



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103983780 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 13

(21) 申请号 201410219718. X

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 05. 22

(71) 申请人 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

地址 730050 甘肃省兰州市七里河区小西湖
硷沟沿 335 号

(72) 发明人 贺洞杰 时永杰 杨明 张茜
贺奋义 郭慧琳 朱新强 张登基
曾玉峰 周磊

(74) 专利代理机构 兰州中科华西专利代理有限公司 62002

代理人 李艳华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

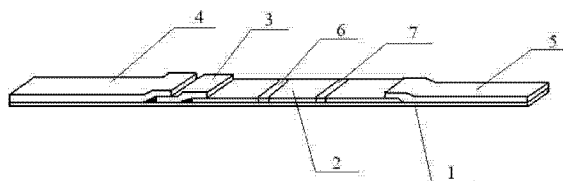
权利要求书2页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条, 它包括 PVC 胶板、硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫和吸水垫; 所述 PVC 胶板的一端粘附有所述样品垫, 其另一端粘附有所述吸水垫, 其中部依次粘附有所述胶体金结合垫、所述硝酸纤维素膜; 所述胶体金结合垫的一端与所述样品垫相粘附, 其另一端与所述硝酸纤维素膜相粘附, 该硝酸纤维素膜与所述吸水垫相粘附; 所述胶体金结合垫包被了带有抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白; 所述硝酸纤维素膜上沿样品流动方向依次设有检测线、质控线。本发明可快速、简便、准确、无需任何仪器设备就能检测鸽新城疫。



1. 检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:它包括 PVC 胶板(1)、硝酸纤维素膜(2)、胶体金结合垫(3)、样品垫(4)和吸水垫(5);所述 PVC 胶板(1)的一端粘附有所述样品垫(4),其另一端粘附有所述吸水垫(5),其中部依次粘附有所述胶体金结合垫(3)、所述硝酸纤维素膜(2);所述胶体金结合垫(3)的一端与所述样品垫(4)相粘附,其另一端与所述硝酸纤维素膜(2)相粘附,该硝酸纤维素膜(2)与所述吸水垫(5)相粘附;所述胶体金结合垫(3)包被了带有抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白;所述硝酸纤维素膜(2)上沿样品流动方向依次设有检测线(6)、质控线(7)。

2. 如权利要求 1 所述的检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:所述检测线(6)为以线形包被纯化的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体。

3. 如权利要求 1 所述的检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:所述质控线(7)为以线形包被纯化的羊抗鼠抗体。

4. 如权利要求 1 所述的检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)免疫抗原的制备:

把鸽 I 型副粘病毒 F 基因片段连接到 PGEX-4T-1 原核表达载体中,经 IPTG 诱导和分析,F 蛋白在大肠杆菌 BL21 中得到高效表达,提取包涵体蛋白作为免疫抗原;

(2)抗体的制备:

将抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白免疫 BALB/C 小鼠按照常规的单克隆抗体制备技术制备抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体,并进行纯化,即得纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体;

(3)将硝酸纤维素膜(2)粘附于 PVC 胶板(1)的中部;

(4)将所述纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体涂到硝酸纤维素膜(2)上,包被所述硝酸纤维素膜(2)的一个区域,得到检测线(6);

(5)将纯化的羊抗鼠抗体包被所述硝酸纤维素膜(2)的另一个区域,得到质控线(7);

(6)制备抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液:

首先按柠檬酸还原法制备胶体金溶液,然后用 0.1mol/LK₂CO₃ 调节胶体金溶液的 pH 值至 9.0~9.5,分别取 1mL 胶体金和 50 μg 的所述纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体,搅拌混合,40min 后再加体积浓度为 5%BSA 使其最终浓度为 1%,其次以 3000r/min 的速率离心 20min,弃去由凝聚的金胶粒形成的沉淀,得到上清液;最后,所述上清液在温度为 4℃的条件下以 12000rpm 的速率离心 30min,得到沉淀物,该沉淀物用 100 μL 的 0.015M 且 pH=7.4 的胶体金复溶液溶解,在 4℃下保存,即得抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液;

(7)将玻璃纤维膜浸在所述抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液中,经浸透、晾干,即得胶体金结合垫(3);所述胶体金结合垫(3)在 37℃下干燥至恒重后,粘附于所述硝酸纤维素膜(2)上远离所述质控线(7)的一端;

(8)将样品垫(4)放入 0.05M、pH=8.5 的 Tris 溶液中浸没处理,得到处理后的样品垫(4);

(9)在所述胶体金结合垫(3)的一端粘上所述处理后的样品垫(4),其另一端粘附所述硝酸纤维素膜(2);所述处理后的样品垫(4)粘附于所述 PVC 胶板(1)的一端;所述吸水

垫(5)与所述硝酸纤维素膜(2)粘附,并粘附于所述PVC胶板(1)的另一端。

5. 如权利要求4所述的检测鸽I型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤(6)中0.015M且pH=7.4的胶体金复溶液是指在1L PBS溶液中含有20g蔗糖、1g BSA、1gPVP、0.02g叠氮钠的PBS溶液。

6. 如权利要求4所述的检测鸽I型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:所述步骤(8)中0.05M、pH=8.5的Tris溶液是指在1L Tris溶液中含有1g BSA、1g PVP、500mL Tween-20、0.02g叠氮钠的Tris溶液。

检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及鸽 I 型副粘病毒免疫分析技术领域,尤其涉及检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条及制备方法。

