

# 胶体金免疫层析试纸条快速定量检测 Asia 1 型口蹄疫病毒含量方法的建立

朱玉婵<sup>1,2</sup>, 林密<sup>2</sup>, 孙燕燕<sup>2</sup>, 孙继国<sup>1\*</sup>, 蒋韬<sup>2\*</sup>

(1. 河北农业大学 动物医学院, 保定 071000; 2. 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 兰州 730046)

**摘要:** 采用胶体金为标记物制备了快速定量检测 Asia 1 型口蹄疫病毒(FMDV)免疫层析试纸条, 拟合检测曲线, 用金标分析仪进行定量检测。应用实验室与田间的样品检测证实其有较好的敏感性和特异性。对 Asia 1 型 FMDV 抗原定量检测可以在 15 min 内完成, 灵敏度为  $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 线性范围在  $0.78 \sim 7.84 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 变异系数在  $0.2\% \sim 5\%$ ; 回收率在  $91\% \sim 102\%$ , 证明定量检测、准确度高。结果表明, 本研究建立的定量检测 Asia 1 型口蹄疫病毒的胶体金免疫层析方法能简便、廉价、快速、灵敏、特异、准确地定量检测样品中的 Asia 1 型口蹄疫病毒。

**关键词:** Asia 1 型口蹄疫病毒; 胶体金; 免疫层析试纸条; 定量检测

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)08-1302-07

## Development of a Rapid and Quantitative Detection of Asia 1 Type Foot-and-Mouth Disease Virus Using Colloid Gold Immuno-chromatography Assay

ZHU Yu-chan<sup>1,2</sup>, LIN Mi<sup>2</sup>, SUN Yan-yan<sup>2</sup>, SUN Ji-guo<sup>1\*</sup>, JIANG Tao<sup>2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China;

2. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** The study was conducted to develop a rapid and quantitative colloid gold immuno-chromatography assay of Asia 1 type Foot-and-Mouth disease (FMD) virus. Aiming at detecting FMD virus of Asia 1 type quantitatively, the colloid gold-based immuno-chromatographic test strip was prepared and the standard curve was constructed. Testing the laboratory samples and field samples, results showed that this assay had good sensitivity and specificity. This method could accomplish qualitative and semi-quantitative detection in 15 minutes; the sensitivity was up to  $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  with a linear ranging from  $0.78$  to  $7.84 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The coefficient of variation was  $0.2\%$  to  $5\%$ , and the recovery reported to be  $91\%$  to  $102\%$ . Good reproducibility and accuracy of this method was demonstrated. The colloidal gold immuno-chromatographic assay is rapid, specific, sensitive, accurate, worthy to recommend its clinical use.

**Key words:** Asia 1 type Foot-and-mouth disease virus; colloidal gold; immuno-chromatographic test strips; quantitative testing

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引

起的主要侵害牛、猪、羊等多种偶蹄动物感染的急性、热性和高度接触性传染病<sup>[1]</sup>。世界动物卫生组

收稿日期: 2014-01-12

基金项目: 甘肃省农业科技成果转化资金计划(1305NCNA143)

作者简介: 朱玉婵(1987-), 女, 河北保定人, 硕士生, 主要从事病毒检验研究, E-mail: zhuyuchan521@163.com.

\* 通信作者: 孙继国(1957-), 教授, 主要从事兽医卫生检验检疫研究, Tel: 0312-7528377, E-mail: sunjiguo2000@aliyun.com; 蒋韬(1975-), 副研究员, 主要从事分子病毒学与免疫学研究, Tel: 0931-8343709, E-mail: prjiang@163.com

