

胶体金免疫层析快速检测技术及其在水产养殖业中的应用前景

王蔚芳¹ 李青梅^{2§} 郭军庆² 雷霖霖^{1*}

(¹青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

(²河南省农业科学院 河南省动物免疫学重点实验室, 郑州 450002)

摘要 建立快速、准确、简便易行的病害早期快速检测技术, 是从事动物疫病防控研究工作者和产业界人士的迫切愿望。自从开辟免疫分析技术以来, 越来越多更灵敏、更便捷的免疫分析方法被开发出来, 以胶体金免疫层析法为基础建立起来的快速检测试纸, 被认为是当前最快捷、高敏感的一种免疫学检测技术。该项技术真正实现了快速简易检测靶目标, 并已在畜牧业中得到普及应用, 成为当前畜禽病害早期防控的最有效方法之一。本文就该项技术在畜牧兽医领域的研究进展、应用现状、发展前景进行了介绍、分析和讨论, 旨在为水产养殖动物病害的早期诊断提供借鉴, 以期获得一种适用于水产动物病害的、专用的快速检测新技术和新产品。

关键词 胶体金 免疫层析 病害检测 水产养殖

中图分类号 S94 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)03-0113-06

Progress and prospect of colloidal gold-based immunochromatographic lateral flow assay and its application in aquaculture

WANG Wei-fang¹ LI Qing-mei^{2§} GUO Jun-qing² LEI Ji-lin^{1*}

(¹Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

(²Henan Key Laboratory for Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

ABSTRACT Immunoassays are demonstrated to be simple, rapid, and cost effective. For the past decades, more and more techniques are being developed which combine the advantages of approaches in highly powerful analytical tools. The convenience and speed of the test have been achieved by a novel concept of colloidal gold-based immunochromatographic assay, which depends on the transport of a color-labeled reactant to its binding partner immobilized on the surfaces of the membrane. This new technique has been proved to be a well-established and appropriate technique for a variety of point-of-care and field-use applications, which was widely used as a convenient test for human being and terrestrial animal diseases in nowadays. In this paper, progress on the study of this new technique has been summarized in detail, which focu-

农业部公益性行业科研重大专项(NYHYZX-07-046)、国家鲜鲷类产业技术体系(NYCYTX-50)和山东省博士后创新项目专项资金(200902008)共同资助

* 通讯作者。中国工程院院士, 研究员, 博导。E-mail: lejilin@seacul.com, Tel: (0532)85821347

收稿日期: 2010-03-28; 接收日期: 2010-04-20

作者简介: 王蔚芳(1980-), 女, 博士, 主要从事鱼类免疫学研究。E-mail: wangwf2000@hotmail.com, Tel: 15864269825

§ 合作第一作者。李青梅(1972-), 女, 副研究员, 主要从事动物免疫学研究。E-mail: lqmei911@yahoo.com.cn

ses on its principle, application and development. Based on these, its practicability in aquatic animal is also introduced. It would provide a new point of view on the innovation of simple and fast detection of disease in aquaculture.

KEY WORDS Colloidal gold Immunochromatography Disease detection
Aquaculture

免疫学诊断方法不仅检出率高,而且反应快速,在医学、兽医及水产领域已经得到广泛应用。但是对于养殖动物,尤其生活在水体中的鱼类,至今尚无一种真正达到高效、快捷、简便的病害早期检测方法。传统的经典免疫学诊断方法主要包括免疫沉淀反应(免疫扩散、免疫电泳等)、免疫凝集试验、标记抗体技术(酶标抗体、放射性标记抗体、荧光及发光标记抗体等)、与补体相关的实验、中和试验、免疫 PCR 技术等(朱立平等 2000)。虽然已经建立了多种检测方法,但都各有一定的局限性,最突出不足就是操作繁琐、检测周期长、需要专业人员进行操作等。因而快速、简便易行、准确的检测方法就成为水产养殖业者最迫切的需求。