背景技术

[0002] 鸽 I 型副粘病毒(Pigeon Paramyxovirus 1, PPMV- I) 病又称鸽瘟或鸽新城疫,是一种由禽 I 型副粘病毒(Avian Paramyxovirus 1, PMV- I) 引起的、流行于鸽群的高度接触性急性传染病,PPMV- I 引起鸽群突然发病,迅速蔓延,临床症状上与鸡新城疫嗜神经速发株引起的十分类似,主要临床特点是肠炎、下痢和神经症状,尤以嗜神经速发型为多见,发病率和死亡率都很高。鸽 I 型副粘病毒对不同品种、不同年龄的鸽都有感染性,传播迅速,死亡率高。在自然条件下,肉鸽、信鸽和赛鸽等各类鸽子均可感染发病;而且不同年龄的鸽子都可感染,发病率可高达 80%~90% 以上,死亡率因鸽子的年龄、品种及其免疫状况和饲养管理状况不同而有很大差异,为 20%~80% 之间,平均 30%~50%,乳鸽感染后,死亡率可达 60%~80%,处于孵化期的种胚感染后可全部死亡。成年鸽感染后,呈慢性经过,无明显的死亡高峰,最后因采食困难、消瘦衰竭死亡。该病的发生无明显的季节性。一年四季均可发生,但多以秋冬、冬春多发。该病与新城疫一样,通过空气中的尘埃、污染的器具、饲料和饮水传播,潜伏期 1~10d,一般 1~6d。鸽新城疫病其传播迅速、发病率高,发病后死亡率较高,给养鸽业造成的影响和危害巨大,是养鸽业的重点防控的传染病之一。

[0003] 鸽 I 型副粘病毒病一般通过临床症状和剖检病变可作出初步诊断,单要确诊,则需要进一步的方法,对于鸽新城疫的诊断方法目前大体可分为两种:血清学方法和分子生物学方法。血清学方法除了经典的血凝(HA) 试验、血凝抑制(HI) 试验、荧光抗体技术(IFA)、琼脂扩散试验(AGP)、乳胶凝集试验(LAT)、鸡胚中和试验、蚀斑中和试验等方法以外,还有利用单克隆抗体进行检测 ELISA 诊断方法等。虽然 HA 和 HI 因具有操作简单等优点而被大多数的鸽场用于鸽新城疫的抗体监测和的诊断,但 HA 和 HI 试验常常会因为各种原因造成误差,而且 HI 在检测低水平的抗体时不够灵敏,缺乏一定的可靠性。荧光抗体技术简便、快速、敏感、准确、特异,适用于快速诊断,抗原在 -70℃ 可长期保存,且全部试验过程只需要 1h,因而适用于较大规模的定性监测 SPF 鸽抗体。ELIAS 诊断方法是目前研究最多、进展最快的技术,各种形式的 ELIAS 广泛应用于抗原、抗体的检测;与其它血清学相比,ELIAS 具有敏感性好、特异性强、操作简便、可重复使用、抗原用量少的特点,同时结果便于长期保存,特别适合于基层兽医部门和鸽场对 NDV 的血清学诊断和流行病学普查。随着分子生物学技术的迅猛发展,现在也运用核酸技术对 PPMV- I 进行检测,其中尤以 PCR、核酸探针技术、限制性内切酶片段长度多态性分析(RFLP)和序列分析应用较为广泛。以上这些方法虽然均有各自的优点,但是均存在费时费力、需要特殊的仪器设备和专门的操作人员才能进行的缺点,很难在基层兽医部门推广应用。

[0004] 目前单克隆抗体在新城疫诊断方面的应用已经十分广泛,单克隆抗体用于 NDV 诊断,具有快速、灵敏和特异性强的优点,并可用于强毒和弱毒的鉴别诊断,这是传统的血清

学方法所办不到的。单克隆抗体已渗透到 ND 研究的许多领域。

[0005] 鸽新城疫病毒编码两种囊膜糖蛋白,融合蛋白(F)和血凝素-神经氨酸酶(HN),F 蛋白位于囊膜外表面,形成纤突,对鸽新城疫的毒力及感染性起决定性作用,是鸽新城疫的主要免疫原性蛋白;F 基因还具有较高的遗传稳定性,是新城疫基因分型的主要依据,也是决定鸽新城疫致病力强弱的关键因素;F 基因的遗传变异与鸽新城疫的变异和流行密切相关,是鸽新城疫分子流行病学研究的首选基因,因此,F 基因是鸽新城疫的诊断和防治制剂研究的重要候选基因。

[0006] 胶体金免疫层析(GICA)技术是 90 年代初在免疫渗滤技术基础上建立的一种简易快速的免疫学检测技术,是一种将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术。1971 年 Faulk 和 Taylor 利用胶体金溶胶与兔抗沙门氏菌血清结合,作为标记探针,用免疫组织化学技术检测沙门氏细菌的表面抗原,开创了胶体金在免疫分析领域应用的先河。免疫胶体金技术是继荧光素、酶、同位素及乳胶标记技术之后的一种新型标记技术。免疫胶体金层析技术利用胶体金本身的显色特点结合免疫层析技术即胶体金免疫层析法(GICA)诊断特异性的待测物,大多与单克隆抗体技术联合应用,具有特异性强、灵敏度高、携带方便、检测时间短、检测不需任何仪器设备及安全可靠等优势,20 世纪 80 年代末在临床诊断领域开始应用,由 Osikowicz 和 Beggst 等最先用于人绒毛膜促性腺激素(HCG)的测定,近年来经不断完善,已有大量商品化试剂条在人医中得到广泛应用,也掀起了免疫胶体金技术研究和利用的热潮。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是提供一种快速、简便的检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条。

[0008] 本发明所要解决的另一个技术问题是提供该检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条的制备方法。

[0009] 为解决上述问题,本发明所述的检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条,其特征在于:它包括 PVC 胶板、硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫和吸水垫;所述 PVC 胶板的一端粘附有所述样品垫,其另一端粘附有所述吸水垫,其中部依次粘附有所述胶体金结合垫、所述硝酸纤维素膜;所述胶体金结合垫的一端与所述样品垫相粘附,其另一端与所述硝酸纤维素膜相粘附,该硝酸纤维素膜与所述吸水垫相粘附;所述胶体金结合垫包被了带有抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白;所述硝酸纤维素膜上沿样品流动方向依次设有检测线、质控线。