织(OIE)将其列为需上报动物疫病,中国也将其列为一类动物传染病<sup>[2]</sup>。FMDV 有 O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 和 Asia 1 型共 7 个血清型,其中 Asia 1 型是最晚发现的,因该血清型病毒是在亚洲分离而冠名<sup>[3]</sup>。由于该病流行范围广、发病率高和传播速度快,一旦暴发很难控制,严重威胁畜牧业和国际贸易,在全世界造成了重大的经济损失。胶体金免疫层析技术(GICA)是 20 世纪 80 年代在胶体金标记技术、免疫层析技术基础上建立的一种独特的免疫学检测技术。它以胶体金作为示踪物,利用特异性抗原抗体结合原理,通过胶体金颗粒的颜色放大免疫反应系统,使反应结果在固相载体上直接显示出来<sup>[7]</sup>。胶体金试纸条具有操作简单,检测速度快等优点,但是该方法的结果判定是通过观察检测带显色条带的有无,因此大多数胶体金免疫层析试纸条只能用于定性和半定量的检测。目前,口蹄疫病毒检测技术及定性的方法主要有病毒分离、病毒中和试验、ELISA 和 PCR。对样品中病毒的定量检测有荧光定量 PCR,完整病毒粒子的检测方法有 ELISA、超速离心法和分子排组色谱法<sup>[4-6]</sup>。这些方法过程繁多,操作复杂,检测时间长,成本高,而且还需要专业的设备和技术人员。目前,定量试纸条多见于人类医学诊断领域、食品添加剂、残留药物的检测等,而口蹄疫病毒定量检测试纸条还未见有文献报道。本研究首次将定量检测试纸条应用于口蹄疫病毒的检测中。本试验选择 Asia 1 型 FMDV 流行株制备抗体,利用胶体金免疫层析技术,并结合金标分析仪建立对 Asia 1 型口蹄疫病毒快速定量检测的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株与试剂

纯化口蹄疫病毒 Asia 1/XJ/AKT/03 株和 Asia 1/JSL/HeNZK/06 株兔多克隆抗体;FMD O、A、Asia 1/JSL/HeNZK/06 细胞毒,猪水疱病病毒(SVDV),142 份田间样品和正常细胞培养液均由国家口蹄疫参考实验室提供;玻璃纤维膜、硝酸纤维膜(NC 膜)、吸水纸:Schleicher & Schuell 公司产品;聚乙二醇(PEG)6000 为日本进口分装;氯金酸:Sigma 公司产品;柠檬酸三钠等试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

金标免疫分析仪:上海捷宁生物有限公司生产;XY 3000 喷膜机;CM3000 切条机:美国 Bio-Dot 公

司生产;R134 台式高速冷冻离心机:Eppendorf 公司生产;CARY50 紫外可见分光光度仪:日本岛津生产;AKTA-FPLC 纯化系统:GE 公司生产。

### 1.3 方法

1.3.1 口蹄疫多抗血清的纯化 将 Asia 1/JSL/HeNZK/06 株口蹄疫高免血清用 33%硫酸铵初步提纯,再用 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱进行精细纯化,SDS-PAGE 鉴定抗体纯度,紫外分光光度法确定抗体的含量。

1.3.2 胶体金的制备 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒<sup>[8]</sup>,用分光光度计检测 OD<sub>523 nm</sub> 吸收值确定胶体金浓度。

1.3.3 IgG 最优 pH 的选择 取 9 个硅化处理的离心管,分别加入 1 mL 制备好的胶体金溶液。用 0.2 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液调节胶体金溶液 pH,分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5。在调好 pH 的胶体金溶液中各加入 25 μL 质量浓度为 2 μg·mL<sup>-1</sup> 的 Asia 1 型 FMDV 多抗,于振荡器振荡 10 min,室温静置 10 min。在离心管中各加入 100 μL 10%NaCl 溶液,混合充分并于室温静置 20 min,标记后用分光光度计测定 OD<sub>530 nm</sub>,以每个样本的 OD 值为 y 轴,pH 为 x 轴绘制曲线,在保证胶体金颜色正常的情况下,选择曲线与横轴相接近的点所代表的 pH 为最佳 pH。