根据胶体金免疫层析原理制成的检测试纸,被认为是当前实现快速简易检测靶目标的有效途径之一。该方法是在胶体金标记技术(Faulk *et al.* 1971)和免疫层析技术(Weller 2000)发展的基础上,结合单克隆抗体技术和新材料技术,于 20 世纪 90 年代发展起来的一项新型体外诊断技术。该技术由 Beggs 等(1990)最先用于人绒毛膜促性腺激素(HCG)的测定,具有便捷、灵敏、安全、低成本等特点,是理想的即时检测(Point-of-care test, POCT)和现场检测技术(May *et al.* 1991; Paek *et al.* 2000)。目前,该方法以其快速简便、肉眼判断、灵敏度高、特异性强、稳定性好、适宜操作人群广等优点,已广泛应用于医学和兽医领域。

我国是渔业生产大国,近年来,随着养殖密度的加大,水生动物病害日益加剧,而早期快速检测技术和手段又远远落后于畜牧业和医学领域,成为困扰养殖业发展的一大难题。因此,寻求快速、灵敏、准确、简便易行的早期快速检测方法迫在眉睫。作者受到医学及兽医学领域已经成熟应用快速检测试纸技术的启示,认为该项技术如经研究再创新,预期可以在水产养殖领域得到广泛应用。本文详细介绍了以胶体金免疫层析法为基础建立的检测试纸快速检测原理及其应用效果,初步探讨了该技术在水产养殖中应用的可行性,为其进一步研究和开发提供科学依据。

1 胶体金免疫层析技术原理概述

胶体金标记技术是继荧光素、放射性同位素和酶等三大标记技术后发展起来的固相标记测定技术,现已发展到被动凝集试验、光镜染色、免疫印迹、免疫斑点渗滤法和免疫层析技术等,后者广泛应用于医学检验和快速诊断。胶体金(Colloidal gold)是氯金酸在还原剂作用下聚合成的金颗粒,其特点是:根据需要制备大小不同的金颗粒(直径在 1~150 nm 之间),颜色为桔红色到紫红色,具有高电子密度、介电特性和催化作用,能与多种生物大分子结合,且不影响其生物活性。1857 年,Faraday 采用还原法从氯金酸水溶液中制备出胶体金,奠定了胶体金制备及应用的基础。1962 年,Feldherr 等第一次介绍了胶体金可作为一种电子显微镜水平的示踪标记物。1971 年,Faulk 等把胶体金引入免疫化学,这一年被公认是免疫胶体金技术诞生的一年。近年来,根据胶体金的物理化学性质,研究人员进一步拓展基于胶体金标记的生物检测技术及在其他生物学方面的应用(冯娟等 2005)。

免疫层析(Immunochromatography, IC),是 20 世纪 80 年代初发展起来的一种快速免疫分析技术(Weller 2000)。它的原理是:借助毛细作用,样品在条状纤维制成的膜上泳动,其中的待测物与膜上一定区域的配体结合,通过酶促显色反应或直接使用着色标记物,短时间(1~5 min)便可得到直观的结果。

胶体金免疫层析技术则是在胶体金标记技术和免疫层析技术发展的基础上,结合单克隆抗体技术和新材料技术,于 20 世纪 90 年代发展起来的一项新型体外诊断技术。它以胶体金为标记物,利用特异性抗原抗体反应,在层析反应过程中,通过带颜色的胶体金颗粒来放大免疫反应系统,使反应结果在固相载体上直接显示出来。该技术的载体——检测试纸,具有检测时间仅需数分钟、无需任何附加试剂和设备、操作简单等特点,解决了传统检测方法费时(数小时至数天)、成本高(需昂贵仪器或试剂)、操作复杂等问题,真正实现了长期以来人

他们在检测技术领域所追求的“快速、简便、特异、敏感”的目标。该检测技术已在人医和兽医得到普遍使用,研究技术成熟,最经典的应用就是早孕检测试纸(Beggs *et al.* 1990)。

