

柑橘衰退病毒多克隆和单克隆抗体的制备及检测效果分析

Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies Against Citrus Tristeza Virus and Their Efficiency for the Detection of the Virus

王彩霞^{1,3}, 王国平^{1,2}, 洪 霓^{1,2,3*}, 姜 波^{1,3}, 刘 辉^{1,3}, 吴康为¹

WANG Cai-Xia¹, WANG Guo-Ping^{1,2}, HONG Ni^{1,2,3*}, JIANG Bo^{1,3}, LIU Hui^{1,3} and WU Kang-Wei¹

1 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

2 华中农业大学国家果树脱毒种质资源室内保存中心, 武汉 430070

3 华中农业大学国家农业微生物重点实验室, 武汉 430070

1 College of Plant Science and Technology, Wuhan 430070, China

2 National Indoor Conservation Center of Virus-free Gemplasms of Fruit Crops, Wuhan 430070, China

3 State Key Laboratory of Agromicrobiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China

摘 要 通过改进提纯方法获得了柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)的提纯液,其产量为 1mg/100g 植物组织。用 CTV 免疫大耳白兔,获得多克隆抗体,间接 ELISA 效价为 1:25 600。用 CTV 免疫小鼠,经细胞融合、ELISA 筛选和克隆化培养,获得 18 株能稳定分泌抗 CTV 单克隆抗体的杂交瘤单细胞株。对其中 4 株单克隆腹水抗体进行分析的结果表明,这些抗体的 ELISA 效价为 1:51 200~1:204 800,其中 2G 和 3H 的抗体类型及亚类为 IgG2a,1E 和 4H 为 IgG2b。用所制备抗体对不同来源柑橘样品的 CTV 检测结果显示,单克隆和多克隆抗体结合使用,采用三抗体夹心 ELISA(TAS-ELISA)可以获得理想的检测效果,其特异性强、灵敏度高。同时发现所分析 4 株单克隆抗体对不同的 CTV 分离物鉴别能力存在差异,但有关这些 CTV 分离物的特性及其血清学关系还需进一步研究。

关键词 柑橘衰退病毒,多克隆抗体,单克隆抗体,三抗体夹心 ELISA

中图分类号 S432.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0629-06

Abstract Citrus tristeza virus (CTV) was purified from a citrus sample by a modified protocol, and the yield was about 1mg from 100g citrus tissues. Polyclonal antibody was prepared by immunizing rabbits with the purified CTV preparation with a titer 1:25 600 in indirect ELISA test. Eighteen hybridoma-cell lines secreting monoclonal antibodies (MABs) against CTV were screened after the fusion of mouse myeloma cells (SP2/0) with spleen cells from BALB/c immunized with the virus preparation. Four hybridoma-cell lines were selected randomly for later analysis. The results indicated that the titers of ascetic fluids against these hybridoma cell lines ranged from 1:51 200 to 1:204 800 in indirect ELISA, and their isotypes and subclasses were IgG2a for 2G and 3H and IgG2b for 1E and 4H. These four Mabs were used to detect CTV in citrus samples in different sources. Results showed that TAS-ELISA with polyclonal antibody as trapping antibody and monoclonal antibody as testing antibody had a higher specificity and sensitivity than PAS-ELISA. Four Mabs showed different intensities of serological reaction with different CTV isolates. However, much work remains for realizing the characteristics and the serological relationships among these isolates.

Key words Citrus tristeza virus (CTV), polyclonal antibody, monoclonal antibody, TAS-ELISA

Received: November 11, 2005; Accepted: March 14, 2006.