1.3.4 IgG 最适浓度的选择 取 6 个硅化处理的离心管。分别加入 1 mL 制备好的胶体金溶液。不用调 pH。分别加入 0、7.45、9.32、12.45、18.63、37.26 μg 的 Asia 1 型 FMDV 多抗,于振荡器振荡 10 min,室温静置 10 min。在离心管中各加入 100 μL 10%NaCl 溶液,充分混合并于室温静置 20 min,做好标记后用分光光度计测定 OD<sub>530 nm</sub>,所得数据以 OD 值为 y 轴,抗体量为 x 轴绘制曲线,选择曲线与横轴相接近的点所代表的多抗的量为最佳标记量。

1.3.5 Asia 1 型免疫胶体金的制备 调节胶体金溶液至最佳 pH,按最佳标记量加入 Asia 1 型流行株多抗,磁力搅拌 15 min。加入 50 g·L<sup>-1</sup> BSA 至终质量浓度为 10 g·L<sup>-1</sup>,搅拌 15 min,制备好的 Asia 1 型免疫胶体金溶液离心,8 000 r·min<sup>-1</sup>,30 min 弃去上清(切忌倾倒)。用金胶缓冲液重悬沉淀,置 4 °C 保存备用。

1.3.6 试纸条的制备

1.3.6.1 胶体金结合垫:选用玻璃纤维膜作为结合垫,将制备好的胶体金标记的 Asia1/JSL/HeNZK/06

兔抗喷于结合垫上,37 °C 干燥 45 min,保存备用。

1.3.6.2 硝酸纤维素膜(NC)的制备:用喷膜仪在 NC 膜不同位置喷点检测带 Asia 1/XJ/AKT/03 兔抗和质控带羊抗兔 IgG 抗体,两线相距 7 mm,室温干燥,保存备用。

1.3.6.3 试纸条的组装:将吸取样品的样品垫、胶体金结合垫、带有质控带和检测带的 NC 膜及吸水纸依次贴在 PVC 衬板上,并切成宽 4 mm、长 6 cm 的试纸条装壳。

1.3.7 Asia 1 型 FMD /JSL 病毒的纯化 病毒液用 DETA 在 30 °C 下灭活 24 h,再加入硫代硫酸钠阻断,4 °C  $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 0.5 h 取上清。用聚乙二醇 6000 浓缩 FMD 病毒抗原,之后加三氯乙烯脱脂,用蔗糖密度梯度纯化 FMD 病毒抗原,收集沉淀即为 146S 抗原,用分光光度计检测  $\text{OD}_{259\text{ nm}}$  吸收值确定病毒含量,-70 °C 保存。

1.3.8 Asia 1 型口蹄疫试纸条的定性检测

1.3.8.1 检测结果的判读:将处理好的病毒液和正常细胞培养液(作为阴性样品)75  $\mu\text{L}$  加到制备好的试纸条的样品端,静置 15 min 观察结果。质控带和检测带都出现红色则判为阳性,只有质控带出现红色则判为阴性,质控带和检测带都不显色为无效。

1.3.8.2 特异性:用制备好的 Asia 1 型口蹄疫免疫层析试纸条,分别检测 O、A、Asia 1 型口蹄疫, SVDV 和正常细胞培养液。按 1.3.8.1 法进行操作和判定。

1.3.8.3 灵敏度检测:将 Asia 1 型 FMD /JSL 病毒抗原用稀释液作不同的稀释。按确定的最佳反应条件制备的胶体金试纸条,检测不同质量浓度的 FMD /JSL 病毒抗原,每个浓度重复 3 次。按照 1.3.8.1 法进行操作和判定,将试纸条检测到的最高稀释倍数为灵敏度。

1.3.8.4 田间样品检测:国家口蹄疫参考实验室保存,由病毒分离、反向间接血凝、VP1 测序定型等方法确定 FMDV 血清型的田间样品 142 份,其中 O 型 42 份,A 型 43 份,Asia 1 型 26 份,阴性 31 份。用试纸条检测。