典型的检测试纸分为 4 个部分:样品垫、结合垫(吸附胶体金标记物)、检测膜(含有检测线印迹和对照线印迹)和吸收垫,分别由吸附不同反应试剂的多孔材料组成。为方便操作和贮藏,上述材料通常按照一定的重叠关系粘贴于半硬式粘性底衬上,在样品垫、结合垫和吸收垫顶端覆盖有塑料保护膜(图 1)。其工作程序:检测时将试纸样品端插入样品溶液,样品垫中的待检溶液通过虹吸作用扩散至结合垫,再水化其吸附的胶体金标记物,并带动胶体金标记物与分析物一起向检测膜扩散,最终渗透到吸收垫,待检溶液中的分析物在扩散过程中与胶体金标记物相结合,形成胶体金标记物-分析物的复合物,该复合物可被检测膜上的分析物特异性抗体印迹(检测线)捕获和富集,形成明显的红棕色检测标记“|”,未与检测印迹结合的多余胶体金标记物继续扩散,被检测膜上的胶体金标记物特异性抗体印迹(对照线)固定,形成红棕色对照标记“|”,两种标记组合叠加,形成两条红棕色阳性标记“||”;反之,没有胶体金标记物-分析物复合物形成,则不能与检测印迹相结合,此时只有胶体金标记物与对照印迹相结合,形成阴性标记“|”;如果检测膜上没有红棕色标记显示,则表明检测失败或免疫试纸失效(张改平等 2009;Zhang *et al.* 2009)。检测试纸的技术原理见图 2 所示。

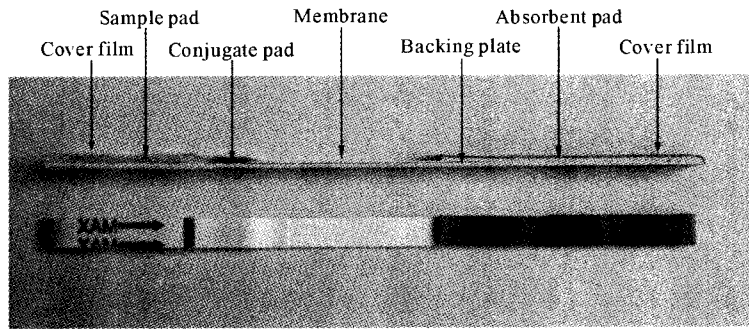


图 1 检测试纸的侧面和正面结构(Zhang *et al.* 2009)

Fig. 1 The lateral flow strip structure; lateral (top) and over (bottom) views of a lateral flow strip

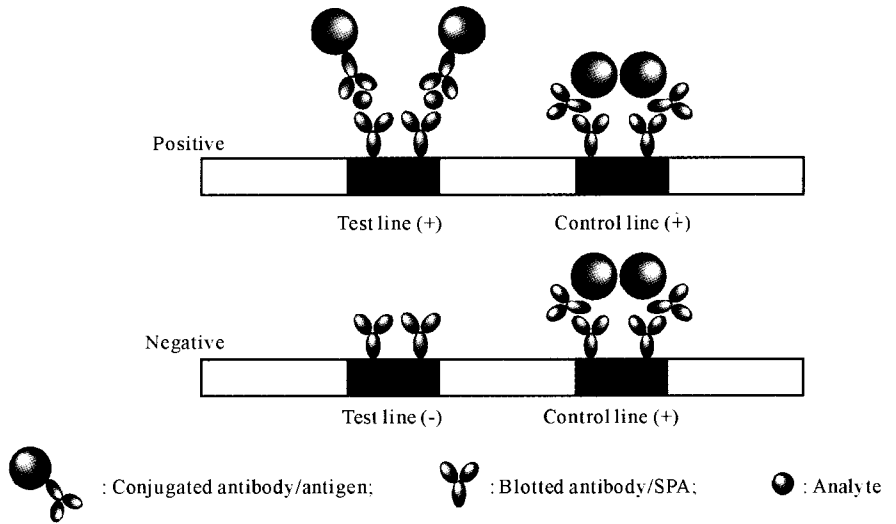


图 2 抗原/抗体快速检测试纸的反应原理(Zhang *et al.* 2009)

