

孟卫芹, 王金良, 吴信明, 等. 基于 P32 蛋白的山羊痘病毒抗体荧光微球检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 89-94.

MENG W Q, WANG J L, WU X M, et al. Development of P32 protein based fluorescent microsphere immunochromatographic strips for detection of goatpox virus antibodies [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 89-94.

## 基于 P32 蛋白的山羊痘病毒抗体荧光微球检测方法的建立

孟卫芹<sup>1</sup>, 王金良<sup>1\*</sup>, 吴信明<sup>1</sup>, 唐娜<sup>1</sup>, 李通<sup>2</sup>, 石竞楠<sup>3</sup>, 董帅<sup>4</sup>, 沈志强<sup>1</sup>

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600;

2. 青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109;

3. 内蒙古民族大学生命科学与食品学院, 内蒙古 通辽 028000;

4. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北 邯郸 056000)

**摘要:** 为建立一种山羊痘病毒 (GTPV) 抗体快速检测方法, 试验将携带 GTPV 结构蛋白 P32 基因的重组质粒 pET28a-P32 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 经 IPTG 诱导后获得了重组蛋白, 纯化后经 Western blot 鉴定表明该蛋白具有良好的特异性和反应原性。以荧光微球为标记材料对 P32 蛋白进行标记, 通过优化反应条件制备了快速检测 GTPV 抗体的荧光微球免疫层析试纸条, 并对其性能进行评价。结果: 该试纸条与山羊副流感病毒 3 型 (CPIV3)、小反刍兽疫病毒 (PPRV)、羊口疮病毒 (ORFV) 的阳性血清均无交叉反应; 阳性血清稀释至 800 倍仍能检出阳性, 敏感性较高; 批内变异系数小于 10%, 批间变异系数小于 15%, 稳定性较好; 与 ELISA 检测方法对比的总符合率为 92.5%。综上, 本试验建立的荧光微球试纸条可用于 GTPV 抗体的快速检测和流行病学调查。

**关键词:** 山羊痘病毒; P32 蛋白; 荧光微球; 抗体

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)04-0089-06

## Development of P32 protein based fluorescent microsphere immunochromatographic strips for detection of goatpox virus antibodies

MENG Weiqin<sup>1</sup>, WANG Jinliang<sup>1\*</sup>, WU Xinming<sup>1</sup>, TANG Na<sup>1</sup>, LI Tong<sup>2</sup>,

SHI Jingnan<sup>3</sup>, DONG Shuai<sup>4</sup>, SHEN Zhiqiang<sup>1</sup>

(1. Shandong Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, China;

2. College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

3. College of Science and Food Engineering, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China;

4. College of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056000, China)

**Abstract:** In order to establish a method for rapid detection of goatpox virus (GTPV) antibody, pET28a-P32 was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the recombinant protein was obtained by IPTG induction. After purification, Western blot showed that the protein had good specificity and reactivity. Using the fluorescent microsphere as labeling material to label the P32 protein, fluorescent microsphere immunochromatographic strip for rapid detection of GTPV antibody were prepared by optimizing the reaction conditions. Then, the performance evaluation of the strip was performed. The results showed that the strip had no cross-reaction with CPIV3, PPRV or ORFV. Positive serum diluted to 800 times could be detected, with high sensitivity. The intra-batch coefficient of variation was less than 10%, and the inter-batch coefficient of variation was less than 15%, with good stability. The overall coincidence rate was 92.5% compared with ELISA. In short, the present fluorescent microsphere strips can be used for rapid detection of GTPV antibodies and epidemiological investigation.