This work was supported by the grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2001AA241142).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87283278; E-mail: whni@mail.hzau.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(No.2001AA241142) © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV)广泛分布于世界各柑橘产区,其引起的衰退病是最具危害性的柑橘病害之一,该病毒主要通过蚜虫和带毒接穗传播^[1]。CTV存在明显的株系分化现象,除少数株系在某些柑橘品种上不产生可见症状外,大部分株系能在柑橘上产生明显症状,常见症状可分为三大类型,即速衰型、茎陷点型和苗黄型。速衰型症状主要表现在以酸橙作砧木的甜橙等感病柑橘上,茎陷点症状的发生与砧木种类无关,常导致葡萄柚或甜橙产量降低、品质下降、植株矮化;苗黄症状在田间很少发生,主要是在酸橙、来檬或葡萄柚的苗期引起严重褪绿和矮化。CTV为长线性病毒科(*Closteroviridae*)长线性病毒属(*Closterovirus*)成员,病毒粒子细长弯曲,大小约 $2\ 000\text{nm} \times (10 \sim 12)\text{nm}$,其基因组全长约为 2×10^4 个核苷酸(nt),是已知植物病毒中基因组最大的病毒。CTV具有2种外壳蛋白,其中主要外壳蛋白(CP)分子量为25 kD,包裹了病毒粒子长度的95%;次要外壳蛋白(dCP)分子量为27kD,包装在病毒粒子的尾部^[1,2]。

针对CTV引起的柑橘衰退病,各国普遍采取的防治措施是使用无病毒的种苗和采用抗病或耐病砧木。而在美国和巴西等国利用弱毒株系对强毒株系的交叉保护作用对该病取得了很好的控制效果^[3,4]。病毒的检测是无病毒种质培育和弱毒株系筛选过程中的一个重要环节,目前,美国、西班牙、日本和意大利等国均已研制出针对该国特定CTV株系的血清学检测试剂盒^[5-9]。我国对CTV的研究始于20世纪50~60年代,大量的研究表明该病毒的多种株系在我国有广泛的分布,传毒性强的介体褐色橘蚜(*Toxoptera citricida* Kirkaldy)也广泛存在。随着我国柑橘品种结构的调整,强毒株系的危害变得日益严重^[10-13]。近些年来,柑橘无病毒种质的培育和具有区域化特点的弱毒株系筛选已引起我国相关科研工作者的重视。本研究通过改进CTV的提取方法,制备了该病毒的多克隆和单克隆抗体,旨在为进一步研究我国CTV的株系特点、血清学关系及建立高通量、快速的病毒检测技术等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗体:对照用CTV多克隆抗体由意大利Martelli教授提供。

1.1.2 柑橘样品:用于病毒提纯的样品来源于田间

表现茎陷点症状的甜橙植株,该植株经采用意大利提供抗体进行ELISA检测、电镜观察和RT-PCR鉴定确认带有CTV。用于检测分析的样品分别采自湖北省、江西省和华中农业大学的柑橘园,寄主包括甜橙、柚类和杂柑。

1.2 病毒提纯

采用了两种病毒提纯方法,方法1参照Bar-Joseph等^[14]和Lee等^[15]报道的方法,病毒粗提液经聚乙二醇6 000(PEG)浓缩后,再经蔗糖和硫酸铯密度梯度离心。方法2在此基础上进行了改进。其步骤为:4~6月份采集感染CTV甜橙的茎尖、叶柄和一年生枝条的皮部组织,经液氮研磨后,加入5倍(W/V)的0.05mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.8,含10%蔗糖和0.5%巯基乙醇),4℃搅拌30min,4层纱布过滤后离心(12 000 r/min, 10min),取上清获得含病毒的粗提液。粗提液经20%和55%蔗糖密度梯度离心(Bechman SW28型转头, 25 000 r/min, 3h)后,分层取样,用ELISA法确定病毒所在的位置。将含病毒的样品混合,再经10%、22.5%和30%硫酸铯密度梯度离心(Bechman SW41型转头, 36 000 r/min, 2h),采用同样方法收集含病毒的样品,适当稀释后,超速离心(30 000r/min, 2h)浓缩病毒。提纯病毒经2%磷钨酸负染,日立H8100型透射电镜下观察病毒粒子形态。

1.3 多克隆抗体制备

用提纯病毒液免疫大耳白兔,第一次耳静脉注射0.3mg,以后为肌肉内多点注射,每两周注射1次,每次0.5mg,用等体积弗氏不完全佐剂(Sigma)乳化,共免疫3次,末次注射2周后从耳静脉取血测定抗血清效价。

1.4 单克隆抗体制备

1.4.1 小鼠免疫:取0.25mL浓度为0.2mg/mL的病毒提纯液与等体积弗氏完全佐剂(Sigma)乳化,皮下多点注射6~8周龄BALB/c小鼠,以后换用弗氏不完全佐剂乳化,间隔2周注射1次,共免疫3次。末次免疫4周后(融合前3d),小鼠脾脏内注射0.5mL相同浓度的提纯病毒液进行加强免疫。