1.3.9 Asia 1 型口蹄疫试纸条的定量检测

1.3.9.1 判定值的确定:用金标分析仪扫描读取阴性样品的 T/C 比值,共检测 20 次,20 个 T/C 比值的平均值和 3 倍标差之和则为判定值。

1.3.9.2 定量检测判定:将显色后的试纸条放入金标分析仪中扫描读取 T/C 比值,小于判定值的则为

阴性,大于判定值的则为阳性。

1.3.9.3 定量检测重复性:检测 6 个浓度的 FMD 病毒抗原样品,每个浓度检测 10 次,用金标分析仪扫描读取信号 T/C 比值。每个浓度样品 10 次检测的 T/C 比值的标差与平均值的比值为变异系数。

1.3.9.4 回收率:在线性检测范围内,检测已知浓度的 Asia 1 型 FMD 病毒抗原,根据金标分析仪读出的 T/C 比值和标准曲线计算出的浓度为检测浓度,检测浓度和理论浓度的比值百分率为回收率。分别检测理论质量浓度为 7.84、5.22、3.92、2.61、1.57、0.78  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 Asia 1 型 FMD 病毒抗原。

## 2 结果

### 2.1 测定提纯抗体纯度、蛋白含量

SDS-PAGE 电泳分析纯化的 FMDV Asia 1 IgG 进行,纯度  $\geq 98\%$ ;分光光度法测定各型纯化 IgG 的含量为 3.726  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2 胶体金的测定

制备好的胶体金用分光光度计检测(图 1),合格可用的胶体金溶液的检测波长  $\text{OD}_{523\text{ nm}}$  在 1.1~1.2。符合标记用胶体金要求。

### 2.3 FMD Asia 1 型抗体最适 pH

在保证胶体金颜色正常的情况下,将不同 pH 下制备的金标抗体检测所得的  $\text{OD}_{530\text{ nm}}$  值绘制曲线,结果如图 2 所示,当 pH 为 5.5 时,曲线最接近  $x$  轴,因此 pH5.5 为胶体金溶液的最佳标记 pH。

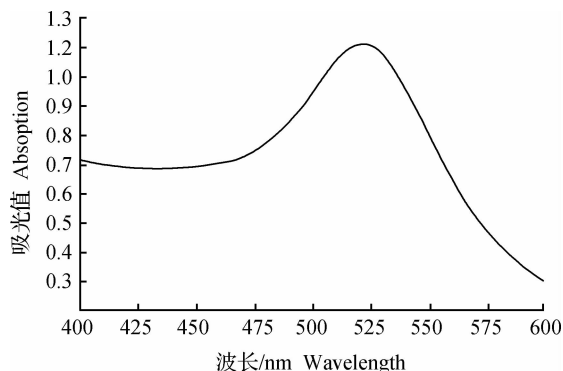


图 1 胶体金的紫外-可见扫描曲线

Fig. 1 Colloidal gold UV - visible scanning curve

### 2.4 Asia 1 型抗体标记最适量

在 pH 为 5.5 的胶体金溶液中,加入不同浓度的抗体进行标记,将测得的  $\text{OD}_{530\text{ nm}}$  值绘制曲线,结果如图 3 所示,当抗体量为 7.45  $\mu\text{g}$  时,曲线最接近  $x$  轴,此时的抗体量即为胶体金标记的最适量。

