科有限公司,硝酸纤维素膜(NC膜)Millipore HilFlow-135、吸水纸Paper-20300、玻璃纤维素膜(金标垫)Gls-17930、聚酯纤维素(样品垫)VL 983、PVC底板SM31-40购于北京吉森生物科技有限公司,水溶性量子点(CdSe)、牛血清白蛋白(BSA)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、2-吗啉乙磺酸(MES)、甘氨酸(Gly)购于北京索莱宝生物科技有限公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 胶体金颗粒的制备

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,透射电镜观察,4℃避光保存,备用^[10]。

1.3 量子点与重组蛋白偶联

将20 μl QDs加入1.5 ml离心管中,以200 μl 1% PBS进行稀释,再加入一定体积的EDC·HCl(5 mg/ml)溶液和NHS溶液,37℃恒温旋转摇床避光孵育2 h,加入一定体积的β-巯基乙醇至上述离心管中,再将重组E2蛋白加入溶液中,37℃反应过夜后加入7.5%甘氨酸(Gly)溶液+1% BSA溶液,将未与蛋白偶联的已活化羧基进行封闭处理,37℃反应2 h。14 000 r/min离心15 min后进行复溶,4℃保存备用。

1.4 金标蛋白和QDS偶联条件筛选

1.4.1 试纸条最适pH的筛选

1.4.1.1 胶体金标记最适pH的筛选 取6只1.5 ml的离心管,每管加入1 ml胶体金溶液,加入100

μl (1 mg/ml) 经过处理的重组蛋白, 分别用 K_2CO_3 (0.2 mol/L) 调整 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 静置 1 h, 离心, 重悬观察, 记录保持原色的最低 pH 值。

1.4.1.2 量子点偶联最适 pH 的筛选 取 4 只 1.5 ml 的离心管, 加入 20 μl QDs 和 200 μl PBS 混匀, 分别用硼酸缓冲液调节 pH 为 7、8、9、10, 加入一定量体积的 5 mg/ml 的 EDC 和 5 mg/ml 的 NHS 活化 2 h 后, 用 PBS 清洗 EDC/NHS 后加入重组 E2 蛋白, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光偶联 8 h 后, 加入封闭液封闭 2 h, 离心观察偶联状态, 紫外灯下观察结果。

1.4.2 试纸条最适蛋白质质量的筛选

1.4.2.1 E2 最适蛋白质质量的筛选 取 6 只 1.5 ml 的离心管, 每管加入 1 ml 已优化 pH 值的胶体金溶液, 加入 10 μl 、20 μl 、30 μl 、40 μl 、50 μl 、60 μl 不同体积重组 E2 蛋白, 静置 1 h, 离心重悬, 观察颜色变化并记录溶液保持红色的最低稳定蛋白质含量。

1.4.2.2 量子点偶联最适蛋白质质量的筛选 取 5 只 1.5 ml 的离心管, 分别加入 20 μl 已纯化的量子点和 200 μl 的 PBS, pH 调节至最佳, 加入已优化的 EDC/NHS 活化 2 h 后, 加入 0.5 mg/ml 重组 E2 蛋白 5 μl 、10 μl 、15 μl 、20 μl 、25 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光偶联过夜后, 加入封闭液封闭 2 h, 离心观察偶联状态。

1.4.3 胶体金标记 E2 蛋白的获取 根据上述步骤将 E2 蛋白缓慢加入已优化 pH 值的胶体金溶液中, 室温搅拌 30 min, 加入终浓度为 1% 的 BSA 和 PEG20000 胶体金稳定保护液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, 10 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液, 将沉淀用金标稀释液悬浮, 最终体积为原始体积的 1/20, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.4 试纸条的组装 参照文献[11]中的方法, 将金标垫、NC 膜、样品垫、吸水垫和 PVC 胶板装配成宽度为 4 mm 的检测试纸条。

