

杨 柳,任春梅,缪 倩,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒的双抗夹心 ELISA 检测[J].江苏农业学报,2018,34(4):769-774.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.008

黄瓜绿斑驳花叶病毒的双抗夹心 ELISA 检测

杨 柳, 任春梅, 缪 倩, 陆 芳, 程兆榜

(江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏 南京 210014)

摘要: 为建立快速、灵敏、准确且易操作的黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)检测方法以实现早期诊断与控制病害,制备了8株效价大于 1×10^{-7} 的单克隆抗体,配对筛选结果表明经辣根过氧化物酶标记的A8H与单抗A3配对检测的灵敏度最高,并据此创制了双抗夹心ELISA试剂盒。该试剂盒对CGMMV具有特异反应,灵敏度达1:12 800(g:ml),准确度与RT-PCR结果吻合,检测周期小于5 h,可用于生产上病害发生初期的快速诊断与鉴定。

关键词: 黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV);单克隆抗体;双抗夹心ELISA

中图分类号: S41-30 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0769-06

DAS-ELISA detection against cucumber green mottle mosaic virus

YANG Liu, REN Chun-mei, MIAO Qian, LU Fang, CHENG Zhao-bang

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To establish a cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) detection method which was rapid, sensitive, accurate and easy to operate for diagnosing and controlling the disease in the early stage, eight hybridoma cells lines were obtained, which could secrete anti CGMMV monoclonal antibody. The titer of the monoclonal antibody was more than 1×10^{-7} . Monoclonal antibody A3 and A8H which labeled by horseradish peroxidase were used to establish DAS-ELISA kit because of their high sensitivity. The kit had a specific response to CGMMV and the accuracy was consistent with the RT-PCR results. The detection sensitivity of leaves was 1:12 800 (g:ml), and the whole process was within five hours. The DAS-ELISA detection could be used for rapid diagnosis at the early stage of production.

Key words: cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV); monoclonal antibody; DAS-ELISA

黄瓜绿斑驳花叶病毒(Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)是烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)成员之一,为正义单链RNA病毒,病毒粒子杆状,长约300 nm,直径约18 nm,基因组长度约为6.4 kb,其中核酸组分约占病毒粒子总质量的6%,蛋白质约占粒子质量的94%^[1]。CGMMV是一种严重危害世界各地葫芦科作物生产的重要种传病毒,感染

CGMMV会使植株矮小,生长发育缓慢,叶片出现斑驳花叶,褪绿等症状,结果延迟或不结果,果肉水渍状病变或空心^[2]。该病毒以带毒种子和机械操作为其传播的主要途径,并且嫁接、授粉摘心等农事操作也会造成该病毒的相互感染与传播从而加大病害的发生^[3]。自1935年在英国黄瓜上首次被报道以来^[4],黄瓜绿斑驳花叶病毒病目前已在我国大部分种植葫芦科作物的省份发生,在日韩、中东地区、欧洲大部分地区 and 南北美洲等地也均有分布,屡次出现大爆发造成严重损失甚至绝收的报道^[5-9]。鉴于CGMMV的危害,中国农业农村部已将其列为全国农业植物检疫性有害生物。加之病害在植物生长初期影响不十分明显,容易被忽略,从而导致后期坐果

收稿日期:2017-12-14

基金项目:国家自然科学基金项目(31501610);公益性行业(农业)科研专项(201303028)