**Keywords:** goatpox virus; P32 protein; fluorescent microsphere; antibody

山羊痘是由山羊痘病毒 (goatpox virus, GTPV)

感染引起的发病急、热性、高度接触性传染病, 造成被感染山羊的皮肤、消化道黏膜和呼吸道出现痘疹等症状, 是具有严重威胁的一种动物疫病<sup>[1]</sup>。山羊痘被世界动物卫生组织 (WOAH) 列为必须通报的动物疫病<sup>[2-6]</sup>, 我国农业农村部将其列为二类传染病。该病广泛分布于世界各地, 如非洲、中东、北欧各国等<sup>[7]</sup>, 近几年来, 在我国多个地区也有相关报

收稿日期: 2023-04-14; 修回日期: 2024-01-31

基金项目: 山东省羊产业技术体系岗位专家项目 (SDAIT-10-07); 滨州市农社领域科技创新政策引导计划项目 (2023SHFZ004)

第一作者: 孟卫芹, 女, 硕士, 助理研究员

\*通信作者: 王金良, 博士, 研究员, 研究方向为重大动物疫病快速检测技术, E-mail: wjl478@163.com。

道<sup>[8-9]</sup>。该病的发病率和死亡率均较高,尤其羔羊感染后的死亡率最高可达 100%<sup>[10]</sup>,给部分地区养羊业带来严重的经济损失。

GTPV 基因组为线性双股、两端共价闭合的 DNA,长度约为 150 kb,编码约 150 个蛋白<sup>[11]</sup>。P32 蛋白是位于羊痘病毒膜表面的一种结构蛋白,包含 1 个重要抗原决定簇,能诱导产生良好的中和抗体<sup>[12]</sup>,可以用于建立血清学诊断技术。目前常用的血清学检测方法有病毒中和试验(VNT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、琼脂扩散试验(AGID)和间接免疫荧光(IFA)等<sup>[13-14]</sup>,这些方法存在费时费力、试验步骤繁琐、特异性和敏感性不高等缺点;PCR 技术也可用于检测山羊痘<sup>[15]</sup>,但需要昂贵的仪器设备和专业人员,不利于在基层推广。荧光微球免疫学检测技术(FMIA)是一种超敏免疫分析方法<sup>[16]</sup>,具有低背景、强特异性、高灵敏度等优点,已被广泛应用于病毒、细菌、药物、激素等的快速检测分析<sup>[17]</sup>。

本研究将实验室前期成功构建的 pET28a-P32 重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,经诱导表达及纯化后得到重组 P32 蛋白,以镧系元素铕(Eu)及其螯合物作为标记物对重组蛋白进行偶联标记,成功建立了一种快速检测 GTPV 抗体的荧光微球免疫层析方法,为山羊痘病毒抗体的现场快速检测提供了技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 血清

GTPV 阳性血清购自中国兽医药品监察所;GTPV 阴性血清,山羊副流感病毒 3 型(CPIV3),小反刍兽疫病毒(PPRV),羊口疮病毒(ORFV)阳性血清和兔抗山羊 IgG 多抗均由本实验室保存;120 份临床血清样品为内蒙古、山东等地羊场送检保存。

### 1.2 主要试剂和耗材

原核表达重组质粒 pET28a-P32 由山东省滨州预防兽医学与动物生物技术重点实验室保存,截取了 P32 蛋白抗原表位集中的 N 端 2 ~ 141 aa 区域进行表达;大肠杆菌 BL21 (DE3)、DNA Marker、低分子量蛋白 Marker、DAB 底物显色液等购自宝生物(大连)工程有限公司;山羊痘病毒抗体 ELISA 检测试剂盒购自山东绿都生物科技有限公司;Eu-荧光微球(粒径为 210 nm)购自南京微测生物科技有限公司;EDC [1-(3-二甲氨基丙基)-3 乙基碳二亚胺盐酸盐]购自 Sigma 公司;硝酸纤维素膜(NC 膜)购自上海杰一生物有限公司;样品垫、结合垫、吸水纸、PVC 板购自上海金标生物科技有限公司;其他试剂为国药分析纯。

### 1.3 主要仪器

超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技股份有限公司;试纸条喷点平台购自美国 BioDot 公司;HGS201 切条机购自杭州峰航科技有限公司;ZWYR-2102C 恒温摇床购自上海智城分析仪器制造有限公司;MD-100 干式荧光分析仪购自上海飞测生物科技股份有限公司。

### 1.4 P32 重组蛋白的表达、纯化与鉴定

将 pET28a-P32 重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h,收集菌体并超声,离心取沉淀溶于 8 mol/L 尿素溶液中,复性后用镍离子亲和层析法纯化目的蛋白。SDS-PAGE 分析纯化蛋白,通过半干转印法将目的蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶 37 °C 封闭 2 h,含 0.5%吐温-20 的 Tris-HCl 缓冲液(TBST)洗涤,加入 1:100 稀释的 GTPV 抗体阳性兔血清 4 °C 过夜,TBST 洗涤后加入显色液,室温避光显色 30 min 观察鉴定结果。