1.5 胶体金和量子点试纸条检测线与质控线检测条件的优化

1.5.1 兔抗猪 IgG (T 线) 浓度的优化 取 10 μl 兔抗猪 IgG, 分别按照 1:2、1:4、1:8、1:16 比例稀释后划线至检测线 (T 线), 其他条件不变, 加阳性 CSFV 血清抗体观察结果, 量子点需在紫外线条件下观察结果。

1.5.2 兔多克隆抗体 (C 线) 浓度的优化 取适量的兔抗重组 E2 蛋白多克隆抗体分别按照 1:2、1:4、1:6、1:8、1:10 比例稀释后, 划线于 NC 膜上作

为质控线 (C 线), 其他条件不变, 加入 PBS 观察检测结果。

1.6 胶体金和量子点试纸条性能评价

1.6.1 特异性 分别将 CSFV 阳性血清和阴性血清以及 PRV、JEV、PRRSV 和 PCV-2 的阳性血清进行胶体金和量子点试纸条检测, 观察检测结果判定其特异性。

1.6.2 灵敏度 将 CSFV 阳性血清分别进行 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 稀释, 取 50 μl 稀释后的血清滴加于试纸条样品垫, 室温静置 10~15 min, 将试纸条检测的最大稀释倍数定为试纸条灵敏度。

1.6.3 重复性试验 利用 3 个不同批次的试纸条分别检测阳性血清, 设立 3 个重复, 观察检测结果。同时, 将同一批次制备的试纸条, 设置 3 个重复试验分别进行阳性标准血清检测, 观察检测结果。

1.6.4 临床样本检测 将本研究建立的胶体金及量子点免疫层析试纸条和 IDEXX 公司 CSFV 抗体检测 ELISA 试剂盒分别对临床采集的血清 (96 份) 进行检测, 对比检测结果, 计算符合率。

2 结果与分析

2.1 胶体金的制备及质量鉴定结果

制备的胶体金溶液呈酒红色, 由 Nanodrop 2000 测量可知, 制备的胶体金波长为 530 nm。随机取 50 个胶体金通过透射电子显微镜观察颗粒大小, 测量其直径, 粒径均为 30 nm。

2.2 试纸条最适 pH 值

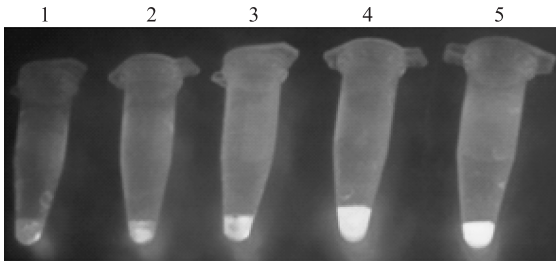
2.2.1 胶体金标记最适 pH 值 胶体金标记 E2 蛋白最适 pH 值试验结果显示, 每 1 ml 胶体金溶液中添加 0.2 mol/L K_2CO_3 调整 pH 值至 7.5 时, 标记胶体金离心呈油滴状, 复溶后易溶解。

2.2.2 量子点标记最适 pH 值 按照方法 1.4.1.2 的方法, 离心管中加入 20 μl QDs (1 mmol/L), 加入 50 μl (0.5 mg/ml) 重组蛋白和相应比例的 EDC/NHS, 用硼酸调整溶液 pH 值。结果表明, 当溶液 pH 值为 7 以及加入的 QDs 与 EDC/NHS 的剂量比为 1:5 时, 溶液偶联状态表现稳定。

2.3 试纸条最适蛋白质质量

2.3.1 胶体金标记最适蛋白质质量 胶体金标记 E2 蛋白试验结果显示, 每 1 ml 胶体金溶液中至少添加 30 μl (1 mg/ml) E2 蛋白能使溶液保持红色, 在临床实践中, 需在此基础上增加 15%~30%。

2.3.2 量子点标记最适蛋白质量 量子点标记 E2 蛋白试验结果显示,加入少量的 E2 蛋白,离心管底部会出现大量聚沉,当加入 20 μ l (0.5 mg/ml) 的重组 E2 蛋白时,量子点偶联状态稳定(图 1)。