作者简介:杨 柳(1984-),女,江苏徐州人,博士,助理研究员,研究方向为蔬菜病毒病。(E-mail)suiyangy@126.com

通讯作者:程兆榜,(E-mail)onlyone8501@126.com

或收获阶段严重爆发,损失惨重^[2]。因此,对该病毒的准确检测尤其是病程初期的监测有着重要意义。

目前该病毒的检测方法有:生物学检测法、电子显微镜观察法、血清学检测法及分子生物学检测法等。生物学检测主要通过摩擦等方法将植物病毒接种于鉴别寄主或指示植物,然后根据植物发病症状对该病毒进行鉴定。此方法操作简单,结果直观,但工作量大、周期长,稳定性和重复性差。电子显微镜鉴定病毒技术结果直观、准确,但所需仪器价格昂贵,技术条件要求很高,不适用于大规模的病毒检测。分子生物学方法检测植物病毒具有特异性强、灵敏度高、检测效率高的优点,已经成为重要的植物病毒病检测技术之一,但其存在抽提 RNA、反转录等繁琐操作,对实验技术也有一定要求。血清学检测法是目前最常用的一种有效检测方法,利用抗原抗体的体外特异性免疫反应检测植物病毒的存在与否,并可对被测物进行定性或定量。血清学检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测效率高等优点,使其在植物病毒检测方面产生了巨大作用,可用于大田样品等大规模检测。但血清学方法检测时需要针对病毒的特异性抗体。因此,为了建立快速、灵敏、高效特异的 CGMMV 血清学检测方法,本研究利用提纯的 CGMMV 作为抗原,通过杂交瘤细胞技术制备单克隆抗体,并以制备的抗体为核心研制灵敏度高、特异性好的 DAS-ELISA 试剂盒,为葫芦科作物上 CGMMV 的检测和诊断提供支持。

1 材料与方法

1.1 CGMMV 毒源

CGMMV 毒源从江苏省高邮市大棚中发病的瓠瓜叶片上采集,根据任春梅等^[1]的方法经 RT-PCR 和核酸测序鉴定后,通过摩擦接种繁殖并保存于玻璃温室种植的葫芦上。

1.2 CGMMV 的鉴定与繁殖

根据 GenBank 中已报道的 CGMMV 基因组中的运动蛋白基因序列,设计特异性引物,上游引物(GM_F)为 5'-ATCCCTCGTGCCTGTCAAGT-3',下游引物(GM_R)为 5'-GATCGGATTGTAAGCCATCTTC-3'。使用 RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司产品)按照说明书步骤对样品进行 RNA 提取,利用随机引物 Random primer(日本 TaKaRa 公司产品)进行反转录。将反转录得到的 cDNA 作为模板,使用

引物 GM_F 和 GM_R 进行 PCR 扩增。PCR 体系为 2×TaqMix(北京全式金公司产品)12.5 μl,正、反向引物各 0.5 μl,模板 DNA 1.0 μl,用无菌双蒸水补足至 25.0 μl。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 45 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s 为一个循环,进行 33 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,最后 4 ℃ 保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析后送至南京擎科生物公司进行测序鉴定。

1.3 抗体制备与测定

1.3.1 CGMMV 的提取与纯化 采集感染 CGMMV 的叶片,提纯病毒粒子,参照任春梅等^[10]的方法并进行部分改动。按 1:2(质量:体积)比例加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.2),并加入终体积浓度为 0.1% 的巯基乙醇,匀浆后过滤。滤液加等体积的 CHCl₃ 乳化,4 ℃ 搅拌 2 h 后 6 000 g 离心 15 min 取上清液,加入 10% 聚乙二醇(PEG)及 1% NaCl,4 ℃ 搅拌 2 h 后 30 000 g 离心 2 h,将沉淀重悬于 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(含 1% Triton X-100)中,6 000 g 离心 15 min 取上清液,重复上一步,合并上清液,加至 20% 蔗糖溶液中,90 000 g 超速离心 90 min 弃上清液,沉淀加入 2 ml PBS(pH 8.0)溶解后再 10 000 g 离心 5 min,上清液即为病毒提纯液。病毒提纯液经磷钨酸染色后置于电镜下观察粒子形态。纯化的病毒粒子用于动物的免疫及单抗的制备。

1.3.2 单克隆抗体的制备 参照 Wu 等^[11]的方法,用纯化的 CGMMV 对 42 d 龄雌性 BALB/c 小鼠进行 3 次免疫。参照 Shang 等^[12]的方法将免疫后的小鼠脾细胞与提前复苏的骨髓瘤细胞进行融合,加入 HAT 细胞培养液铺 96 孔板。待培养板孔底长出肉眼可见的克隆,通过间接 ELISA 法对所有细胞孔进行筛选。挑取特异性好、阳性强的杂交瘤细胞孔再经过连续 3 次细胞克隆,得到分泌特异性抗 CGMMV 单克隆抗体的杂交瘤细胞。取健康雌性小鼠腹腔注射杂交瘤细胞制备腹水,待小鼠腹腔明显膨大后收集腹水,离心取上清液,经硫酸铵沉淀后采用 Protein G 小柱进行纯化。

1.3.3 抗体类型、亚类型鉴定及效价测定 应用小鼠抗体亚型鉴定试剂盒(美国 Sigma 公司产品)进行单克隆抗体类型及亚类型测定。用 1 μg/ml 提纯病毒作为包被抗原,倍比稀释的单抗腹水为一抗,碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,采用间接 ELISA 方法测定单克隆抗体效价。