### 1.5 试纸条的制备

#### 1.5.1 微球标记

取固体含量为 1%的 Eu-荧光微球分散液 100  $\mu$ L,加入 400  $\mu$ L pH=8.0 的硼酸缓冲溶液(BBS),再加入 20  $\mu$ L 10 mg/mL 的 EDC 溶液,室温活化 30 min;12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,将沉淀洗涤 1 次,用 500  $\mu$ L BBS 重悬;超声分散后,加入 0.1 mg P32 蛋白,室温孵育 2 h,用终浓度 1%的 BSA 在 4 °C 过夜封闭;以 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,等体积复溶液(0.1%的 BSA, BBS 缓冲液)复溶,超声分散后置于 2 ~ 8 °C 保存备用。

#### 1.5.2 NC 膜划线

以 0.05 mol/L 硼酸缓冲液为包被液,用点膜仪以 50 mm/s 的速度、5  $\mu$ L/cm 的剂量将稀释后的兔抗山羊 IgG 多抗、P32 蛋白分别喷在 NC 膜的质控线(C 线)、检测线(T 线)位置,37 °C 烘箱中烘干 2~3 h 后密封备用。

#### 1.5.3 结合垫的制备

将荧光微球标记的 P32 蛋白稀释成系列浓度,均匀的喷在结合垫上,37 °C 烘箱中烘干 2~3 h 后密封备用。

#### 1.5.4 试纸条的组装

将 NC 膜、吸水纸、结合垫、样品垫依次贴于 PVC 底板上,用切条机切成 4 mm 宽的试纸条,装入卡壳,置于含干燥剂的铝箔袋内密封备用。

#### 1.5.5 结果判定

将待检血清用 pH=8.0 的 Tris-HCl 溶液稀释 100 倍,吸取 80  $\mu$ L 样品滴加到试纸条样品孔中,反应结

束后在荧光分析仪上读取信噪比值 (T/C)。参照标准<sup>[18]</sup>, 当  $T/C < 0.1$  时, 判定为阴性; 当  $T/C \geq 0.1$  时, 判定为阳性。

## 1.6 试纸条反应条件的优化

### 1.6.1 划线浓度的优化

C 线浓度设定为 0.5 mg/mL, 将 T 线划线浓度稀释为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL。检测 GTPV 阴性、阳性血清样本, 通过荧光分析仪读取 T/C, 根据阳性血清 (P) 和阴性血清 (N) 比值, 即 P/N 值筛选最佳划线浓度。

### 1.6.2 荧光微球复溶稀释倍数的优化

荧光微球按照 50、100、200、400 倍复溶, 分别检测阴性、阳性血清样本, 读取 T/C 值, 根据 P/N 值确定合适的复溶稀释倍数。

### 1.6.3 反应时间的优化

加样后分别在 5、10、15、20、25 min 时读取数据, 以 T/C 值稳定、P/N 值最大且时间最短为最佳反应时间。

## 1.7 性能评价

### 1.7.1 特异性

用制备的荧光微球试纸条检测 GTPV、CPIV3、PPRV、ORFV 阳性血清及 GTPV 阴性血清, 每份血清样本做 3 个重复, 读取 T/C 值, 以评价试纸条的特异性。

### 1.7.2 敏感性

将 GTPV 阳性血清参照品按 2 倍倍比稀释 (1:50~1:1600), 各取 80  $\mu$ L 滴加于试纸条样品孔中, 读取 T/C 值, 以评价该试纸条的敏感性。

### 1.7.3 重复性

取同一批次和不同批次制备的荧光微球试纸条, 分别对 6 份临床血清样品进行检测, 每份血清做 3 个重复, 读取 T/C 值, 计算批内与批间变异系数 (CV)。

### 1.7.4 稳定性

将同批次制备的试纸条干燥密封后置于 37  $^{\circ}$ C 条件下进行加速老化试验, 每天随机取出 1 组检测阴性、阳性血清, 每组 3 个平行, 读取 T/C 值。