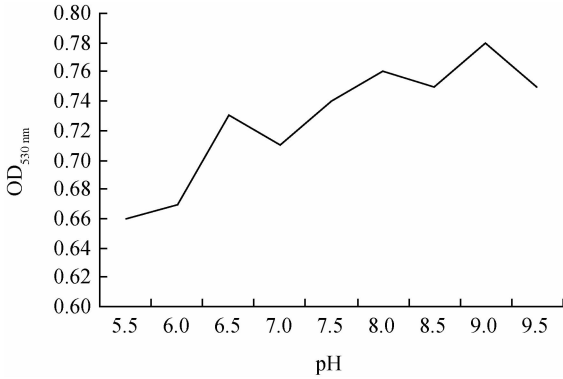


图 2 确定胶体金标记抗体的最佳 pH

Fig. 2 The selected optimal pH of IgG conjugated with colloidal gold

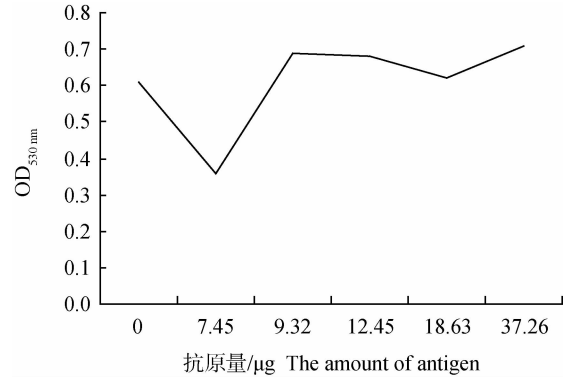
图 3 OD<sub>530 nm</sub> 值曲线法确定胶体金标记蛋白的最佳浓度结果

Fig. 3 The optimal concentration of gold colloid binding protein by OD<sub>530 nm</sub>

## 2.5 纯化 FMD /JSL 病毒抗原蛋白含量

收集 35%~45%蔗糖密度处的病毒抗原,即为 146S 抗原,测得  $A_{259 \text{ nm}} = 1.2177$ ,根据公式:病毒抗原含量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) =  $A_{259 \text{ nm}} \times 128.7$  ( $A_{259 \text{ nm}}$  - 空白),病毒抗原的含量为  $156.71 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 2.6 特异性与灵敏度

按照确定的最佳反应条件制备的 Asia 1 型口蹄疫免疫层析试纸条,分别检测 O、A 型口蹄疫、SVDV 和正常细胞培养液,检测结果均为阴性。型

别间无交叉反应。将 Asia 1 型 FMD /JSL 病毒抗原分别稀释为 15.67、1.567、0.78、0.52、0.39  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,可检测到的最高稀释倍数对应的质量浓度为  $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 4)。

## 2.7 田间样品的检测

用 Asia 1 型胶体金试纸条检测已确定血清型的 142 份样品的结果,见表 1。其中 A 型全部阴性,符合率为 100%;O 型全部阴性,符合率为 100%;Asia 1 型阳性 24 份,阴性 2 份,符合率为 92%。

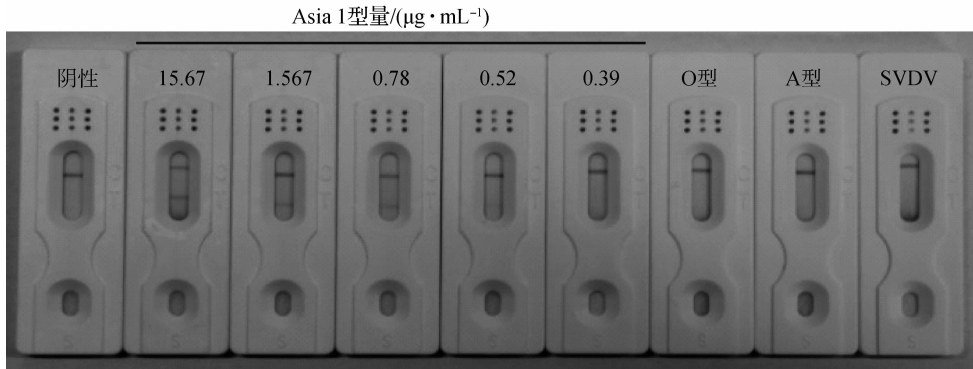


图 4 Asia 1 型 FMD 胶体金免疫层析试纸条特异性和敏感性

Fig. 4 Specified and sensitivity assay test results of FMD Asia 1 type gold immunochromatographic strip

表 1 Asia 1 型 FMD 胶体金试纸条符合率试验

Table 1 The corresponding test of FMD Asia 1 type gold immunochromatographic strip