1.4 双抗夹心 ELISA 检测试剂盒的研制

1.4.1 单克隆抗体的配对筛选 应用双抗夹心 ELISA 方法对制备得到的抗体进行筛选,筛选出可以配对的抗体组合。选取检测灵敏度最高的抗体偶联辣根过氧化物酶作为检测抗体,其余抗体稀释至 5 $\mu\text{g/ml}$ 作为包被抗体对病毒稀释液进行配对检测。使用 TMB 显色液显色后读取 OD_{450} 数值,判断最佳配对组合。

1.4.2 抗体检测质量浓度确定 将配对筛选得到的包被抗体选用不同质量浓度 (1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、10.0 $\mu\text{g/ml}$) 进行包被,用辣根过氧化物酶偶联标记的检测抗体选择不同的孵育质量浓度 (0.10 $\mu\text{g/ml}$ 、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、1.00 $\mu\text{g/ml}$) 进行检测。显色后读取 OD_{450} 数值,判断所选抗体的最适包被质量浓度和检测质量浓度。

1.4.3 试剂盒特异性检测 用配对筛选得到的包被抗体稀释液包被酶标板,之后分别将感染 CGMMV、烟草花叶病毒 (TMV)、小西葫芦黄花叶病毒 (ZYMV)、西瓜花叶病毒 (WMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV) 的病叶样品用碳酸盐缓冲液充分研磨后,加入包被好的 ELISA 板,以免疫原 CGMMV 为阳性对照,健康叶片的研磨液为阴性对照,用上述建立的双抗夹心 ELISA 法测定抗体的特异性反应。

1.4.4 试剂盒灵敏度测定 将人工摩擦感染 CGMMV 的葫芦病叶汁液按一定质量浓度逐级稀释,用筛选建立的包被抗体和检测抗体以双抗夹心 ELISA 方法对病叶稀释液进行检测,以健康葫芦叶片稀释液为对照,确定试剂盒检测的灵敏度。

1.5 田间检测应用及检测结果的 PCR 验证

用建立的 CGMMV 双抗夹心法 ELISA 检测试剂盒对在江苏省田间采集的 16 个瓜类作物样品进行检测,以实验室摩擦接种 CGMMV 的葫芦叶片作为阳性对照,以健康葫芦叶片和包被缓冲液作为阴性和空白对照。用 RT-PCR 方法和核酸测序验证 ELISA 检测结果的准确性,其中,RNA 提取、反转录以及 PCR 的方法同方法 1.2。

2 结果与分析

2.1 CGMMV 毒源的鉴定

田间采集具有 CGMMV 感染后典型斑驳花叶症状的瓠瓜叶片样品,提取总 RNA,经过 RT-PCR 扩增出长度为 635 bp 的基因片段,与预期片段大小相

符。PCR 产物测序和比对结果显示,该序列与 GenBank 数据库收录的 CGMMV 株系基因序列相似性达 99%,确认样品感染 CGMMV。

2.2 CGMMV 的提取纯化

采用差速离心法提纯 CGMMV 病毒粒子,将提纯物负染色后在透射电子显微镜下观察,可见提纯液中有较高数量浓度的杆状病毒粒子,大小约为 300 nm \times 18 nm,符合 CGMMV 粒子形态特征。

2.3 制备的单克隆抗体类型、亚类型及效价

通过免疫小鼠和细胞融合培养,共筛选并建立阳性单克隆杂交瘤细胞株 8 株。收集杂交瘤细胞,制备并收集小鼠腹水,经纯化后采用 ELISA 间接法测定抗体效价,抗体类型亚类型。结果显示,与 8 株杂交瘤细胞对应的腹水抗体效价均大于 1×10^{-7} ,其中抗体 A1、A2、A3 的类型为 IgG2a,抗体 A4、A5、A6、A7、A8 类型为 IgG2b。8 株单抗轻链均为 κ 链 (表 1)。

表 1 CGMMV 单克隆抗体的特性

Table 1 Properties of monoclonal antibodies against cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)