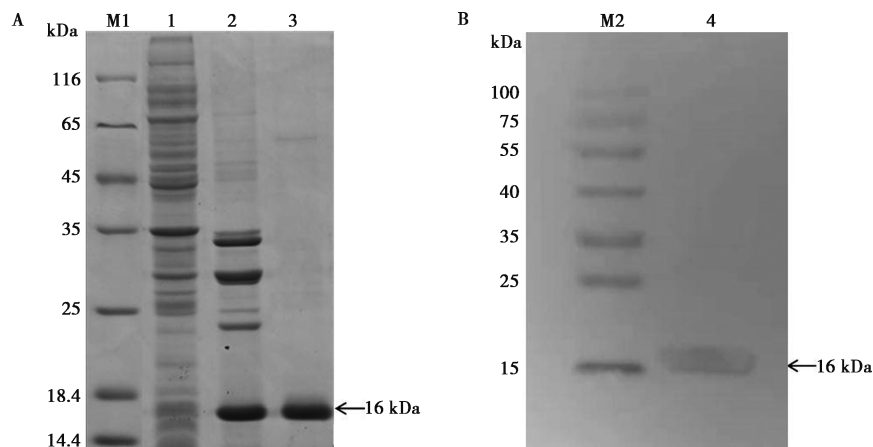
## 1.8 临床样本的检测

采用优化后的试纸条对 120 份临床山羊血清进行检测, 将检测结果与山东绿都 ELISA 试剂盒检测方法作对比, 计算 2 种检测方法的符合率。

## 2 结果

### 2.1 P32 蛋白的表达、纯化与鉴定

经 SDS-PAGE 显示在大约 16 kDa 处可见目的条带 (图 1A), 使用镍离子亲和层析法纯化得到 P32 蛋白, 质量浓度为 1.1 mg/mL; Western blot 结果显示, 重组蛋白可以与 GTPV 阳性血清发生特异性反应 (图 1B), 表明具有良好的反应原性。



M1. 蛋白 Marker; 1. 诱导后上清液; 2. 诱导后沉淀; 3. 纯化蛋白; M2. 预染蛋白 Marker; 4. 纯化蛋白与阳性血清反应。

图 1 蛋白诱导表达 SDS-PAGE (A) 及 Western blot (B) 鉴定

## 2.2 试纸条反应条件的优化

### 2.2.1 划线浓度的优化

由图 2 中可知, 当 T 线划线浓度为 0.2 mg/mL 时, P/N 值最大, 因此选择 C 线 0.5 mg/mL、T 线 0.2 mg/mL 为最佳划线浓度。