Fig. 2 Principles of the lateral flow strip test for the detection of antigens or antibodies

2 在人医及畜牧兽医领域的研发应用现状

进入 20 世纪 90 年代以来,胶体金免疫层析快速检测技术在生物医学领域逐渐发展,而在人体医学特别是医学检验中得到了广泛应用。主要包括激素检测、药物滥用检测、疾病相关蛋白检测、抗原或抗体检测等,如激素(早孕、LH 等)、传染病病原的抗体和抗原(甲肝、乙肝、丙肝、艾滋病、乙脑、流感等)、性病(梅毒螺旋体抗体、淋球菌等)、细菌(结核杆菌抗体、沙门氏菌抗体等)、寄生虫(弓形虫、包虫、血吸虫、人囊虫等)、肿瘤标记物(甲胎蛋白、血清癌胚抗原等)、心血管病检测标记物(血清心肌钙蛋白等)以及大麻、吗啡、海洛因等(王中民等 2001; 孔繁德等 2002;Spielberg *et al.* 1989; Wang *et al.* 2009; Omidfar *et al.* 2010)。该快速诊断技术特别适合于广大基层单位、医院、野外作业人员以及大批量、时间紧的检测和面积普查等,显示出巨大的发展潜力和应用前景,被认为是微生物和传染病及寄生虫病诊断技术标准化最有前途的新技术之一。

近年来,随着免疫层析快速诊断检测技术的不断提高和养殖业对疾病检测要求的不断提升,免疫层析快速

诊断试纸在动物疾病诊断中也得到了广泛的应用。国内多家科研院所已经开展了卓有成效的相关工作(张改平等 2009),成功研制了动物疫病及人兽共患病快速检测试纸和动物源食品安全快速检测试纸系列产品(张改平等 2003; Zhang *et al.* 2005,2006a,b,2009)。在病毒性疾病方面,张改平等(2004)首先利用抗传染性法氏囊病毒单克隆抗体研制成功传染性法氏囊病快速诊断试纸条,并取得国家发明专利和二类新兽药证书;随后,禽流感、猪伪狂犬病、口蹄疫、猪繁殖与呼吸综合征、新城疫、猪瘟等动物疫病的快速诊断试纸相继报道。王爱华等(2005)制备的鸡减蛋综合征病毒(EDSV)胶体金试纸条,能检出浓度约为 $1.35\mu\text{g/ml}$ 的纯化 EDSV。边传周等(2006)以原核表达的猪伪狂犬病毒 gE 抗原建立胶体金免疫层析法检测猪伪狂犬病抗体,灵敏度与美国 IDEXX 酶免试剂相当。在其他动物疫病方面,李学伍等(2004)以旋毛虫重组分泌抗原(Excreting secretion, ES)为基础研制出旋毛虫病快速检测试纸条,其敏感性与 ELISA 相当,与 ELISA 及胃蛋白酶消化法的检测结果符合率为 100%。唐雨德等(2003,2004)分别利用纯化的囊虫抗原和抗囊虫单克隆抗体,以胶体金免疫层析法检测猪血清和囊液中的抗体和囊虫循环抗原,检测结果与 ELISA 的符合率分别达 96.8% 和 100%,对抗原的最低检测量为 10 ng。陈琼等(2006)利用提纯的兔抗沙门氏菌 IgG 建立了检测沙门氏菌的快速检测试纸条,对沙门氏菌的最低检测量为 2.3×10^5 CFU/ml。李格梅等(2006)用提纯的布氏杆菌蛋白衍化物为检测抗原,胶体金标记 Protein A 建立检测人和不同动物血液样品中的抗布氏杆菌抗体的对布氏杆菌胶体金免疫层析快速检测板。2003 年法国巴斯德研究所 Chanteau 等研制出鼠疫快速诊断试纸条,证实其敏感性与特异性都超过了 ELISA 等现有的诊断方法。王鹏等(2006)用胶体金标记鼠疫耶尔森菌 F1 单克隆抗体,建立一种快速、简易的检测鼠疫 F1 抗原的胶体金免疫层析法,检测粗制 F1 抗原的浓度可达 0.5 ng/ml,最小检出细菌量为 10 万个。这些研究成果使兽医临床诊断的手段发生革命性的变化,目前已受到国际相关领域专家的关注,并成功带动了国内兽医学界相关研究的快速发展。