1.4.2 细胞融合、杂交瘤细胞的筛选及克隆:取免疫小鼠的脾细胞与SP2/0鼠骨髓瘤细胞按10:1混合,用50% PEG(Sigma)进行融合。融合细胞经HTA选择性培养液培养筛选8~10d后,继续用HT培养液培养。待融合细胞集落长至培养孔底1/4时,以感染CTV的柑橘汁液为抗原,采用间接ELISA法分别对各培养孔杂交瘤细胞培养上清液进行检测。筛

选出阳性的杂交瘤细胞,经3次有限稀释法克隆获得能稳定分泌抗体的杂交瘤单细胞系。

1.4.3 腹水抗体的制备、效价测定及抗体类型和亚类鉴定 选取8~10周龄BALB/c小鼠,腹腔注射液体石蜡约0.5mL,7~10d后注射扩大培养的克隆化杂交瘤细胞($5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个/只),10d后抽取腹水,5 000r/min离心10min即获得小鼠腹水单克隆抗体。采用间接ELISA法测定其效价,以感染CTV样品吸光值/健康对照吸光值(P/N) > 2作为阳性判断标准。抗体类型及亚类鉴定参照抗体类型及亚类检测试剂盒(HyCult)说明进行。

1.5 Western blot 检测

取0.5g感染CTV柑橘一年生枝条的皮组织,健康皮组织作阴性对照,获得粗提液后进行SDS-PAGE,后将蛋白质电转移至PVDF膜。PVDF膜用5%脱脂奶封闭后,分别移入4株单克隆抗体的稀释液中,37℃孵育30min,阴性对照用4株单克隆抗体的混合稀释液孵育。经洗涤后,PVDF膜移入1:5 000倍稀释的碱性磷酸酯酶(AP)标记羊抗鼠IgG中,37℃孵育30min,最后用底物氮蓝四唑(NBT)和5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸二钠盐(BCIP)显色,观察结果。

1.6 血清学检测方法

感染CTV的柑橘嫩叶在10倍(W/V)的0.01 mol/L的磷酸盐(PBS)缓冲液中研磨获得粗汁液作为抗原,健康植株的汁液作阴性对照,采用TAS-ELISA测定所制备多克隆和单克隆抗体的适宜工作浓度。其方法为:多克隆抗体用包被缓冲液1:300~1:9 600倍比稀释后包被ELISA板,加抗原4℃过夜孵育后,加入经PBST倍比稀释的单克隆腹水抗体,最后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠抗体(1:5 000稀释),经HRP催化底物四甲基联苯胺(TMB)反应,用550型酶标仪(BIO-RAD)测 OD_{450} 值,根据阳性样品与阴性对照吸光值之比(P/N)确定抗体的适宜工作浓度。A蛋白夹心ELISA(PAS-ELISA)参照文献报道的方法^[16]。

2 结果

2.1 病毒提纯效果

提纯病毒经2%磷钨酸负染后,在电镜下观察,可见完整的病毒粒子细长弯曲,大小约为2 000nm × 11nm(图1)。采用方法1提纯,获得病毒提纯液的 $A_{260}/A_{280} = 1.20$,每100g鲜重植物组织可得到约

0.1mg病毒;采用方法2提纯,所获提纯病毒液的 $A_{260}/A_{280} = 1.19$,每100g鲜重植物组织可得到约1mg病毒,表明改进提纯方法所获提纯病毒的产量高(图2)。

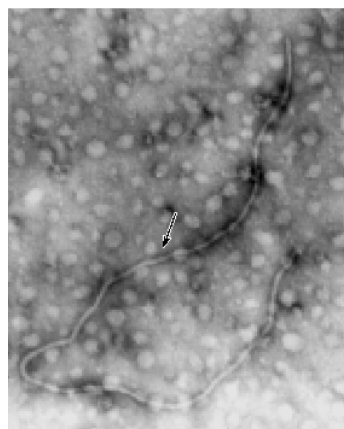


图1 CTV病毒粒子电镜照片(30 000 ×)