[0010] 所述检测线为以线形包被纯化的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体。

[0011] 所述质控线为以线形包被纯化的羊抗鼠抗体。

[0012] 如上所述的检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)免疫抗原的制备:

把鸽 I 型副粘病毒 F 基因片段连接到 PGEX-4T-1 原核表达载体中,经 IPTG 诱导和分析,F 蛋白在大肠杆菌 BL21 中得到高效表达,提取包涵体蛋白作为免疫抗原;

(2)抗体的制备:

将抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白免疫 BALB/C 小鼠按照常规的单克隆抗体制备技术制备抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体,并进行纯化,即得纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体;

(3)将硝酸纤维素膜粘附于 PVC 胶板的中部;

(4)将所述纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体涂到硝酸纤维素膜上,包被所述硝酸纤维素膜的一个区域,得到检测线;

(5)将纯化的羊抗鼠抗体包被所述硝酸纤维素膜的另一个区域,得到质控线;

(6)制备抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液;

首先按柠檬酸还原法制备胶体金溶液,然后用 0.1mol/LK₂CO₃ 调节胶体金溶液的 pH 值至 9.0~9.5,分别取 1mL 胶体金和 50 μg 的所述纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体,搅拌混合,40min 后再加体积浓度为 5%BSA 使其最终浓度为 1%,其次以 3000r/min 的速率离心 20min,弃去由凝聚的金胶粒形成的沉淀,得到上清液;最后,所述上清液在温度为 4℃的条件下以 12000rpm 的速率离心 30min,得到沉淀物,该沉淀物用 100 μL 的 0.015M 且 pH=7.4 的胶体金复溶液溶解,在 4℃下保存,即得抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液;

(7)将玻璃纤维膜浸在所述抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液中,经浸透、晾干,即得胶体金结合垫;所述胶体金结合垫在 37℃下干燥至恒重后,粘附于所述硝酸纤维素膜上远离所述质控线的一端;

(8)将样品垫放入 0.05M、pH=8.5 的 Tris 溶液中浸没处理,得到处理后的样品垫;

(9)在所述胶体金结合垫的一端在粘上所述处理后的样品垫,其另一端粘附所述硝酸纤维素膜;所述处理后的样品垫粘附于所述 PVC 胶板的一端;所述吸水垫与所述硝酸纤维素膜粘附,并粘附于所述 PVC 胶板的另一端。

[0013] 所述步骤(6)中 0.015M 且 pH=7.4 的胶体金复溶液是指在 1L PBS 溶液中含有 20g 蔗糖、1g BSA、1gPVP、0.02g 叠氮钠的 PBS 溶液。

[0014] 所述步骤(8)中 0.05M、pH=8.5 的 Tris 溶液是指在 1L Tris 溶液中含有 1g BSA、1g PVP、500mL Tween-20、0.02g 叠氮钠的 Tris 溶液。

[0015] 本发明与现有技术相比具有以下优点:

1、本发明首先构建鸽新城疫 F 蛋白原核表达载体,在大肠杆菌高效表达 F 蛋白,分析重组蛋白的免疫原性,用表达的 F 蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体。然后采用柠檬酸三钠还原法成功制备胶体金,以制备好的胶体金对单克隆抗体进行标记。再以胶体金标记的单克隆抗体制备免疫金垫,吸附于玻璃纤维;最后以单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 分别喷点于硝酸纤维素膜上,成为 T 线和 C 线,制备成一种快速、简便、准确、无需任何仪器设备就能检测鸽新城疫免疫层析快速检测试纸条。

[0016] 2、本发明经试验,所得的试纸条特异性强,不与鸡传染性支气管炎、鸡减蛋综合征、鸡马立克、猪瘟、猪传染性胃肠炎、羊痘、大肠杆菌、沙门氏菌等其它样品发生交叉反应,但可与新城疫发生交叉反应,因此,可用于鸽 I 型副粘病毒病和鸡新城疫的诊断;同时,本发明准确性高;批间和批内的重复性较好;且制备的试纸条置 4℃避光密封干燥保存一年,37℃放置 10 天,对其性能没有任何影响。

[0017] (1)有效性检验:

随机从同批待测试剂盒中抽取 10 个试纸条,在加样孔加入 100 μ L 生理盐水,平放,等待 3~5min 观察检测卡中部检视窗的结果,但不可超过 20min 读结果,两条检测线中当质控线出现反应而检测线不出现反应时,可判定试纸条有效;当两线同时出现反应或只有检测线出现反应,而质控线不反应时,可判定该试纸条无效。

[0018] 结果:10 条试纸条的质控线均出现红色条带,而检测线均未出现条带,表明所制备的试纸条均有效。

[0019] (2)阴阳相符合试验:

①阳性符合试验:

随机从同批待测试剂盒中抽取 10 个试纸条,检测鸽 I 型副黏病毒阳性样品 10 份,测定时取 100 μ L 样加在试纸条加样孔中,平放,等待 3~5min 观察检测卡中部检视窗的结果,但不可超过 20min 读结果,两条检测线同时出现时,判为阳性。

[0020] 结果:10 条试纸条两条检测线均出现红色条带,表明阳性符合率为 100%。

[0021] ②阴性符合试验:

随机从同批待测试剂盒中抽取 10 个试纸条,检测鸽 I 型副黏病毒阴性样品 10 份,测定时取 100 μ L 阴性样品加在试纸条加样孔中,平放,等待 3~5min 观察试纸条中部检视窗的结果,但不可超过 20min 读结果,两条检测线中当质控线出现反应而检测线不出现反应时,判为阴性。

[0022] 结果:10 条试纸条的质控线均出现红色条带而检测线均没有出现红色条带,表明阴性符合率为 100%。

[0023] (3)重复性:

将不同批次的试纸条各检测 3 份鸽 I 型副黏病毒阳性尿囊液和 3 份阴性尿囊液,每个样品重复检测 5 次,看其重复性是否良好。

[0024] 结果:检测结果一致,表明重复性良好。

[0025] (4)灵敏性试验:

将 3 份不同血凝价的鸽 I 型副黏病毒尿囊液进行倍比稀释后用试纸条检测,比较血凝试验和试纸条灵敏度。结果见表 1。

[0026] 表 1 灵敏性试验结果

样品	血凝效价	样品稀释倍数						
		2	4	8	16	32	64	128
1	2^8	+	+	+	+	+	-	-
2	2^7	+	+	+	+	-	-	-
3	2^8	+	+	+	+	+	-	-

由表 1 可以看出,当血凝效价为 2^8 样品稀释 32 倍,血凝效价为 2^7 样品稀释 16 倍后,本发明所制备的试纸条可以检测为阳性,也就是说本发明所制备的试纸条可以检测血凝效价 $\geq 2^3$ 的病毒液。

[0027] (5)特异性试验:

将鸡新城疫、鸡传染性支气管炎、鸡减蛋综合征、鸡马立克、猪瘟、猪传染性胃肠炎、羊痘、大肠杆菌、沙门氏菌等几种样品用本发明所制备的试纸条进行检测,观察其他样品与鸽

I 型副黏病毒检测结果是否一样。

[0028] 结果：只有鸡新城疫与鸽 I 型副黏病毒检测结果一样，都出现两天红色条带，其余样品只有质控线出现红色条带，而检测线没有条带出现。因此，所制备的胶体金检测试纸条可与新城疫发生交叉反应，而不与上述其它样品发生交叉反应，该试纸条的特异性强。

[0029] (6)稳定性试验：

①随机从同批待测试剂盒中抽取足量的检测卡在 37℃ 条件下放置 10d，每隔两天抽取检测卡进行试验，观察其稳定性。

[0030] 结果：试剂盒在检测阳性质控品时均一性仍为 100%。

[0031] ②将试纸条置于 4℃ 干燥密封保存，每隔一月进行试纸条效果检测，观察其稳定性。

[0032] 结果：在 12 个月内试剂盒在检测阳性质控品时均一性仍为 100%。

[0033] (7)精密性：

随机从 3 批待测试剂盒中各抽取 10 个试纸条检测同一份鸽 I 型副黏病毒阳性尿囊液，各试纸条之间的检测线和对照线显色应均匀一致，对 3 个批次之间检测卡的检测线和对照线显色结果变异数进行统计，按照公式计算批间变异系数 (CV 值)。

[0034] $CV = (\text{最大变异数} - \text{最小变异数}) / \text{总样本数} \times 100\%$

结果：检测相同样品浓度的阳性质控品时，三个批次检测卡的检测线和对照线显色均匀一致， $CV=0$ 。

[0035] 3、本发明经临床动物实验和临床应用，证明其特异性强、准确性高，可以作为临床检测新城疫的方法应用。

[0036] (1)临床动物实验(鸽 I 型副黏病毒病和鸡新城疫病人工感染实验)：

取 HI 试验阴性的 2 月龄鸡和鸽子 40 只，各分为 8 组，每组 10 只，将不同来源的鸽 I 型副黏病毒尿囊液和鸡新城疫病毒尿囊液分别进行腿部肌肉注射，每只鸡 0.25mL。

[0037] 攻毒后第三天便有鸡出现症状，表现为体温升高达 43~44℃，咳嗽，黏液增多，呼吸困难而引颈张口、呼吸出声，鸡冠和肉髯呈暗红色或紫色。精神委顿，食欲减少或丧失，渴欲增加，羽毛松乱，不愿走动，垂头缩颈，翅翼下垂，鸡冠和肉髯呈紫色，眼半闭或全闭，状似昏睡。病鸡咳嗽，有黏性鼻液，呼吸困难，有时伸头、张口呼吸，发出“咯咯”的喘鸣声，或突然出现怪叫声。口角流出大量黏液，为排除黏液，常甩头或吞咽。嗦囊内积有液体状内容物，倒提时常从口角流出大量酸臭的暗灰色液体。排黄绿色或黄白色水样稀便，有时混有少量血液。后期粪便呈蛋清样。部分病例中，出现神经症状，如翅、腿麻痹，站立不稳。

[0038] 在实验鸡和鸽子发病后，每天以灭菌棉拭子从鸡和鸽子的咽喉刮取内容物，注意尽量刮取粘膜组织。置于内含 1000IU/mL 双抗的 PBS 的灭菌小离心管内，每管 0.5 mL，-20℃ 保存。每天按时观察鸡的发病情况，对于出现死亡的鸡应立即采取病料，取其脑、肝、脾、肾、胰等组织，置灭菌研磨器中充分剪碎并研磨，按 1:3 的比例将病料与含双抗的 PBS 混合制成组织乳悬液，-20℃ 保存备用。在发病后第五天，对全部存活的实验鸡和鸽子捕杀，取其脑、肝、脾、肾、胰等组织，置灭菌研磨器中充分剪碎并研磨，按 1:3 的比例将病料与含双抗的 PBS 混合制成组织乳悬液，-20℃ 保存备用。

[0039] 每天采集棉拭子，并对死亡情况进行记录，将每天采集的棉拭子及病料化开，用制备的试纸条检测，看攻毒鸡是否都能测出阳性结果。与此同时按照 GB/T16550-2008 新城疫

诊断技术的方法对病毒分离,进行 HA 和 HI 试验,比较试纸条检测效果与病毒分离在敏感性 & 特异性等方面的差异。结果见表 2。

[0040] 表 2 :临床检验样品试验结果

组别	实验动物	病毒分离阳性数 (HA,HI)	试纸条检测阳性数	
			棉拭子	病料
1	鸽子	10	10	10
2		10	10	10
3		10	10	10
4		10	10	10
5	鸡	10	9	10
6		10	10	10
7		10	10	10
8		10	9	10
合计		80	78	80