### 2.2.2 荧光微球复溶稀释倍数的优化

从图 3 中可知, 当荧光微球按照 200 倍稀释复溶时, 阳性血清 T/C 值较高, P/N 值最大, 因此选择 200 倍为最佳复溶稀释倍数。

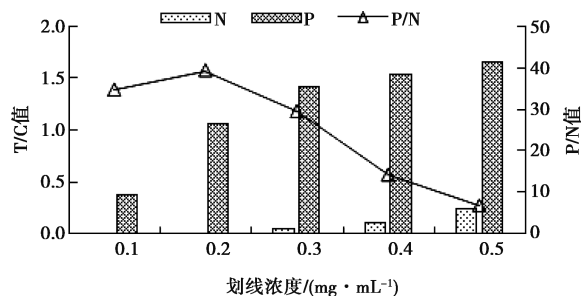


图2 T线最佳划线浓度确定

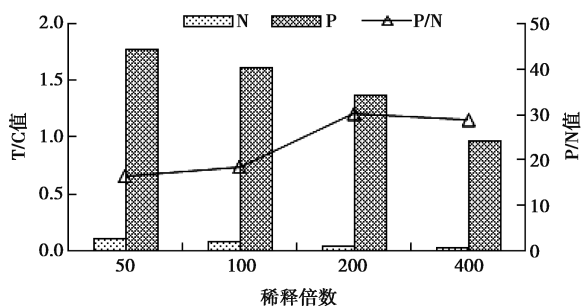


图3 荧光微球最佳复溶稀释倍数确定

### 2.2.3 反应时间的优化

从图4可以看出, 15 min后 T/C 值较稳定, P/N 值最大, 因此选择在反应时间为 15 min 时读取结果。

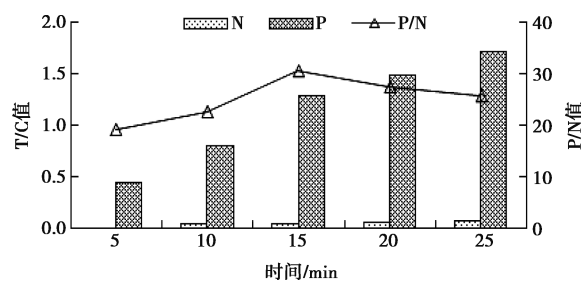


图4 最佳反应时间确定

## 2.3 性能评价

### 2.3.1 特异性

用制备的试纸条对 CPIV3、PPRV、ORFV、GTPV 阳性血清及 GTPV 阴性血清进行检测。结果显示, 只有 GTPV 阳性血清检测结果 T/C 值大于 0.1, 其余均为阴性 (表 1), 表明该试纸条特异性良好。

表 1 特异性试验结果 ( $\bar{x} \pm SD$ )

项目	阳性血清				GTPV 阴性血清
	CPIV3	PPRV	ORFV	GTPV	
T/C 值	0.032±0.011	0.035±0.013	0.056±0.015	1.181±0.089	0.033±0.015
结果判定	-	-	-	+	-

注: +表示阳性, -表示阴性。

### 2.3.2 敏感性

将 GTPV 阳性血清按 2 倍倍比稀释 (1 : 50~1 : 1 600), 稀释 800 倍时, T/C 值仍大于 0.1, 为阳性, 说明该试纸条的敏感性较高。

### 2.3.3 重复性

用同一批次与不同批次的试纸条对 6 份临床山羊血清检测, 表 2 结果显示, 批内变异系数小于 10%, 批间变异系数小于 15%, 说明该试纸条重复性较好。

表 2 重复性试验结果 (n=6)

样品编号	批内 (T/C)			批间 (T/C)		
	$\bar{x}$	SD	CV/%	$\bar{x}$	SD	CV/%
1	0.061	0.004	6.173	0.056	0.004	7.241
2	0.042	0.003	7.332	0.045	0.005	10.062
3	1.041	0.081	7.795	1.044	0.057	5.474
4	0.586	0.037	6.369	0.454	0.053	11.624
5	1.004	0.027	2.694	1.063	0.086	8.134
6	0.801	0.075	9.341	0.638	0.058	9.149

### 2.3.4 稳定性

在 37 °C 条件下进行加速老化试验, 测得试纸条 T/C 值变化相对稳定 (图 5), 在 7 d 时仍可准确读出阴性、阳性血清。表明在 37 °C 条件下至少可保存 7 d, 该试纸条稳定性较好。

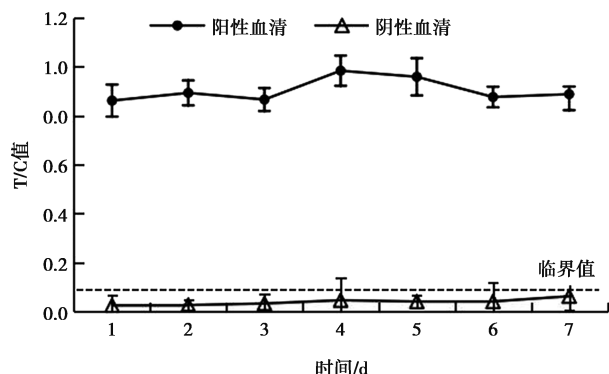


图5 37 °C 条件加速老化试验

## 2.4 临床样品的检测

试纸条与 ELISA 试剂盒检测对比结果见表 3, 经 ELISA 方法检测的 70 份阳性血清中检出 5 份阴性, 阳性符合率为 92.86%; 50 份阴性血清中检测出 4 份阳性, 阴性符合率为 92%; 总体符合率为 92.5%, 说明试纸条准确性较高。