样品 Sample	样品数	试纸条检测结果 Test results of immunochromatographic strip		符合率/% The corresponding rate
		阳性 Positive	阴性 Negative	
FMDV O	42	0	42	100
FMDV A	43	0	43	100
FMDV Asia 1	26	24	2	92
阴性样品	31	0	31	100
总计 Total	142	24	118	98.5

2.8 Asia 1 型口蹄疫试纸条的定量检测结果

2.8.1 判定值 用金标分析仪扫描读取阴性样品的 T/C 比值,共检测 20 次。20 个 T/C 比值的平均值和 3 倍标准差之和为判定值,判定值为 0.067 863。

2.8.2 标准曲线的建立 用金标分析仪检测不同浓度的 Asia 1 型 FMDV 抗原,每个浓度检测 10 次,取 10 次 T/C 比值的平均值。以 Asia 1 型 FMD 抗原浓度为横坐标(x),金标分析仪读值 T/C 比值作为纵坐标(y)作图,建立胶体金检测标准曲线。当 Asia 1 型 FMD 抗原浓度在 0.78 ~ 7.84  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,病毒抗原的质量浓度与其金标分析仪读值 T/C 比值之间呈良好的线性关系(图 5),线性回归方程为  $y=0.1958x+0.8397, R^2=0.9964$ 。R<sup>2</sup> 接近 1,证实建立标准曲线有较好的线性关系。

2.8.3 重复性 重复检测质量浓度为 0.78、1.96、2.61、3.92、5.22、7.84  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 Asia1 型

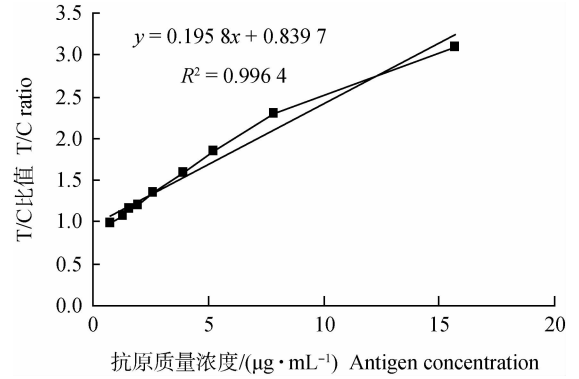


图 5 胶体金免疫层析试纸条检测 Asia 1 型 FMD 病毒抗原标准曲线

Fig. 5 Colloidal gold immunochromatographic test strip Asia 1 type FMDV antigen standard curve

FMDV 抗原,每个浓度检测 10 次,经过统计学 STDEV 计算得出标准差,变异系数为标准差与平均值的比值,由表 2 可以看出变异系数介于 0.2% ~ 5%。变异系数小于 20%证实有良好的重复性。

表 2 Asia 1 型胶体金试纸检测系统的变异系数(n=10)

Table 2 Asia 1 type of FMD colloidal gold test strip system coefficient of variation (n=10)

质量浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) Concentration	标准差 Standard deviation	平均值 Average	变异系数/% Coefficient of variation
0.78	$\pm 0.00228$	0.028	0.8
1.57	$\pm 0.00503$	1.151	5
2.61	$\pm 0.03426$	1.362	2
3.92	$\pm 0.03183$	1.589	0.2
5.22	$\pm 0.01308$	1.848	0.7
7.84	$\pm 0.03188$	2.298	1.1

2.8.4 回收率 由表 3 可见。理论质量浓度为 7.84、5.22、3.92、2.61、1.57、0.78  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 Asia 1 型 FMD 病毒抗原用金标分析仪检测后的质量浓度为

7.44、5.14、3.87、2.67、1.59、0.71  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,计算其回收率在 91% ~ 102%。基本满足回收率应为 90% ~ 110%标准,证明其定量检测准确度高。