抗体编号	抗体类型、亚类型	抗体效价
A1	IgG2a, κ	1×10^{-7}
A2	IgG2a, κ	1×10^{-7}
A3	IgG2a, κ	1×10^{-7}
A4	IgG2b, κ	1×10^{-7}
A5	IgG2b, κ	1×10^{-7}
A6	IgG2b, κ	1×10^{-7}
A7	IgG2b, κ	1×10^{-7}
A8	IgG2b, κ	1×10^{-7}

2.4 单克隆抗体配对筛选

应用双抗夹心 ELISA 法对制备得到的抗体进行配对筛选。选取检测中灵敏度最高的抗体 A8 偶联辣根过氧化物酶 (A8H),其余抗体作为包被抗体,对稀释后的病毒进行配对检测,筛选可以用于双抗夹心配对检测的最佳配对抗体。由表 2 可知,单抗 A3 作为包被抗体与单抗 A8H 作为检测抗体配对效果最佳。因此选择 A3 与 A8H 作为双抗夹心 ELISA 检测试剂盒的核心抗体。

2.5 CGMMV 检测试剂盒的抗体使用质量浓度

为确定抗体的最佳检测浓度,选用不同质量浓

度(1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、10.0 $\mu\text{g/ml}$)的单抗 A3 包被酶标板,选择不同孵育质量浓度(0.10 $\mu\text{g/ml}$ 、0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、1.00 $\mu\text{g/ml}$)的 A8H 进行检测。根据检测结果(表 3),选定 A3 的包被质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/ml}$,A8H 的检测质量浓度为 1.00 $\mu\text{g/ml}$ 作为双抗夹心 ELISA 检测试剂盒的抗体使用质量浓度。

表 2 单克隆抗体配对筛选

Table 2 Matching and screening of monoclonal antibodies

包被抗体编号	抗体检测病毒稀释液的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值			
	稀释液对照	1×10^{-9} 稀释	1×10^{-8} 稀释	1×10^{-7} 稀释
A1	0.101	0.135	0.219	1.257
A2	0.101	0.113	0.191	1.003
A3	0.087	0.160	0.525	3.710
A4	0.085	0.085	0.096	0.312
A5	0.078	0.094	0.092	0.259
A6	0.092	0.100	0.111	0.201
A7	0.074	0.078	0.086	0.169
A8	0.127	0.138	0.111	0.266

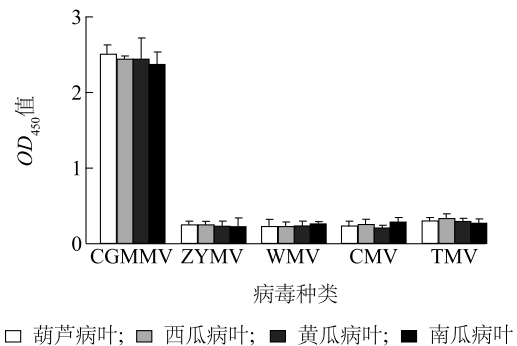
表 3 CGMMV 检测试剂盒的包被抗体质量浓度测定

Table 3 Concentration detection of the coating antibodies of CGM-MV detection kit

包被抗体质量浓度($\mu\text{g/ml}$)	病毒标准品质量浓度($\mu\text{g/L}$)	不同质量浓度抗体检测的 OD_{450} 值		
		1.00 $\mu\text{g/ml}$	0.25 $\mu\text{g/ml}$	0.10 $\mu\text{g/ml}$
1.0	100	3.343	2.513	1.799
	32	1.225	0.841	0.609
	2	0.467	0.316	0.235
	0	0.237	0.121	0.119
2.5	100	4.000	3.480	2.934
	32	1.914	1.422	1.033
	2	0.717	0.49	0.346
	0	0.192	0.107	0.106
5.0	100	4.084	4.001	3.396
	32	2.595	1.814	1.423
	2	0.989	0.780	0.538
	0	0.268	0.172	0.140
10.0	100	4.509	4.122	3.887
	32	3.213	2.560	2.103
	2	1.700	1.220	0.913
	0	0.828	0.404	0.299

2.6 CGMMV 检测试剂盒的特异性

对 CGMMV 检测试剂盒的特异性进行分析,结果(图 1)表明,感染 CGMMV 的葫芦组织呈现很强的阳性反应,而健康组织以及分别感染 TMV、ZYMV、WMV、CMV 的植物组织呈现阴性反应,并且阳性和阴性的 OD_{450} 值差异极显著。说明建立的双抗夹心 ELISA 检测法中使用的抗体对 CGMMV 具有很强的特异性。