Fig.1 Electronic micrograph of CTV particles

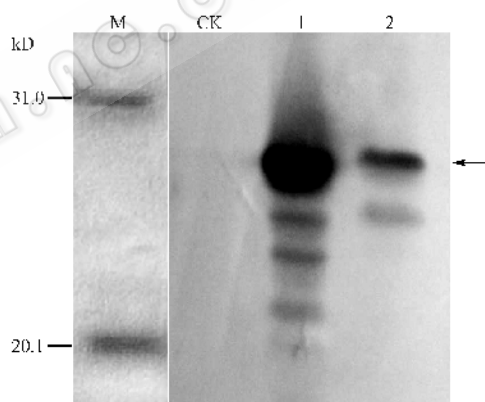


图2 两种方法提纯CTV的Western blot分析

Fig. 2 Western blot of CTV purified by two methods with polyclonal antibody

M: protein weight standards (BBI); CK: healthy sample; 1: viral solution purified from 1g fresh tissue by the modified protocol; 2: viral solution purified from 2g fresh tissue by the method one. Arrow indicates bands of CP.

2.2 多克隆抗体的效价

采用间接ELISA法,以感染CTV的柑橘汁液1:10稀释(W/V)作为抗原,健康汁液作为阴性对照,测得所制备多克隆抗体的效价为1:25 600。

2.3 分泌抗CTV抗体的杂交瘤细胞株筛选

CTV免疫的BALB/c小鼠脾细胞与SP2/0鼠骨髓瘤细胞经PEG融合,其融合率为96.8%,采用间接ELISA法测定各培养孔中的培养液,其阳性孔率为86.4%。

选取20个呈强阳性反应的杂交瘤细胞系,经过

3 次有限稀释法克隆, 获得 18 株能稳定分泌 CTV 特异性抗体的杂交瘤单细胞株, 经扩大培养后腹腔注射小鼠获得其单克隆腹水抗体。

2.4 单克隆抗体效价的测定及其类型与亚类鉴定

从 18 株单克隆抗体中随机选取 1E、2G、3H 和 4H, 采用间接 ELISA 法测定其效价。各株腹水抗体从 1:100 开始倍比稀释, 结果显示, 各株腹水抗体的效价分别为 1:51 200(3H); 1:102 400(2G); 1:204 800(1E 和 4H)(图 3)。采用 HyCult 公司抗体类型及亚类检测试剂盒, 对这 4 株单克隆抗体的杂交瘤细胞培养上清进行测定, 结果表明 2G 和 3H 的抗体类型及亚类为 IgG2a, 而 1E 和 4H 为 IgG2b。

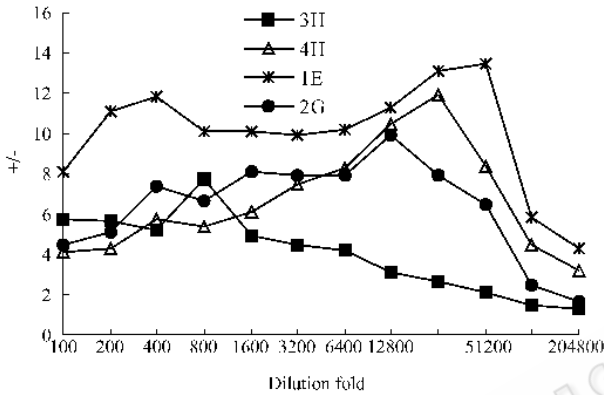


图 3 4 株单克隆腹水抗体的间接 ELISA 效价

Fig. 3 Titers of ascetic fluid from four hybridoma cell lines tested by indirect ELISA

+ / - ratio of optical density at 450nm of CTV infected sample/ healthy sample.