随着国内外对食品安全和无公害食品的日益重视,食品的快速检测技术研究已成为当前一大热点。而胶体金免疫层析快速检测技术由于具有低成本、高质量、灵敏特异、易推广应用等优势,已在食品质量控制和食品安全快速检测领域崭露头角。胶体金免疫层析快速检测技术也已应用于小分子物质的检测,如毒素、药物残留、环境检测、违禁药物检测等非临床检测领域(吴刚等 2007; Zhang *et al.* 2006b; Wang *et al.* 2009; Wu *et al.* 2010)。目前,国内外市场上已开发出黄曲霉毒素 B₁、氯霉素、链霉素、瘦肉精(盐酸克伦特罗)、唑乙醇、磺胺甲噁唑等检测试纸。由于食品安全快速检测产品的需求市场巨大,进一步开展相关领域的研究,将对改善食品质量与安全,提高国民健康水平,起到不容忽视的作用。

3 水产病害检测现状与胶体金免疫层析技术的应用

随着我国水产集约化养殖业的迅速扩大,日趋严重的病害威胁已经成为影响产业发展的主要瓶颈之一;与此同时,随着人们对于食品安全和环境保护意识的不断增强,选择科学合理、绿色环保的养殖模式已是今日养殖业发展的主要方向。为此要求养殖业者务必做好生产全过程的病害防治工作,尤其早期预防至关重要,因而建立水产病害快速准确的检测方法、建立早期诊断技术就成为当前防控病害威胁最为紧迫的任务之一。

当前,水生动物病害的诊断检测方法主要包括病原学和血清学检测(肖克宇等 2007)。病原检测通常包括病原分离及生理生化鉴定、病毒核酸成分检测等,目前普遍使用的有 PCR 技术、Real-time PCR 诊断技术、Lamp 扩增技术,以及 16S rRNA 基因探针杂交技术等。而以抗原抗体特异性结合为基础而设计的各种血清学实验,也已广泛应用于鱼类各种传染性疾病和部分寄生虫的诊断,主要包括血凝和血凝抑制试验、ELISA、中和试验、免疫荧光技术等。但是这些检测方法由于操作繁琐、检测周期长、检测成本高等原因而在实际应用中受到很大的限制。因此,建立快速、灵敏、准确、简便易行的早期快速检测方法已是水产界刻不容缓的需求。

以胶体金免疫层析原理建立起来的快速检测试纸,不需要专业技能和仪器,操作简单,易于推广,现已在我国水产领域得到了初步尝试。何艳玲等(2007)建立了水产品中 O1 群霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 的胶体金免疫层析快速检测方法,该方法检测水产品中 O1 群霍乱弧菌的灵敏度为 10^5 CFU/ml,与食品中常见的致病菌无交叉反应;检测的假阳性率为 6.25%,表明该方法操作简便,灵敏度高,特异性强,准确率高,适用于水产品质量安全的快速检测。Cheng 等(2007)建立了对虾白斑综合征病毒(WSSV)的胶体金免疫层析快速检测试纸的制备技术,结果表