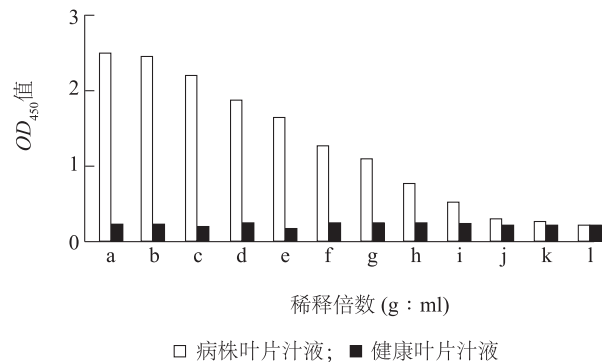
TMV:烟草花叶病毒;ZYMV:小西葫芦黄花叶病毒;WMV:西瓜花叶病毒;CMV:黄瓜花叶病毒。

图 1 CGMMV 检测试剂盒的特异性

Fig.1 Specificity of CGMMV detection kit

2.7 CGMMV 检测试剂盒的灵敏度

用感染 CGMMV 的病叶叶片研磨液的倍比稀释液对 CGMMV 检测试剂盒进行灵敏度分析。结果(图 2)显示,当 CGMMV 病叶汁液稀释倍数为 1 : 12 800(g : ml)时, OD_{450} 值仍呈现阳性,因此此稀释倍数即为试剂盒检测病叶汁液的灵敏度。



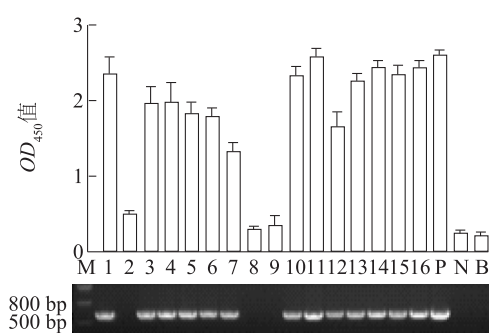
a:1 : 50;b:1 : 100;c:1 : 200;d:1 : 400;e:1 : 800;f:1 : 1 600;g:1 : 3 200;h:1 : 6 400;i:1 : 12 800;j:1 : 25 600;k:1 : 51 200;l:1 : 102 400。

图 2 CGMMV 检测试剂盒的灵敏度

Fig.2 Sensitivity of CGMMV detection kit

2.8 试剂盒田间检测应用及检测结果的 PCR 验证

用以单抗 A3 和 A8H 为核心建立的双抗夹心 ELISA 试剂盒对江苏省田间葫芦科作物调查采集的样品进行检测。在随机抽取的 16 个样品中,ELISA 检测阳性样品有 13 个,阴性样品有 3 个(图 3)。进一步分别提取每个样品 RNA 进行 RT-PCR,发现 ELISA 检测呈阴性的 2 号、8 号、9 号样品未扩出条带,而其他 ELISA 检测呈阳性的样品均扩增得到大小正确的特异性条带(图 3),PCR 产物测序结果表明这些样品均感染了 CGMMV。由此可见,本研究制备的双抗夹心 ELISA 试剂盒的检测结果准确可靠,可用于检测田间感染 CGMMV 的样品。



M: DNA marker; 1~16: 田间样品; P: 人工接毒的阳性对照; N: 健康叶片(阴性对照); B: 空白对照。

图3 CGMMV 试剂盒和 RT-PCR 检测田间样品

Fig.3 Detection results of samples in field by CGMMV kit and RT-PCR

3 讨论

CGMMV 是在瓜类作物中分布十分广泛的一种重要病毒,它在全球的广泛流行造成了十分严重的经济损失。而建立该病毒的检测技术是防控病害的首要任务和关键。加之该病毒病具有前轻后重的特点,前期难以引起重视,从而导致后期坐果时病害大爆发,大面积减产甚至绝收,造成无法挽回的损失^[2]。因此,迫切需要建立一种在病害发生初期即可进行快速精准诊断的检测手段。

目前,血清学检测技术具有简便、高通量等优点,多数植物病毒均有对应的检测抗体和检测方法^[10, 13-15]。目前已有针对 CGMMV 病毒粒子或其衣壳蛋白的单抗和多抗制备的报道^[16-18],但国内商业化的检测试剂盒仍依赖于进口。本研究在前人工作