2.5 Western blot 分析

利用 1E、2G、3H 和 4H 4 株单克隆抗体, 对田间感染 CTV 柑橘样品的粗提液进行 Western blot 分析, 从图 4 结果可以看出, 用 4 株单克隆抗体检测带病毒样品, 产生 1~4 条免疫反应条带, 其中 2G 和 3H 仅产生 1 条较强的免疫反应条带(条带 I), 该条带为 4 株单克隆抗体所共有, 其电泳迁移率与已报道的 CTV 主要外壳蛋白相似^[17, 18]; 而 1E 和 4H 除产生该条带外, 还分别有 3 条分子量较低的免疫条带(条带 II、III、IV), 为在提取和处理过程中丢失了部分末端氨基酸序列或部分降解的外壳蛋白^[15, 18]。该结果表明 4 株单克隆抗体所识别的抗原位点有一定的差异, 且与抗体类型有一定的关系, 这些抗体属同一类型(IgG), 但分属两种不同的亚类, 2G 和 3H 为 IgG2a, 1E 和 4H 为 IgG2b。用这 4 株单克隆抗体的等量混合溶液检测阴性对照样品, 未产生可见免疫反应条带, 表明所制备单克隆抗体具有很好的病毒

特异性, 不存在与寄主成分的交叉反应。

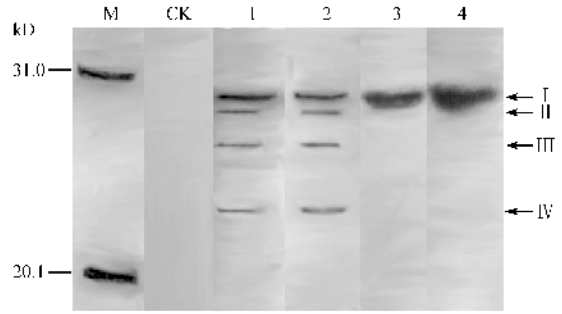


图 4 4 株单克隆抗体的 Western blot 检测柑橘样品中 CTV 的效果

Fig. 4 Western blot analysis of CTV from citrus crude solutions with four Mabs

M: protein weight standards (BBI); CK: healthy sample detected with the cocktail of four Mabs; 1~4: CTV infected samples detected with 1E, 4H, 2G and 3H.

2.6 所制备抗体 TAS-ELISA 法检测 CTV 的适宜工作浓度及检测效果分析

以多克隆抗体作为包被抗体, 稀释 1:300~1:9 600 倍, 4 株单克隆抗体分别作为检测抗体, 稀释 1:3 000~1:384 000 倍, 对带病毒柑橘样品进行检测, 其吸光值均明显大于阴性对照, P/N 值均大于 20。选取 P/N 值最高时的稀释倍数, 作为 TAS-ELISA 分析时抗体的最适工作浓度, 其中多克隆抗体的适宜稀释倍数为 1:4 800, 4 株单克隆抗体的适宜稀释倍数分别为 1:8 000(3H), 1:32 000(2G) 和 1:64 000(4H 和 1E)。

将感染 CTV 柑橘样品的粗提液稀释不同倍数后, 采用以上抗体工作浓度和 TAS-ELISA 法检测, 结果显示 4 株单克隆抗体的检测灵敏度有一定的差异, 其中 1E 和 4H 检测灵敏度达到 1:5 120, 3H 和 2G 的检测灵敏度分别为 1:2 560 和 1:1 280。

采用 TAS-ELISA 和 PAS-ELISA 法同时对 5 个带病毒柑橘样品进行分析, 其中 PAS-ELISA 法检测时, 多克隆抗体预先用健康柑橘汁液进行吸附, 第一抗体工作浓度为 1:1 600, 第二抗体工作浓度为 1:1 000。在 TAS-ELISA 法中第一抗体为多克隆抗体, 未进行预吸附, 检测抗体为 4 株单克隆抗体的混合溶液, 工作浓度为 1:64 000。从表 1 可以看出, 多克隆与单克隆抗体结合使用, 采用 TAS-ELISA 法的检测效果明显好于多克隆抗体单独使用的 PAS-ELISA 法, TAS-ELISA 检测时阳性样品的吸光值均较高, 为阴性对照样品的 17 倍以上, 而 PAS-ELISA 法检测这些样品的吸光值一般为阴性对照样品的 2~7 倍。

表1 TAS-ELISA 和 PAS-ELISA 检测部分柑橘样品结果比较

Table 1 Comparison of TAS-ELISA and PAS-ELISA for the detection of CTV in citrus samples

Samples	TAS-ELISA		PAS-ELISA	
	OD ₄₅₀	P/N	OD ₄₅₀	P/N
PG	1.924	35.62	0.174	3.86
AW	2.288	42.37	0.304	6.76
YC	1.360	25.18	0.231	4.62
SC	3.071	56.87	0.271	5.42
WC	0.919	17.02	0.084	1.87
CK(-)	0.054		0.045	
CK(+)	2.156		0.288	

OD₄₅₀: optical density at 450 nm; CK(-): healthy sample; CK(+): CTV infected sample from which the virus was purified for the raising of antibodies.