由表 2 可知,应用病毒增殖,收集尿囊液做 HA、HI 试验,结果与试纸条检测棉拭子的符合率为 97. 5%,与试纸条检测病料的符合率为 100%,试纸条检测棉拭子的符合率略低于检测病料的符合率,主要与棉拭子病毒含量有关,可能与在棉拭子采集时没有采到有效病料有关。尽管如此,试纸条检测的符合率和病毒分离的符合率也达到 97% 以上,说明其特异性是比较强的,可以作为临床检测新城疫的方法应用。

[0041] (2)临床应用 :

2011~2013 年,分别在甘肃省各县市养殖场及动物防疫部门应用鸽 I 型副粘病毒病的免疫胶体金层析快速诊断试纸条 3000 条,对各养鸽场和养鸡场疑似鸽 I 型副粘病毒病和鸡新城疫 1500 例用鸽 I 型副粘病毒病的免疫胶体金层析快速诊断试纸检测,确诊 800 例,同时把阳性病例以血凝试验和血凝抑制试验进行诊断,结果,两者的符合率达到 95% 以上,表明建立的免疫诊断试纸条在临床上检测鸽 I 型副粘病毒病和鸡新城疫具有较高的准确性,可以作为临床上鸽 I 型副粘病毒病和鸡新城疫的诊断方法进行应用。

[0042] 4、本发明具有操作简单、快速、敏感和特异性好的特点,并且价格低廉,适用于基层或临床检测鸽 I 型副粘病毒病和鸡新城疫病毒,通过棉拭子活体采集鸽或鸡的咽喉分泌物,全过程只需 10~15 min,操作人员无需专业培训,按照说明书即可完成操作。因此,本发明的推广应用,不但缩短确诊时间,缩短防治措施采取的准备时间,而且可降低鸽和鸡鸽 I 型副粘病毒病和新城疫的死亡率,杜绝这两种疫病的蔓延,同时降低了企业的防疫费用,减少了养殖企业的经济损失,促进养禽产业的发展。

附图说明

[0043] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的说明。

[0044] 图 1 为本发明的结构示意图。

[0045] 图中：1—PVC 胶板 2—硝酸纤维素膜 3—胶体金结合垫 4—样品垫 5—吸水垫 6—检测线 7—质控线。

具体实施方式

[0046] 如图 1 所示,检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条,它包括 PVC 胶板 1、硝酸纤维素膜 2、胶体金结合垫 3、样品垫 4 和吸水垫 5。PVC 胶板 1 的一端粘附有样品垫 4,其另一端粘附有吸水垫 5,其中部依次粘附有胶体金结合垫 3、硝酸纤维素膜 2;胶体金结合垫 3 的一端与样品垫 4 相粘附,其另一端与硝酸纤维素膜 2 相粘附,该硝酸纤维素膜 2 与吸水垫 5 相粘附;胶体金结合垫 3 包被了带有抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白;硝酸纤维素膜 2 上沿样品流动方向依次设有检测线 6、质控线 7。

[0047] 其中:检测线 6 为以线形包被纯化的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体。

[0048] 质控线 7 为以线形包被纯化的羊抗鼠抗体。

[0049] 该检测鸽 I 型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

(1)免疫抗原的制备:

把鸽 I 型副粘病毒 F 基因片段连接到 PGEX-4T-1 原核表达载体中,经 IPTG 诱导和分析, F 蛋白在大肠杆菌 BL21 中得到高效表达,提取包涵体蛋白作为免疫抗原。

[0050] ①鸽 I 型副粘病毒 F 基因原核表达载体的构建:

a. 表达引物的设计:

利用 DNASTAR 软件根据鸽新城疫 F 基因序列设计引物,扩增 F 基因 151bp~1074bp 之间 924bp 的基因片段,并引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点,并加保护碱基,其序列如下:

上游:5' CCGGAATTCATGAATATGTACACCGCATCTCAG3' ,

下游:5' CCGCTCGAGTTAACCTGGAGACATGGGAAAC3' ,

由上海英俊生物科技有限公司合成并经 PAGE 电泳纯化,使用前用超纯水溶解,浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$, -20℃ 保存备用。

[0051] b. 目的片段的 PCR 扩增:

PCR 反应管中反应体系如下:

模板(质粒)	1.0 μL
10×PCR buffer	5.0 μL
dNTP Mixture	4.0 μL
上、下游引物(50 pmol/ μL) 各	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.5 μL
灭菌无离子水	补至 50 μL

将 PCR 管中的液体混匀瞬时离心后放置于 PCR 扩增仪中,反应的体系如下:

94°C	5 min	1 Cycles
94°C	50 sec	} 30 Cycles
55°C	50sec	
72°C	1min	
72°C	10 min	1 Cycles

扩增完成之后,取 PCR 产物 5 μ L 在 1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭,EB)中进行电泳观察结果。

[0052] c. 进行 PCR 产物凝胶回收与纯化:用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒进行,具体方法如下:

i 将扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,称取 1.5 mL eppendorf 管的重量,并记录下来;

ii 在紫外灯照射的条件下,从琼脂糖凝胶上切下目的片段,放置管中,并在管上标记清楚;将胶块尽可能切碎,这样可加快胶块融化,提高回收率;

iii 称胶块与 1.5 mL eppendorf 管的重量,计算胶块体积(以 1mg=1 μ L 计算);

iv 向胶块中加入 3 倍胶块重量的胶块融化液 DR- I Buffer;

v 上下颠倒均匀混合后放置于 75°C 水浴中 10 min,以融化胶块,这个过程中应轻柔的上下颠倒 1.5 mL eppendorf 管,使胶块充分融化;

vi 向充分融化的胶块液中加入 1/2 体积 DR- I Buffer 量的 DR- II Buffer,轻柔的混合均匀;