明,该方法的测定结果与 PCR 检测结果一致。但是迄今为止,尚未见有其他水产领域,尤其在海水养殖动物中的相关报道。目前,作者基于该技术的优势及其在水产动物养殖领域中应用的可行性,在“国家鲆鲽类产业技术体系”和“农业部公益性行业科研重大专项”及“山东省博士后创新项目专项资金”资助下,已经开展了海水鱼类重要疾病的快速检测技术的探索和研发,以期建立起适于海水鱼类疾病早期快速检测的新技术。

基于目前胶体金免疫层析快速诊断技术的研究应用现状,今后该技术的发展将主要集中于:首先,检测试纸的最大优势在于能简便快捷测定靶目标,在此基础上进一步加强其检测的敏感性和特异性:(1)采用信号放大系统,如生物素-亲和素系统或免疫金银染色法进行银加强等,结合相应的简单检测仪器,进一步提高检测灵敏度,拓宽检测范围。(2)采用新的标记系统,如荧光标记、量子点标记等。(3)与分子生物学方法结合,检测病原的核酸,如 PCR-试纸、LAMP(环介导等温扩增)-试纸,即先对目的片段进行扩增并进行标记,再以试纸检测其特异性核酸。第二,在同一膜上作多种项目测定和多项目的组合测定,实现检测多元化。第三,结合酶显色以及借助简单仪器(如比色计等)实现半定量或定量检测。在达到检测快速而简便的前提下,今后应尽可能提高检测的特异性和敏感度,减少假阳性和假阴性,这对用于自检的免疫层析产品极其重要。当前,该项病害快速检测技术在人医和兽医领域已被广泛应用并得到迅速发展,而在水产领域目前仅见少量零星研发报道。今后如将该项技术引入水产领域,建立适于水产动物特点的快速检测技术,并形成水产专用的快速检测试纸产品,则不仅可以改变水产动物病害早期检测技术的落后面貌,而且还可以大幅度地提高早期诊断水平。因此可以预见其发展空间非常巨大。

4 快速检测试纸在水产领域的开发应用前景

近些年来,我国的水产养殖业发展非常迅速。但是由于养殖规模的无序扩大、养殖密度的随意增高而造成养殖环境日益恶化,以及尚无有效的早期检测和诊断方法,致使多种病害入侵、蔓延,经济损失也随之大幅度上升。2004~2006年,我国水产养殖动物病害监测到的疾病,分别有126、201和214种;造成的经济损失分别达到151.44、110和115.08亿元(汪开毓等 2009)。据分析,造成水产动物疾病暴发和流行的因素很多,其根本原因在于不能对病害进行早期诊断,往往贻误有效治疗时机。因此,产学研各界十分期待可应用于水产动物病害早期快速检测试纸的面世,以利于水产养殖业建立一种全新概念的病害快速检测和诊断的新模式。

胶体金免疫层析快速检测技术,可避免需要专业技术人员、需要专用设备才能检测的繁琐过程,易于普及推广。这种新概念的检测原理和方法,完全可以向水产业延伸,预测将可研制生产适用于鱼、虾、贝类等水产动物系列病害(包括真菌性、细菌性、病毒性及寄生虫性等)、药物残留、饲料原料掺假、饲料添加剂的安全性快速评估、抗体水平、激素水平、性别鉴定等多种用途的检测试纸,并可以进行定性、半定量和定量检测靶目标含量。

此外,该技术也可以应用于海洋污染物的检测和海洋环境监测。国家海洋局发布的《2009年中国海洋环境质量公报》显示,包括辽东湾、渤海湾、莱州湾、长江口、杭州湾、珠江口和部分大中城市近岸局部水域都已受到严重污染,主要污染物依然是无机氮、活性磷酸盐和石油类。这些海洋污染物(视为小分子半抗原)经过改造后同样可以应用胶体金免疫层析检测技术进行检测。另外,环境内分泌干扰素的污染也是海洋污染的重要方面,评价其污染的重要生物标志物是卵黄蛋白原,也可通过胶体金免疫层析检测技术对其进行检测,从而达到对水环境的监测。总体而言,由于该项技术操作简单,易于普及,亦可为海洋污染物检测和海洋环境监测方法的标准化提供新途径。