2.7 4株单克隆抗体对不同来源分离株的初步鉴定

分别采用 1E、2G、3H 和 4H 4株单克隆抗体和 TAS-ELISA 法,对采自不同果园的 50份已知带有 CTV 的柑橘样品分别进行检测,以混合单克隆抗体作参照,共筛选出 14份血清学上存在差异的样品,表现为同一样品用混合单克隆抗体检测产生较高的吸光值,而不同单克隆抗体分别使用时吸光值有明显的差异;同一株单克隆抗体对不同样品的检测效果也不同,表 2 所列为对部分材料检测的结果,从该表可以看出,用 2G 进行检测时,所有阳性样品吸光值均较高,与混合抗体具有相似的检测效果,而其它 3株抗体检测不同样品的吸光值差异较大,检测样品 B₁₁时,1E 的检测吸光值仅 0.33,而其它 3株单克隆抗体及混合单抗的进行吸光值均大于 1.4,对其它样品的检测也存在类似的现象。

表2 4株单克隆抗体检测不同来源柑橘样品中 CTV 的效果

Table 2 Efficiency of 4 Mabs for the detection of CTV from different citrus plants by TAS-ELISA

Samples	Mabs				
	1E	2G	3H	4H	Mixture of mabs four
JX-25	0.743	2.444	0.233	0.159	2.902
B ₁₁	0.330	> 3.500	1.475	2.544	3.087
PG ₁	0.960	2.360	0.767	0.143	2.735
ChY-10	0.249	1.692	0.247	0.097	2.902
CK(-)	0.100	0.118	0.071	0.053	0.070
CK(+)	1.768	> 3.500	2.112	1.768	3.397

CK(-): healthy sample; CK(+): CTV infected sample from which the virus was purified for the raising of antibodies.

3 讨论

柑橘衰退病毒为韧皮部限制性病毒,寄主仅局限于柑橘属植物,病毒在柑橘体内的含量较低,其提

纯病毒的难度较大。本研究采用了两种提纯方法,发现通过聚乙二醇 6000(PEG)浓缩结合蔗糖和硫酸铯密度梯度离心的方法,产量相对较低,每 100g 鲜重植物组织仅能得到约 0.1mg 病毒。而不使用 PEG 浓缩,直接将得到的粗提液进行蔗糖密度梯度离心可明显提高病毒产量,所获 CTV 提纯液 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.19,与国外报道的比值 1.20^[19]和 1.22^[5]相似,每 100g 鲜重植物组织可得到约 1mg 病毒,大于曾报道的 100g 组织得到 0.1~0.75mg 病毒的产量^[5]。

本实验制备的单克隆和多克隆抗体均可用于柑橘样品中的 CTV 检测,但多克隆抗体单独使用采用 PAS-ELISA 进行检测时,需对抗体进行吸附,在吸附不完全时易出现非特异性反应;而多克隆和单克隆抗体结合使用,采用 TAS-ELISA 检测,无需对抗体进行吸附,且可明显提高检测效果。经 3 次克隆所筛选各单克隆抗体分泌株均具有很好的特异性,且抗体效价高。采用不同的单克隆抗体对来源于不同果园的柑橘样品进行分析,发现所分析 4 株单克隆抗体对不同来源的 CTV 分离物鉴别能力存在差异,但有关这些 CTV 分离物的特性及其血清学关系还需进一步研究。根据 CTV 的外壳蛋白存在株系特异性结合位点这一特性,Permar 等^[8]筛选出可以区分速衰和非速衰株系的单克隆抗体 MCA-13,随后 Nikolaeva 等^[20]利用原核表达 CTV 外壳蛋白制备的多克隆抗体和广谱单克隆抗体,建立了用于区分茎陷点和非茎陷点株系的 TAS-ELISA 法。但两者的应用仅局限于美国的佛罗里达、加里福尼亚等地,在其他国家或地区使用效果均不理想,这表明不同国家或地区发生的 CTV 株系特点及血清学关系存在差异。本研究所制备的单克隆抗体是否可以用于 CTV 株系的鉴别,还需要结合生物学和分子生物学等方面的研究结果进行分析。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review Phytopathology*, 1989, **27**: 291-316
- [2] Febres VJ, Ashoulin L, Mawassi M *et al.* The P27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particle. *Phytopathology*, 1996, **86**: 1331-1335
- [3] Fulton W. Practices and precautions in the use of cross protection for virus disease control. *Annual Review Phytopathology*, 1986, **24**: 67-81
- [4] Costa AS, Muller GW. Tristeza control by cross protection: a USA-Brazil citrus research project. *Plant Disease*, 1980, **64**: 538-544