vii 将已混合好的溶液吸入 spin column 中,12000 r/min 离心 1 min;

viii 将管中的滤液再吸入 spin column 中相同转速在离心一次,此操作可提高 DNA 回收率,弃去滤液 A;然后向 spin column 中加入 500 μ l 的 RinseA,12000r/min 离心 30s,弃去滤液 B;其次向 spin column 中加入 700 μ l 的 RinseB,12000 r/min 离心 30 s,弃去滤液 C;再向 spin column 中加入 700 μ l 的 RinseB,12000 r/min 离心 30 s,弃去滤液 D,最后 12000 r/min 离心 1 min;

ix 将 spin column 放置于新的 1.5 mL eppendorf 管上,将水或洗脱液加在 spin column 膜的中央,室温静置 1 min;

x 12000 r/min 离心 1 min,收集到得液体即为回收的 DNA 片段。

[0053] d. 目的片段和载体的酶切与回收:

酶切反应体系如下:

F 基因片段 PCR 回收产物和 PGEX-4T-1 载体	10 μ L
10 $\times$ 限制性内切酶缓冲液(Buffer R)	2 μ L
EcoR I	1.0 μ L
Xho I	1.0 μ L
灭菌无离子水	补至 20 μ L

将上述液体轻柔混匀后瞬时离心,放置 37℃水浴酶切 5h。之后将酶切产物进行电泳,紫外灯照射下切下目的条带,用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 试剂盒回收纯化目的片段和载体片段,方法同上,之后电泳观察回收情况。

[0054] e. 目的片段与载体的连接:

连接体系如下:

回收回来的酶切处理的的目的片段	12 μ L
PGEX-4T-1 质粒	4 μ L
加入 10 $\times$ Ligase buffer	2 μ L
T4DNA 连接酶	2 μ L

将混合液体轻柔混合后瞬时离心,之后 4℃连接过夜。

[0055] f. 感受态细胞的制备:

i 将冻存的 BL21 (DE3) 菌种划线接种在不含氨苄青霉素(Amp⁻) 的 LB 琼脂平板(0.5% 酵母提取物、1% 蛋白胨、1% NaCl,1% 琼脂粉,用 NaOH 调 pH 值至 7.0,15 磅 15min 高压灭菌)上,37℃培养 12h;

ii 从 LB 琼脂平板中挑取 BL21 (DE3) 单菌落接种于 3mLLB 培养基中振荡培养过夜;

iii 取 30 μ L 过夜培养物接种于 3mLLB 培养基中剧烈振荡培养约 3h,至 OD600 为 0.6;

iv 无菌条件下转移细菌培养物至用冰预冷的 eppendorf 管中(每管 1mL),冰浴 10min 冷却;

v 4℃ 5000r/min 离心 10min,弃上清,倒置离心管除尽液体。加入 0.5mL0.1M 预冷的 CaCl₂ 溶液,悬浮菌体沉淀,冰浴 45min;

vi 4℃ 5000 r/min 离心 10min,弃上清。用 0.2mL0.1M 冰冷的 CaCl₂ 重新悬浮菌体,然后分装于无菌的用冰预冷 eppendorf 管中(200 μ L/管),4℃放置 12~24h 备用。

[0056] g. 连接产物的转化:

i 无菌条件下吸取连接产物 10 μ L 加入已在 4℃放置 12-24h 的 BL21 (DE3) 感受态细胞中,轻柔的吹打混匀,之后冰浴放置 30min;

ii 迅速放入 42℃水浴中热激 90s,之后冰浴 5min;

iii 加入 800 μ L 37℃预热 LB 培养液,37℃温和振荡(150 r/min)1h,此步骤是使细胞恢复抗药性;

iv 将培养物 5000r/min 离心 5min,将上清液剩余其余的弃去;

v 将剩余的 200 μ L 液体将细胞沉淀轻柔的吹起,轻柔的均匀的涂布于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上;

vi 将平板正放 1h,这样可以使其上的液体被平板吸收,之后倒置平皿于 37℃培养箱中,培养 12-16h 后,之后挑取白色,大小均匀的菌落提取质粒。

[0057] h. 重组质粒的提取:用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0 试剂盒进行,操作步骤如下:

i 用无菌牙签从 LB 平板挑取白色单菌落,接种于 3mL 含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 培养液中,37℃剧烈振摇(230r/min) 12~16h;

ii 无菌移取 1.5mL 菌液置 Eppendorf 管中,12000r/min 离心 3min,弃上清,倒置控干残留液体;

iii加入 200 μ L 溶液 I (已加入 RnaseA),用涡旋器振荡至细菌沉淀彻底悬浮;

iv 加入 200 μ L 溶液 II,迅速温和颠倒离心管数次,使菌体充分裂解,裂解后的菌体变得清亮;

v 加入 200 μ L 溶液III,迅速温和颠倒离心管数次以充分中和,室温静置 2min;12000r/min 离心 7min。(若离心后凝结块未很好的沉淀,再次上下翻转混合数次,12000r/min 再离心 5min);

vi将离心吸附柱置于废液收集管中,转移上清液到离心吸附柱(尽量去除杂质)中,10000r/min 离心 30s,弃废液;

vii将离心吸附柱置于废液收集管中,加入 500 μ LW1 于离心吸附柱中,10000r/min 离心 30s,弃废液;

viii将离心吸附柱置于废液收集管中,加入 500 μ LW2 于离心吸附柱中,10000r/min 离心 30s,弃废液。以同样的方法再用 500 μ LW2 溶液洗涤一次;

ix将离心吸附柱置于废液收集管中,13000r/min 离心 1min,以弃净 W2;

x 小心取出离心吸附柱,将其套入一个无菌 1.5mL 离心管中,在吸附膜中央加入 30 μ L 无核酶水,室温静置 2~10min 后,13000r/min 离心 1min 洗脱质粒,置于 -20℃ 保存备用,同时电泳观察。