综上所述,胶体金免疫层析快速检测技术方兴未艾,不仅可以为疾病的早发现、早诊断、早治疗提供快捷手段,更重要的是可以为水产养殖业的可持续发展和保障食品质量安全提供重要的技术支撑,其技术经济价值、产业需求和发展前景不可限量。

参 考 文 献

- 孔繁德,黄印尧,赖清金. 2002. 免疫胶体金技术及其发展前景. 福建畜牧兽医, 24(7):11~14
边传周,郑 鸣,任 敏. 2006. 胶体金免疫层析法检测猪 PRV gE 抗体方法的建立及应用. 中国预防兽医学报, 28:204~207

- 王爱华,王玉珠,孙继国,陈 龙. 2005. 胶体金快速诊断方法对鸡减蛋综合征病毒的检测. *中国兽医科技*, 35:856~858
- 王 鹏,杜春红,郭 英,尹家祥,石丽媛,陈 平,唐 雪,钟佑宏,黄 鹏,吴明寿,董兴齐,于国林. 2006. 胶体金免疫层析法快速诊断鼠疫的实验研究. *地方病通报*, 21:1~4
- 王中民. 2001. 免疫层析技术研究进展. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 22(2):96~97
- 冯 娟,陈义平,王志亮. 2005. 胶体金的应用研究新进展. *中国动物检疫*, 22(7):48~50
- 朱立平,陈学清主编. 2000. 免疫学常用实验方法. 北京:人民军医出版社
- 李恪梅,王 燕,王国治. 2006. 布氏菌胶体金免疫层析快速检测板使用效果评价. *中国地方病防治杂志*, 21:148~150
- 李学伍,张改平,邓瑞广,肖治军,杨艳艳,李青梅. 2004. 猪旋毛虫病快速检测试纸条的研制及特性测定. *畜牧兽医学报*, 35:343~346
- 陈 琼,孔繁德,张长弓,彭海滨,徐淑菲. 2006. 沙门氏菌快速检测试纸条的研制与应用. *福建畜牧兽医*, 28:6~8
- 何艳玲,林 松,王陆迪,唐慧林,刘 振,王 静,李 瑾. 2007. 胶体金免疫层析法检测水产品中 O1 群霍乱弧菌方法的建立与优化. *中国国境卫生检疫杂志*, 30(1):52~55
- 汪开毓,黄锦炉,黄艺丹. 2009. 水产动物疾病快速诊断技术的发展和应. *水产前沿*, 7:21
- 张改平,郭军庆,李青梅,邓瑞广,杨艳艳. 2009. 动物疫病免疫试纸快速检测技术概况. *河南农业科学*, 9:174~176
- 张改平,郭军庆,杨艳艳,王爱萍,闫玉河,李学伍,邓瑞广,李青梅,李灵霞,闫红良. 2003. 畜牧疫病快速诊断试纸条:中国. ZL99101537.1
- 张改平,李学伍,杨艳艳,邓瑞广,李青梅. 2004. 鸡传染性法氏囊病快速诊断试纸条的研制及特性测定. *畜牧兽医学报*, 35: 89~92
- 吴 刚,姜贻梅,霍贵成,田 波. 2007. 胶体金免疫层析技术在食品检测中的应用. *食品工业科技*, 28(12):216~218
- 肖克宇主编. 2007. 水产动物免疫与应用. 北京:科学出版社
- 唐雨德,周东明,陆承平. 2003. 快速检测猪囊虫抗体的金免疫层析法的建立及应用. *中国人兽共患病杂志*, 19:77~79
- 唐雨德,周东明. 2004. 金免疫层析法检测囊虫循环抗原试验研究. *动物医学进展*, 25:87~88
- Beggs, M., Novotny, M., and Sampedro, S. 1990. A selfperforming chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic gonadotrophin (HCG) in urine and serum. *Clin. Chem.* 36: 1 084~1 085
- Chanteau, S., Rahalison, L., Raafiariisoa, L., Foulon, J., Ratsitorahina, M., Ratsifasoamanana, L., Carniel, E., and Nato, F. 2003. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet*. 361(9353): 211~216
- Cheng, Q., Meng, X., Xu, J., Lu, W., and Wang, J. 2007. Development of lateral-flow immunoassay for WSSV with polyclonal antibodies raised against recombinant VP (19+28) fusion protein. *Virologica Sinica*, 22(1): 61~67
- Faraday, M. 1857. Experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philos. Trans. R. Soc. London*, 147: 145
- Faulk, W., and Tylorn, G. M. 1971. An immunocolloidal gold method for the electron microscope. *Immunochemistry*, 8: 1 081~1 087
- Feldherr, C. M., and Marshall, J. M. Jr. 1962. The use of colloidal gold for studies of intracellular exchanges in the ameba *Chaos chaos*. *J. Cell Biol.* 12(3): 640~645