表 3 试纸条与 ELISA 检测结果

检测方法	结果	试纸条		总数
		阳性	阴性	
ELISA	阳性	65	5	70
	阴性	4	46	50
	总数	69	51	120

## 3 讨论

我国对山羊痘的控制主要通过接种疫苗来完成, 羊痘弱毒疫苗在羊痘防控过程中发挥了巨大作用。由于该疫苗有效接种途径为尾部皮内注射, 具有一定的接种难度, 因操作失误等原因可导致疫苗免疫失败, 使羊具有感染羊痘病毒的风险。国内外已建立了多种 GTPV 检测方法, 常规的病毒中和试验应用表达荧光蛋白的重组羊痘病毒, 使检测时间大大缩短<sup>[15]</sup>; 有学者针对 GTPV 建立了快速、灵敏的 PCR 诊断技术, 并已经研究出可同时识别山羊痘病毒和羊口疮病毒的 PCR 检测方法<sup>[19]</sup>; 程汝佳等<sup>[20]</sup>选取 ORF068 基因保守区域设计引物, 建立了 GTPV 环介导等温快速检测方法, 与实时荧光 PCR 方法符合率达 100%。赵宏吉等<sup>[21]</sup>以 G9 蛋白作为包被抗原建立的 GTPV 间接 ELISA 方法, 证实与 P32 蛋白作为包被抗原建立的 ELISA 方法的检测效果相似。

疫苗免疫抗体水平的现场快速监测对于成功预防羊痘具有重要意义, 目前已有商品化的羊痘病毒 ELISA 抗体检测试剂盒, 但因其对检测平台具有一定的要求, 不适用于现场的快速检测。1983 年, Soimi 等<sup>[22]</sup>首次提出将稀土离子为标记物引入到免疫分析领域, 为 FMIA 检测方法的开创奠定了基础。该技术利用镧系元素 Eu 微球共价偶联标记抗原或抗体, 比物理偶联更加牢固<sup>[23]</sup>。微球包裹及葡聚糖修饰技术确保了荧光离子不泄露、不受外界干扰, 光稳定性好, 而且 Eu 离子 Stoke 位移大, 具有时间分辨功能, 可有效地排除非特异荧光的干扰, 极大地提高了分析灵敏度<sup>[24]</sup>。若能同时结合便携式荧光分析仪, 操作简便, 适于在基层推广应用。

GTPV 抗体检测的靶蛋白中, P32 蛋白是目前世界各国分离鉴定的毒株所共有的、特异性很强的结构

蛋白<sup>[25]</sup>。其中, 2~141 aa 区域是 P32 蛋白的优势抗原区, 本试验前期将该区域在大肠杆菌中进行截短表达、纯化获得重组 P32 蛋白, 为荧光微球快速检测方法的建立提供了抗原基础。以荧光微球为标记材料对 P32 蛋白进行标记, 以纯化的多抗 IgG 和 P32 蛋白分别包被试纸条的 C 线与 T 线, 通过优化反应条件建立了 GTPV 抗体荧光微球免疫层析试纸条, 丰富了 GTPV 快速检测方法。经评价, 该试纸条只与 GTPV 阳性血清反应, 与 CPIV3、PPRV、ORFV 的阳性血清均无交叉反应, 特异性较强; 阳性血清稀释至 800 倍仍能检出阳性, 敏感性较高; 随着时间的延长, 信号强度会有所减弱, 但 T/C 值相对稳定, 批内变异系数小于 10%, 批间变异系数小于 15%; 与 ELISA 检测方法对比的总符合率为 92.5%。

综上所述, 本研究建立的基于 P32 蛋白的 GTPV 抗体荧光微球快速检测方法具有特异性强、敏感性高、重复性和稳定性好、无需大型昂贵的仪器、操作简便等优势, 可广泛应用于羊场中 GTPV 抗体的监测和流行病学调查。