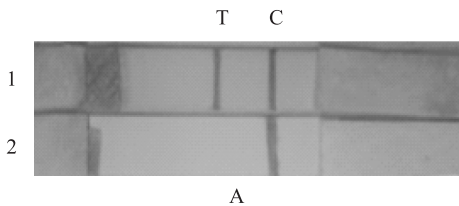
1~5:偶联的蛋白质量分别为 5 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l。

图 1 最佳蛋白质偶联量

Fig.1 The optimum protein amount for quantum dot coupling

2.4 试纸条检测线与质控线检测条件的优化

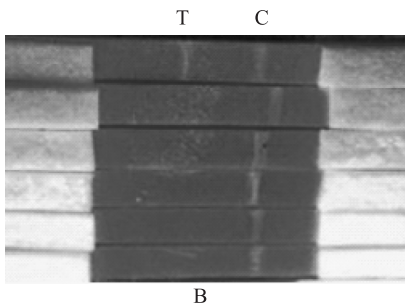
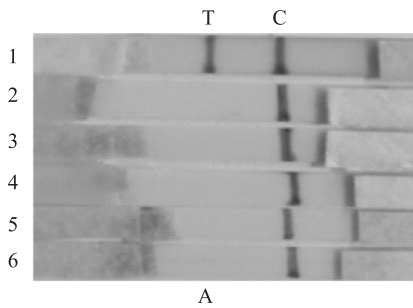
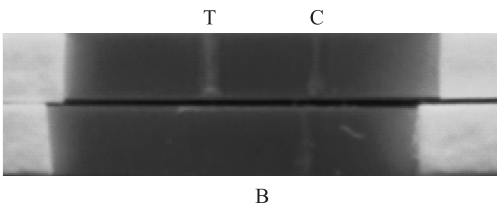
2.4.1 胶体金试纸条检测条件的优化 本试验制



A:胶体金试纸条;B:量子点试纸条;1:CSFV 阳性血清;2:CSFV 阴性血清。

图 2 试纸条对阴性血清和阳性血清检测结果

Fig.2 Test results of negative serum and positive serum by test strips



A: 胶体金试纸条;B:量子点试纸条;1:CSFV 阳性血清;2:CSFV 阴性血清;3:伪狂犬病毒阳性血清;4:乙脑病毒阳性血清;5:猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清;6:圆环 2 型病毒阳性血清。

图 3 特异性试验结果

Fig.3 Specificity of the test strips

2.6 灵敏度

胶体金和量子点试纸条灵敏度试验结果显示,将 CSFV 阳性血清稀释至 1 : 25 时 T 线仍可出现(图 4),表明制备的 2 种试纸条都具有良好的灵敏性。

备胶体金试纸条 T 线(兔抗猪 IgG)的最佳稀释倍数为 1 : 8 (1 mg/ml);C 线(兔多克隆抗体)最佳稀释倍数为 1 : 6;优化条件后检测 CSFV 标准阳性血清和阴性血清的结果见图 2A。

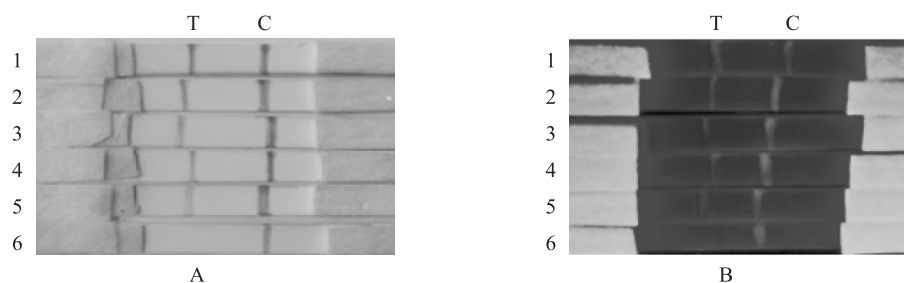
2.4.2 量子点试纸条检测条件的优化 本试验制备量子点试纸条 T 线(兔抗猪 IgG)的最佳稀释倍数为 1 : 8,浓度为 1 mg/ml;C 线(兔多克隆抗体)稀释倍数为 1 : 8 时,C 线依旧清晰,但考虑后续与胶体金试纸条进行对比检测,故选择 C 线包被稀释倍数为 1 : 6(图 2B)。