表 3 Asia 1 型 FMD 胶体金免疫层析试纸条检测系统回收率

Table 3 Asia 1 type FMD colloidal gold immunochromatographic strip detection system recovery

T/C 比值 T / C ratio	检测质量浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) Detectable concentration	理论质量浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) Theoretical concentration	回收率/% Recovery
2.298	7.44	7.84	95
1.848	5.14	5.22	99
1.598	3.87	3.92	98
1.362	2.67	2.61	102
1.151	1.59	1.57	102
0.978	0.71	0.78	91

### 3 讨论

胶体金免疫层析技术(GICA)是 20 世纪 80 年代在胶体金标记技术和新材料技术基础上建立的一种独特的免疫学检测技术。它以检测速度快,简单,直观、便宜、适用田间检测备受关注<sup>[7]</sup>。但是该方法不能定量,只能用于定性和半定量的检测。目前胶体金免疫层析技术正朝着定量、高灵敏度、检测多元化的方向发展。

免疫层析试纸条定量检测技术是基于便携式光学传感器的一种新型的试纸条快速定量分析方法。常用的定量形式有 T/C 比值法和 T 线值法等。T 线值法是依据 T 线吸光值和待测物浓度呈一定的比例关系而定量。由于免疫层析试纸条上的免疫反应是一个动态的过程,T 线显色强度随时间的变化而逐渐增强,最后趋于稳定,而 T 线的显色会受到工作环境、样品差异等影响,产生误差。T/C 比值法是依据试纸条上 T、C 线的免疫反应在一定程度上受环境影响一致,从而可以在一定程度上消除工作环境,样品差异等的对试纸条显色差异的影响<sup>[9-13]</sup>。近年来免疫层析试纸条定量检测方法的文献逐渐增多。例如李怀明等<sup>[12]</sup>建立了基于荧光微球的克伦特罗免疫层析定量检测方法;李超辉等<sup>[10-11]</sup>建立了胶体金免疫层析试纸条定量检测猪尿中克伦特罗和胶体金免疫层析法定量检测猪肉中克伦特罗等。目前为止还未见到定量试纸条检测口蹄疫病毒的文献。口蹄疫病毒检测技术及定性的方法主要有病毒分离、病毒中和试验、ELISA 和 PCR,定量检测口蹄疫病毒方法有荧光定量 PCR,而荧光定量 PCR 针对口蹄疫病毒核酸定量。这些方法过程繁多,操作复杂,检测时间长,成本高,而且还需要专业的设备和技术人员。本研究快速简便、易操作,而且不需要专业技术人员,补充了血清学定量检测口蹄疫病毒的方法。

胶体金对蛋白的吸附效率主要取决于 pH,一般来说在接近蛋白质的等电点或偏碱的条件下,是二者最容易结合形成牢固的复合物,确定最佳 pH 后尤为重要。本方法在建立过程中,最适 pH 选择的时候,发现在蒋韬等<sup>[14]</sup>建立的口蹄疫病毒 O、A、Asia 1 型诊断试纸条胶体金免疫层析方法中,最适 pH 为 8.0,任维维等<sup>[15]</sup>得到的最适 pH 为 8.5,而本研究中最适 pH 为 5.5。在定量检测样品的过程中,试纸条加入样品后,1 min 后开始显色,随着反

应时间的延长,T、C 线的显色也在不断增强,约在 15 min 后进入稳定期,并且在 20 min 之内保持稳定。这就表明 T/C 比值法能在一定范围内消除免疫反应的动态差异。金标分析仪在读取 T/C 值的时候,测试结果会受到 T、C 线的粗细、背景颜色的干扰,金标分析仪设备性能等因素的影响。通常采用喷膜仪划膜,能够使 T、C 线粗细均匀一致,消除了 T、C 线对 T/C 值的影响。为了评价该检测系统的重复性,用 Asia 1 型 FMD 胶体金免疫层析试纸条检测不同浓度的 Asia 1 型 FMD 抗原,每个质量浓度进行 10 次重复测定,其变异系数在 0.2%~5%,变异系数小于 20%<sup>[16]</sup>,表明本研究用的胶体金试纸条具有良好的重复性。为评价该系统的准确性,测定了其回收率,在线性检测范围内,检测已知质量浓度的 Asia 1 型 FMD 病毒抗原,根据金标分析仪读出的 T/C 比值和标准曲线计算出的质量浓度为检测质量浓度,检测质量浓度和理论质量浓度的比值百分率为回收率。此方法的回收率在 91%~102%。回收率在 90%~110%结果为可接受<sup>[16]</sup>,表明本试验定量检测准确度高。