## 参考文献:

- [1] BALINSKY C A, DELHON G, AFONSO C L, et al. Sheeppox virus kelch-like gene SPPV-019 affects virus virulence [J]. J Virol, 2007, 81 (20): 11392-11401.
- [2] TULMAN E, ALFONSO C, LU Z, et al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses [J]. J Virol, 2002, 76 (12): 6054-6061.
- [3] BABIUK S, BOWDEN T, PARKYN G, et al. Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle [J]. Transbound Emerg Dis, 2008, 55 (7): 299-307.
- [4] BHANUP R, AKASH V, INDRANI B, et al. The current status of sheep pox disease [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2006, 29 (1): 27-60.
- [5] MADHAVAN A, VENKATESAN G, KUMAR A. Capripoxviruses of small ruminants: current updates and future perspectives [J]. Asian J Anim Vet Adv, 2016, 11 (12): 757-770.
- [6] TUPPURAINEN E, VENTER E, COETZER J. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques [J]. Onderstepoort J Vet Res, 2005, 72 (2): 153-164.
- [7] TUPPURAINEN E, PEARSON C, BACHANEK-BANKOWSKA K, et al. Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus [J]. Antiviral Res, 2014, 109 (100): 1-6.
- [8] 颜新敏, 吴国华, 李健, 等. 羊痘在中国的流行现状分析 [J]. 中国农学通报, 2010, 26 (24): 6-9.
- [9] 高娜, 童剑军, 何川川, 等. 山羊痘病毒毒力因子 KLP1 互作蛋白的筛选与初步鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41 (5): 900-904.
- [10] 赵志荀, 王建科, 张强. 羊痘病毒 P32 蛋白的研究进展 [J]. 中

- 国畜牧兽医, 2009, 36 (10): 129-132.
- [11] 何宇乾, 段笑笑, 刘枢清, 等. 羊痘病毒活载体疫苗研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019 (15): 51-54.
- [12] 施程洪, 兰虎云, 朱明旺, 等. 羊痘病毒的研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2014, 48 (9): 61-65.
- [13] HEINE H G, STEVENS M P, FOORD A J. Acapripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccine virus H3L gene [J]. J Immun Methods, 1999, 227: 187-196.
- [14] MARKOULATOS P, MANGANA-VOUGIOUKA O, KOPTOPOULOS G, et al. Detection of sheep poxvirus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction [J]. J Virol Methods, 2000, 84 (2): 161-167.
- [15] 高珊, 孟克巴依尔, 乌力吉, 等. 羊痘病毒研究综述 [J]. 甘肃农业科技, 2015 (1): 45-49.
- [16] ZHANG F, ZOU M Q, CHEN Y, et al. Lanthanide-labeled immunochromatographic strips for the rapid detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 51: 29-35.
- [17] 王华俊, 赵雪丽, 闫若潜, 等. 猪伪狂犬病病毒 gE 抗原时间分辨荧光免疫层析检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40 (11): 2108-2112.
- [18] 郎洪武. 布鲁氏菌感染和免疫时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法: T/CVMA 94—2022 [S]. 北京: 中国兽医协会, 2022.
- [19] ZHENG M, LIU Q, JIN N Y, et al. A duplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Capripoxvirus* and *Orf virus* [J]. Mol Cell Probes, 2007, 21: 276-281.
- [20] 程汝佳, 吴迪, 张启龙, 等. 山羊痘病毒属病毒荧光 LAMP 检测方法的建立与应用 [J]. 畜牧与兽医, 2022, 54 (11): 92-99.
- [21] 赵宏吉, 张金花, 司朵朵, 等. 山羊痘病毒 G9 蛋白的原核表达及间接 ELISA 方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43 (3): 280-284.
- [22] SOINI E, KOJOLA H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates: a new generation of nonisotopic immunoassays [J]. Clin Chem, 1983, 29 (1): 65-68.
- [23] 吴昊星, 刘百红, 刘雪微, 等. 猪痘病毒抗体纳米荧光检测试纸条方法建立及性能评价 [J]. 生物技术通报, 2020, 36 (5): 74-79.
- [24] WU Q Q, HANG C, LI T, et al. Establishment of time-resolved fluoroimmunoassay of IgG4 based on magnetic microspheres [J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35 (8): e23874.
- [25] 马维民, 刘湘涛, 张强, 等. 山羊痘病毒 P32 基因的克隆与序列分析 [J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 41 (4): 27-30.