2.5 特异性试验结果

利用本研究制备的胶体金和量子点试纸条,进行不同病毒阳性血清检测,结果显示 2 种试纸条都能与 CSFV 阳性血清反应呈阳性,与其余病毒阳性血清反应均呈阴性,表明制备的试纸条特异性好,不与其他病原发生交叉反应(图 3)。

2.7 胶体金和量子点试纸条重复性试验结果

将不同批次制备的胶体金和量子点试纸条进行 CSFV 标准阳性血清检测,每个批次进行 3 次重复,结果表明所有重复都能清楚显示 T 线和 C 线,说明这 2 种试纸条具有良好的重复性。



A: 胶体金试纸条; B: 量子点试纸条; 1~6: 阳性血清稀释度为 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30。

图 4 重复性试验结果

Fig.4 Repeatability of the test strips

2.8 临床样本检测结果

临床样本检测结果(表 1)显示,本试验制备的胶体金(GICA)试纸条检测阳性率为 84.38%(81/96),量子点(FICA)试纸条检测阳性率为 87.50%(84/96);ELISA 试剂盒检测阳性率为 91.67%(88/96),与胶体金(GICA)试纸条和量子点(FICA)试纸条符合率分别为 92.05%(81/88)和 95.45%(84/88)。

表 1 胶体金(GICA)和量子点(FICA)试纸条与 ELISA 的检测结果比较

Table 1 Comparison of test results among GICA strip, FICA strip and ELISA

检测方法	阳性样品数	阴性样品数	合计	阳性率
胶体金(GICA)试纸条	81	15	96	84.38%
量子点(FICA)试纸条	84	12	96	87.50%
ELISA 试剂盒	88	8	96	91.67%

3 讨论

法国、荷兰、德国、比利时等国家曾经对外宣布已消灭猪瘟达到净化的标准,但仍可能存在复发的迹象^[12]。自 2012 年 5 月,中国将猪瘟列入重点防治病种,经过几年不懈努力,猪瘟疫情得到有效控制。2017 年 3 月,农业部取消对猪瘟强制免疫工作^[13],也意味着在未来中国部分地区猪群可能存在少量或者无 CSFV 抗体,因此只需检测 CSFV 抗体就能判断猪群是否感染 CSFV 病毒。2018 年 9 月,日本岐阜市爆发猪瘟疫情,中国作为其邻近国家,存在猪瘟病毒进入中国的风险。目前,中国主要采用 ELISA 方法监测免疫猪群的抗体水平^[14-15],此方法耗时较长、操作繁琐,并且需要借助酶标仪等仪器进

行操作。胶体金试纸条技术融合了免疫层析技术、酶联免疫吸附试验和胶体金标记等技术的特点,具有快速、准确、简便和灵敏等特点,不受场地、温度等外界环境因素影响,适合基层兽医及养殖场技术人员使用^[16]。量子点作为一种新型荧光材料,具有激发光谱范围宽,发射线窄,发光效率高,发光颜色可调,稳定性强等优点,是目前抗原抗体快速检测方法的热点话题^[17-18],并且中国还未见有关量子点免疫层析技术进行猪瘟病毒检测的研究,故本研究采用胶体金和量子点标记重组 E2 蛋白,兔抗猪 IgG 经 8 倍稀释作为检测线(T 线),兔抗重组 E2 蛋白多克隆抗体经 6 倍稀释作为质控线(C 线),进行试纸条组装,检测 CSFV 阳性血清。