- May, K. 1991. Home tests to monitor fertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 2 000~2 002
- Omidfar, K., Kia, S., Kashanian, S., Paknejad, M., Besharatie, A., Kashanian, S., and Larjani, B. 2010. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity. *Appl. Biochem. Biotech.* 160: 843~855
- Paek, S. H., Lee, S. H., Cho, J. H., and Kim, Y. S. 2000. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods*, 22: 53~60
- Spielberg, F., Kabeya, C. M., Ryder, R. W., Kifuani, N. K., Harris, J., Bender, T. R., Heyward, W. L., and Quinn, T. C. 1989. Field testing and comparative evaluation of rapid, visually read screening assays for antibody to human immunodeficiency virus. *Lancet*. 1(8638): 580~584
- Wang, S., Zhang, C., and Zhang, Y. 2009. Lateral flow colloidal gold-based immunoassay for pesticide. In: Avraham, R., and Keith, E. H. (eds.), *Methods Mol. Biol. : Biosensors and Biodetection*, 504: 237~252
- Weller, M. G. 2000. Immunochromatographic techniques-a critical review. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366: 635~645
- Wu, J., Zhang, S., and Zhou, X. 2010. Monoclonal antibody-based ELISA and colloidal gold-based immunochromatographic assay for streptomycin residue detection in milk and swine urine. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 11(1): 52~60
- Zhang, G. P., Guo, J. Q., Wang, X. N., Yang, J. X., Yang, Y. Y., Li, Q. M., Li, X. W., Deng, R. G., Xiao, Z. J., Yang, J. F., Xing, G. X., and Zhao, D. 2006a. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for trichinellosis detection. *Vet. Parasitol.* 137: 286~293
- Zhang, G. P., Li, Q. M., Yang, Y. Y., Guo, J. Q., Li, X. W., Deng, R. G., Xiao, Z. J., Xing, G. X., Yang, J. F., Zhao, D., Cai, S. J., and Zang, W. M. 2005. Development of a one-step strip test for the diagnosis of chicken infectious bursal disease. *Avian Dis.* 49: 177~181
- Zhang, G. P., Wang, X. N., Yang, J. F., Yang, Y. Y., Xing, G. X., Li, Q. M., Zhao, D., Chai, S. J., and Guo, J. Q. 2006b. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of β -adrenergic agonist Clenbuterol residues. *J. Immunol. Methods.* 312: 27~33
- Zhang, G. P., Guo, J. Q., and Wang, X. N. 2009. Immunochromatographic lateral flow strip tests. In: Avraham, R., and Keith, E. H. (eds.), *Methods Mol. Biol. : Biosensors and Biodetection*, 504: 169~183