[0058] i. 重组质粒的鉴定:

i 重组质粒琼脂糖凝胶电泳鉴定:

用 1.0% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)上样 5 μ L,80V 电压电泳 30min,同时加未重组质粒作为阴性对照;

ii 重组质粒的 PCR 鉴定:

筛选电泳时较阴性对照质粒移动慢的重组质粒,进行 PCR 扩增,体系同前,PCR 结束后进行电泳观察;

iii 重组质粒的酶切鉴定:

将以下的体系加入 0.5mL 管中:

TaKaRa 10 $\times$ 限制性内切酶缓冲液(buffer M) 2 μ L

EcoR I 和 Xho I 各 1 μ L

质粒 DNA 16 μ L

轻柔混合均匀后瞬时离心,放置于 37℃ 水浴 4h, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳观察酶切结果,同时用空白质粒载体作为阴性对照;

iv 重组质粒的测序鉴定:

将 PCR 扩增和酶切鉴定均为阳性的单克隆过夜培养,提取质粒送上海英俊生物科技有限公司测序。将测序正确的菌株置 -70℃ 保存。重组质粒命名为 PGEX4T-1-PPMV-1-F(924)。

[0059] ②重组菌的诱导表达:

将测序正确于 -70℃ 保存的重组菌株 PGEX4T-1-PPMV-1-F(924),划线接种于 LB 琼脂平板(Amp+)上,倒置放于 37℃ 培养箱中培养 12~16h;然后挑取单个菌落接种于 4mL 的 LB 培养液(Amp+),37℃ 振荡培养至细菌对数生长期;在将此菌以 1% 的接种量接种于 100mL LB 培养液(Amp+)中,37℃ 振荡培养至细菌对数生长期,以 1% 接种量接种于 1000mL 含 LB 培养液(Amp+)中,37℃ 培养至 OD600=0.4 时,加入 IPTG 42℃ 诱导 6h。

[0060] ③包涵体蛋白的提取：

将诱导的菌体 8000rpm/min 离心 5min, Buffer A 溶液(TrisCl 50mM/L ;EDTA 0.5mM/L ;NaCl 50mM/L ;Glycerol 5%)洗涤 1 次,用 Buffer A 重悬沉淀后强超声波破碎 2~3min,至溶液为半透明。4℃ 10000rpm/min 离心 10min,弃上清。用 Buffer A 轻轻洗涤沉淀。

[0061] 加入原细菌培养液体积 1/10 的 BueffrA 溶液重悬沉淀,加入 SKL(N-十二烷基肌氨酸钠)室温静置 2h,使其沉淀缓慢溶解。4℃ 10000rpm/min 离心 10min,弃沉淀,取上清,分别加入 PEG4000 至 2%(w/v)、氧化型谷胱甘肽至 1mM、还原型谷胱甘肽至 2mM,静置 30min 2h,转至处理好的透析袋中,于 0.01M TE 溶液 (pH. 80) 中透析 2~3d,得到包涵体蛋白,即免疫抗原,并用紫外风光光度计测 OD260 和 OD280,计算蛋白浓度后,-20℃或 -80℃保存备用。

[0062] (2)抗体的制备：

将抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白免疫 BALB/C 小鼠按照常规的单克隆抗体制备技术制备抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体,并进行纯化,即得纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体。

[0063] 选 6~8 周龄雌性 BALB/C 小鼠,用 F 基因重组蛋白作为免疫原,免疫 4 次,每次间隔两周,第一次抗原加等量的弗氏完全佐剂,经乳化分点注射于小鼠颈背部皮下,共注射 0.2mL ;第二次加等量的弗氏不完全佐剂,方法同前 ;第三次不加佐剂腿部肌肉注射,7 天后尾部采血测血清效价,达到要求时于融合前 3 天加强免疫,用不含佐剂的等量抗原腹腔注射加强免疫后,取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选出稳定分泌抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体 (MAb-Pb) 的阳性细胞株,并对其中效价最高的两株单抗 041E9 和 062B4 扩大培养,注射细胞进小鼠体内诱生腹水 ;离心除去油脂和沉淀,即得小鼠腹水,再用辛酸-硫酸铵法进行纯化单抗,即得纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体,具体步骤如下：

i 腹水 4℃,12000rpm 离心 15min,去除细胞碎片和大的蛋白聚集物。

[0064] ii 腹水上清滤纸过滤去除脂质和大的颗粒沉淀,滤液用 4 倍体积的 60mM 醋酸缓冲液 (pH=4.0) 稀释后,用 1M NaOH 调 pH 至 4.4~4.6 。

[0065] iii 逐滴加入辛酸(终浓度为 25 μ l/ml 稀释腹水),待溶解后再加入另一滴,室温搅拌 30min,然后 4℃静置 2h 以上,使其充分沉淀。

[0066] iv 12000r/min,4℃,30min,收集上清。

[0067] v 上清液经普通滤纸过滤 1 次,加入 1/10 体积的 10×PBS(100mmol/LPBS, pH=7.4。称 NaCl 80g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 29g、KCl 2g 、KH₂PO₄ 2g,加蒸馏水溶解,加入 100mmol/L EDTA 20mL,用去离子水定容至 1000mL) 用 1M NaOH 调至 7.4,冰浴至 4℃,得到混合液。

[0068] vi 根据每 mL 混合液加 0.277g 固体硫酸铵(0℃条件下,45%饱和硫酸铵为 0.291g/ml),冰浴条件下边搅拌边缓慢加入硫酸铵,并不时搅拌,待硫酸铵全加入后,4℃再搅拌 10~30min 后,过夜,使溶液完全平衡,然后 13000r/min,4℃离心 30min,弃上清,得到沉淀,该沉淀溶解于 0.02% mol/L 且 pH=7.4 的 PBS 中,装入透析袋,进行充分透析,即得纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体。