本研究制备的胶体金和量子点试纸条特异性试验结果显示,2 种试纸条都能和 CSFV 阳性标准血清反应呈阳性,和其余各病毒阳性血清反应均呈阴性,表明 2 种试纸条具有良好的特异性;灵敏度试验结果显示,将 CSFV 阳性血清稀释至 25 倍时胶体金和量子点试纸条均可见阳性反应,该试纸条检测灵敏度高于尹梅等^[19]研制的胶体金试纸条。临床样品检测试验结果显示,量子点试纸条阳性率和符合率都高于胶体金试纸条,并且这 2 种试纸条检出率基本和 ELISA 试剂盒检出率基本一致。因此,本研究制备的 2 种试纸条可为快速检测猪瘟病毒抗体奠定基础。

参考文献:

- [1] YUAN J, ZHU M, DENG S, et al. Classical swine fever virus induces pyroptosis in the peripheral lymphoid organs of infected pigs [J]. *Virus Research*, 2018, 250(5):37-42.
- [2] 陈姝承,孙慧敏,李素,等.针对猪瘟病毒 E2 蛋白的嵌合猪源化单克隆抗体的表达及抗病毒活性鉴定[J].*生物工程学报*, 2017, 33(8):1235-1243.

- [3] XU X G, TONG D W, LIU H W. Baculovirus surface display of E0E1E2 envelope glycoprotein of CSFV and immunogenicity of the displayed proteins in mouse model[J]. Journal of Northwest A & F University, 2009, 37(12):73-79.
- [4] GONG Y, TROWBRIDGE R, MACNAUGHTON T B, et al. Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus[J]. Journal of General Virology, 1996, 77(11):2729-2736.
- [5] 孙雪霏. 猪弓形虫抗体间接 ELISA 方法的建立及胶体金试纸条的制备[D]. 长春:吉林农业大学, 2016.
- [6] 傅秋玲,程龙飞,万春和,等.半番鸭胚中鹅细小病毒的分离鉴定及其基因组分子特征分析[J].畜牧兽医学报, 2017, 48(11):2148-2156.
- [7] KOBAYASHI H, HAMA Y, KOYAMA Y, et al. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots[J]. Nano Letters, 2007, 7(6):1711-1716.
- [8] QIU W, XU H, TAKALKAR S, et al. Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 64(2):367-372.
- [9] LIU C Y, JIA Q J, YANG C H, et al. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe_3O_4 nanoparticle aggregates as color reagents[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(17):6778-6784.
- [10] 王向鹏,孙元,杨增岐,等.检测猪瘟病毒野毒株胶体金免疫层析方法的建立[J].中国预防兽医学报, 2010, 32(6):441-445.
- [11] 魏后军,范志宇,王芳,等.检测兔出血症病毒抗体胶体金试纸条的研制及初步应用[J].畜牧兽医学报, 2018, 49(3):614-619.
- [12] TARRADAS J, EUGENIA D L T M, ROSELL R, et al. The impact of CSFV on the immune response to control infection[J]. Virus Research, 2014, 185(6):82-91.
- [13] 韩焘,张宁宁,齐鲁,等.猪瘟退出强制免疫后的若干问题[J].中国动物检疫, 2017(5):60-63.
- [14] 袁莉,杨顺利,尚佑军,等.猪瘟病毒结构蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立及评价[J].西北农业学报, 2018, 27(9):43-49.
- [15] 蔺辉星,周红,童泽鑫,等.猪瘟病毒血清抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科学, 2017(1):9-15.
- [16] 张杰,胡军,刘杨,等.肺炎支原体快速检测方法的建立及应用评价[J].国际检验医学杂志, 2016, 37(17):2379-2381.
- [17] 樊淑华,王永立.胶体金免疫层析技术应用研究进展[J].动物医学进展, 2014, 35(10):99-103.
- [18] 胡纪文,张大准,熊建辉,等.肺炎支原体抗原量子点免疫层析法的建立及初步应用[J].国际检验医学杂志, 2018, 39(2):220-223.
- [19] 尹梅.猪瘟病毒抗体胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制及初步应用[D].南京:南京农业大学, 2013.

(责任编辑:陈海霞)