的基础上制备了 8 株抗 CGMMV 的单克隆抗体并创制了具有自主知识产权的双抗夹心 ELISA 检测试剂盒。该试剂盒利用辣根过氧化物酶标记,检测时长小于 5 h,对 CGMMV 具有很好的特异性,对病叶检测的灵敏度达 1:12 800(g: ml) 稀释倍数。试剂盒对田间样品的检测结果与灵敏度较高的 RT-PCR 检测结果完全吻合,证明该试剂盒所用抗体及检测方法具有很好的准确性。与 RT-PCR 方法相比,试剂盒检测省去了 RNA 提取和反转录等繁琐步骤,更加简便高效。目前对 CGMMV 的血清学检测主要依赖国外进口的单抗或多抗试剂盒,大量样本检测时成本高昂。本研究研制的 CGMMV 单克隆抗体及双抗夹心 ELISA 检测试剂盒弥补了这方面的不足,其中的核心抗体 A3 与 A8H 用量少、价格低廉,更具备灵敏、准确、高效、简便、省时的优点,可用于田间样品标准化大规模检测,在病程早期即可进行准确及时的诊断,从而为该病毒病的早期防控提供有利条件。

参考文献:

- [1] 任春梅,程兆榜,缪倩,等. 江苏黄瓜绿斑驳花叶病毒的鉴定[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(1): 65-70.
- [2] 程兆榜,任春梅,缪倩,等. 江苏黄瓜绿斑驳花叶病毒的发生和防治[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 114-117.
- [3] 李俊香,古勤生. 黄瓜绿斑驳花叶病毒传播方式的研究进展[J]. 中国蔬菜, 2015, 1(1): 13-18.
- [4] AINSWORTH G C. Mosaic disease of cucumber[J]. Annals of Applied Biology, 2008, 22(1): 55-67.
- [5] 秦碧霞,蔡健和,刘志明,等. 侵染观赏南瓜的黄瓜绿斑驳花叶病毒的初步鉴定[J]. 植物检疫, 2005, 19(4): 198-200.
- [6] 陈红运,赵文军,程毅,等. 辽中地区西瓜花叶病病原的分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 306-309.
- [7] SLAVOKHOTOVA A A, ANDREEVA E N, SHIJAN A N, et al. Specifics of the coat protein gene in Russian strains of the cucumber green mottle mosaic virus[J]. Genetika, 2007, 43(11): 1221-1226.
- [8] LING K S, LI R, ZHANG W. First report of cucumber green mottle mosaic virus infecting greenhouse cucumber in Canada[J]. Plant Disease, 2014, 98(5): 701-701.
- [9] 蔡明,李明福,江东. 日本、韩国黄瓜绿斑驳花叶病毒发生及防控策略[J]. 植物检疫, 2010, 24(4): 65-68.
- [10] 任春梅,程兆榜,朱慧,等. 3 种麦类土传花叶病毒的多抗制备及检测应用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 143-146.
- [11] WU J, NI Y, LIU H, et al. Monoclonal antibody-based serological assays and immunocapture-RT-PCR for detecting Rice dwarf virus in field rice plants and leafhopper vectors[J]. Journal of Virology

- cal Methods, 2014, 195(1):134-140.
- [12] SHANG H, YAN X, ZHOU X, et al. Monoclonal antibody-based serological methods for detection of cucumber green mottle mosaic virus[J]. Virology Journal, 2011, 8(1):228.
- [13] 陈 浙,宋 革,周雪平,等. 西瓜花叶病毒(WMV)单克隆抗体的制备及其应用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(14):2711-2724.
- [14] 宋 革,郭玉双,饶黎霞,等. 马铃薯Y病毒单克隆抗体的制备及其检测应用[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2016, 42(5):517-526.
- [15] 宋西娇,刘 欢,周雪平,等. BBTV 单克隆抗体的制备及其检测应用[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(2):288-294.
- [16] 陈红运,赵文军,白 静,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒 cp 基因的原核表达及抗血清制备[J]. 植物病理学报, 2007, 37(5):467-471.
- [17] 李桂芬,马 洁,陈红运,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒多克隆抗体制备及检测应用[J]. 河南农业科学, 2007, 36(11):76-78.
- [18] 尚海丽,周雪平,陈 青,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒单克隆抗体的制备[J]. 热带作物学报, 2010, 31(7):1162-1166.

(责任编辑:张震林)