[0069] (3)将硝酸纤维素膜 2 粘附于 PVC 胶板 1 的中部。

[0070] (4)将纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体涂到硝酸纤维素膜 2 上,包被硝酸纤维素膜 2 的一个区域,得到检测线 6。

[0071] (5)将纯化的羊抗鼠抗体包被硝酸纤维素膜 2 的另一个区域,得到质控线 7。

[0072] 其中:纯化的羊抗鼠抗体购自索来宝生物科技有限公司。

[0073] (6)制备抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液:

i 按柠檬酸还原法制备金溶液:

取 0.01% 氯金酸水溶液 100mL,磁力搅拌下加热回流,沸腾后快速加入新配制的 1% 柠檬酸三钠水溶液 2.5mL,继续加热直至溶液变为紫红色为止,冷却后以蒸馏水恢复到原体积,得到直径为 20~30nm 的胶体金颗粒的胶体金溶液,待冷却后置棕色瓶于 4℃ 保存。

[0074] II 胶体金溶液与蛋白质的结合:

用 0.1mol/LK₂CO₃ 调节胶体金溶液的 pH 值至 9.0~9.5,分别取 1mL 胶体金和 50 μg 的纯化后的抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体,搅拌混合,40min 后再加体积浓度为 5%BSA 使其最终浓度为 1%;

III 胶体金标记蛋白的纯化:

以 3000r/min 的速率离心 20min,弃去由凝聚的金胶粒形成的沉淀,得到上清液;最后,上清液在温度为 4℃ 的条件下以 12000rpm 的速率离心 30min,得到沉淀物,该沉淀物用 100 μL 的 0.015M 且 pH=7.4 的胶体金复溶液溶解,在 4℃ 下保存,即得抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液。

[0075] 其中:0.015M 且 pH=7.4 的胶体金复溶液是指在 1L PBS 溶液中含有 20g 蔗糖、1g BSA、1gPVP、0.02g 叠氮钠的 PBS 溶液。

[0076] (7)将玻璃纤维膜浸在抗鸽 I 型副粘病毒 F 蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白溶液中,经浸透、晾干,即得胶体金结合垫 3;胶体金结合垫 3 在 37℃ 下干燥至恒重后,粘附于硝酸纤维素膜 2 上远离质控线(7)的一端。

[0077] (8)将样品垫 4 放入 0.05M、pH=8.5 的 Tris 溶液中浸没处理,得到处理后的样品垫 4。

[0078] 其中:0.05M、pH=8.5 的 Tris 溶液是指在 1L Tris 溶液中含有 1g BSA、1g PVP、500mL Tween-20、0.02g 叠氮钠的 Tris 溶液。

[0079] (9)在胶体金结合垫 3 的一端在粘上处理后的样品垫 4,其另一端粘附硝酸纤维素膜 2;处理后的样品垫 4 粘附于 PVC 胶板 1 的一端;所述吸水垫 5 与硝酸纤维素膜 2 粘附,并粘附于 PVC 胶板 1 的另一端。

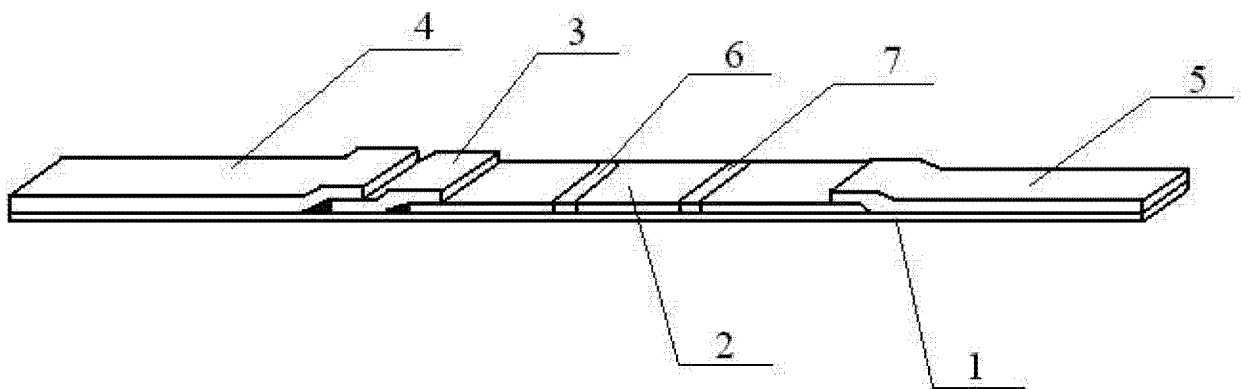


图 1

专利名称(译)	检测鸽I型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条及制备方法		
公开(公告)号	CN103983780A	公开(公告)日	2014-08-13
申请号	CN201410219718.X	申请日	2014-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所		
[标]发明人	贺洞杰 时永杰 杨明 张茜 贺奋义 郭慧琳 朱新强 张登基 曾玉峰 周磊		
发明人	贺洞杰 时永杰 杨明 张茜 贺奋义 郭慧琳 朱新强 张登基 曾玉峰 周磊		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983 G01N33/577		
代理人(译)	李艳华		
其他公开文献	CN103983780B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测鸽I型副粘病毒的胶体金免疫层析试纸条，它包括PVC胶板、硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫和吸水垫；所述PVC胶板的一端粘附有所述样品垫，其另一端粘附有所述吸水垫，其中部依次粘附有所述胶体金结合垫、所述硝酸纤维素膜；所述胶体金结合垫的一端与所述样品垫相粘附，其另一端与所述硝酸纤维素膜相粘附，该硝酸纤维素膜与所述吸水垫相粘附；所述胶体金结合垫包被了带有抗鸽I型副粘病毒F蛋白单克隆抗体的胶体金标记蛋白；所述硝酸纤维素膜上沿样品流动方向依次设有检测线、质控线。本发明可快速、简便、准确、无需任何仪器设备就能检测鸽新城疫。