### 4 结论

选择 Asia 1 型 FMDV 流行株的多克隆抗体,利用胶体金免疫层析技术研制了 Asia 1 型口蹄疫胶体金试纸条,检测 O、A 型口蹄疫,与口蹄疫症状相似的猪水疱病病毒及正常细胞培养基检测结果均为阴性,型间没有交叉反应,特异性较好;并结合金标分析仪建立了 Asia 1 型口蹄疫病毒抗原胶体金定量检测的方法,可以在 15 min 内完成对 Asia 1 型 FMD 病毒抗原定量的检测,灵敏度  $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,线性范围在  $0.78 \sim 7.84 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;变异系数在 0.2%~5%,证明该方法重复性好;回收率在 91%~102%,证明定量检测准确度高。此方法快速,简单,克服了传统试纸条无法定量的缺陷。

### 参考文献:

- [1] MOONEN P, SCHRIJVER R. Carriers of foot-and-mouth disease virus; a review [J]. *Vet Q*, 2000, 22 (4):193-197.
- [2] 谢庆阁. 口蹄疫[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [3] 蒋韬,梁仲,陈涓,等. 检测 Asia 1 型口蹄疫病毒的胶体金免疫层析法的建立及应用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(11):1021-1024.

- [4] 刘 明,徐 娜,李志勇,等. 口蹄疫诊断技术的研究进展[J]. 生物技术通报,2010(5):70-73.
- [5] 花群义,金宁一,周晓黎,等. 应用实时荧光定量 Taq-Man RT-PCR 检测口蹄疫病毒[J]. 中国兽医学报,2005,25(2):116-119.
- [6] 刘艳霞,张贵刚. 口蹄疫病毒完整病毒粒子定量方法的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(9):82-85.
- [7] FAULK W P, TAYLOR G M. An immunocolloid method for the electron microscope [J]. *Immunochemistry*,1971,8(11):1081-1083.
- [8] BASSAB C, SYAMAL R. Manufacturing high-quality gold sol [J]. *IVD Technol*,2001,8:46-54
- [9] 蒋 韬. 免疫层析技术在口蹄疫 POCT 中的应用研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2012.
- [10] 李超辉,罗 薇,徐 波,等. 胶体金免疫层析试纸条定量检测猪尿中克伦特罗 [J]. 食品科学,2013,34(12):114-118.
- [11] 李超辉,陈雪岚,郭 亮,等. 胶体金免疫层析法定量检测猪肉中克伦特罗[J]. 食品与发酵工业,2013,39(4):167-172.
- [12] 李怀明,赖卫华,许恒毅,等. 基于荧光硅球的克伦特罗快速定量免疫层析试纸条的研制[J]. 分析化学,2011,39(11):1647-1652.
- [13] YANG Q H, GONG X Q, SONG T, et al. Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein[J]. *Biosen Bioelectron*,2011,30(1):145-150.
- [14] 蒋 韬,梁 仲,陈 涓,等. 口蹄疫病毒 O、A、Asia 1 型定型诊断胶体金免疫层析方法的建立[J]. 中国农业科学,2008,41(11):3801-3808.
- [15] 任维维,梁 仲,智晓莹,等. 口蹄疫病毒通用型金标检测试纸条诊断方法的建立[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(2):255-262.
- [16] 毕 波,吕 元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.

(编辑 白永平)