- [5] Gonsalves D, Purcifull DE, Garnsey SM. Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 1978, **68**: 553 - 559
- [6] Tsuchizaki T, Sasaki A, Saito Y. Purification of citrus tristeza virus from diseased citrus fruits and detection of the virus in citrus tissues by fluorescent antibody techniques. *Phytopathology*, 1978, **68**: 139 - 142
- [7] Vela C, Cambra M, Cortes E *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *Journal of general Virology*, 1986, **67**: 91 - 96
- [8] Permar TA, Garnsey SM, Gumpf DJ *et al.* A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 1990, **80**: 224 - 228
- [9] Salomone A, Mongelli M, Roggero P *et al.* Reliability of detection of citrus tristeza virus by an immunochromatographic lateral flow assay in comparison with ELISA. *Journal of Plant Pathology*, 2004, **86**(1): 43 - 48
- [10] Wang HX(王洪祥), Liu BJ(刘保健), Han LL(韩玲玲). Occurrence and detection of citrus virus and viroid diseases on *Bendiza*(*Citrus succosa*). *Acta Agriculturae Zhejiangensis*(浙江农业学报), 1998, **10**(2): 85 - 89
- [11] Zhou CY(周常勇), Zhao XY(赵学源). Citrus tristeza virus associated with the boat-shape-leaf symptom of *Satsuma mandarin*. *China Citrus*(中国柑橘), 1995, **24**(4): 6 - 9
- [12] Zhou CY(周常勇), Zhao XY(赵学源), Jiang YH(蒋元晖). Investigation of pummel stunt disease and identification of its pathogen. *South China Fruit*(中国南方果树), 1998, **27**(3): 20 - 21
- [13] Zhou Y(周彦), Zhou CY(周常勇), Wang XF(王雪峰) *et al.* The polymorphism of citrus tristeza virus in Chongqing, China of *Satsuma mandarin*. *Acta Phytophylacica Sinica*(植物保护学报), 2005, **32**(2): 143 - 147
- [14] Bar-Joseph M, Gumpf DJ, Dodds JA *et al.* A simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. *Phytopathology*, 1985, **75**: 195 - 198
- [15] Lee RF, Calvert R, Nagel J *et al.* Citrus tristeza virus: characterization of coat proteins. *Phytopathology*, 1988, **78**: 1221 - 1226
- [16] Hong N(洪霓), Liu FC(刘福昌), Wang GP(王国平) *et al.* The detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus by protein A sandwich ELISA. *China Fruits*(中国果树), 1992, **1**: 44 - 47
- [17] Sekiya ME, Lawrence SD, McCaffery M *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Journal of General Virology*, 1991, **72**: 1013 - 1020
- [18] Albiach-Martí MS, Gueri J, Cambra M *et al.* Differentiation of citrus tristeza virus isolates by serological analysis of p25 coat protein peptide maps. *Journal of Virological Methods*, 2000, **88**: 25 - 34
- [19] ÖZTÜRK S, Çirakoğlu B. Production of a monoclonal antibody specific for citrus tristeza virus. *Food and Agricultural Immunology*, 2003, **15**(1): 65 - 73
- [20] Nikolaeva OV, Karasev AV, Garnsey SM *et al.* Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Diseases*, 1998, **82**: 1276 - 1280