

农业生物技术

茶尺蠖核型多角体病毒多角体蛋白单克隆抗体的制备

杜军利^{1,3}, 张传溪², 付建玉¹, 陈正贤², 肖强¹

1 中国农业科学院茶叶研究所, 浙江 杭州 310008

2 浙江大学昆虫科学研究所, 浙江 杭州 310058

3 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070

杜军利, 张传溪, 付建玉, 等. 茶尺蠖核型多角体病毒多角体蛋白单克隆抗体的制备. 生物工程学报, 2012, 28(1): 76-85.

Du JL, Zhang CX, Fu JY, et al. Preparation of a monoclonal antibody against polyhedrin of *Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 76-85.

摘 要: 为了建立一种基于免疫反应检测茶尺蠖核型多角体病毒的方法, 以纯化后的茶尺蠖核型多角体病毒作为抗原, 免疫 BALB/c 小鼠, 将小鼠脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 融合, 经间接 ELISA 筛选及克隆得到了一株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 7D3。同时克隆并在大肠杆菌中表达了 EoNPV 多角体蛋白基因, 获得重组多角体蛋白。经 Western blotting 鉴定, 该抗体可与 EoNPV 的多角体蛋白特异性结合。利用制备 EoNPV 多角体蛋白的单克隆抗体, 建立了间接 ELISA 测定 EoNPV 的方法。

关键词: 茶尺蠖核型多角体病毒, 多角体蛋白, 单克隆抗体

Preparation of a monoclonal antibody against polyhedrin of *Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus

Junli Du^{1,3}, Chuanxi Zhang², Jianyu Fu¹, Zhengxian Chen², and Qiang Xiao¹

1 Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, Zhejiang, China

2 Institute of Insect Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

3 College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: To develop a method based on immunoreactions for detection of *Ectropis obliqua* Nucleopolyhedrovirus (EoNPV), the polyhedra of the virus were purified and used to immunize the mouse BALB/c. The spleen cells from the immunized mice

Received: June 21, 2011; **Accepted:** October 31, 2011

Supported by: National Key Technology Research and Development Program (No. 2011BAD01B02), Science and Technology Program of Zhejiang Province (No. 2011R09027-13).

Corresponding author: Qiang Xiao. Tel: +86-571-86650801; E-mail: xqtea@vip.163.com

国家科技支撑计划 (No. 2011BAD01B02), 浙江省科技计划 (No. 2011R09027-13) 资助。

were then fused with the myeloma cell line Sp2/0. A hybridoma cell line which can stably secrete the monoclonal antibody against *EoNPV* was achieved by using indirect ELISA screening and cloning methods, and was named as 7D3. Meanwhile, the *polyhedrin* gene was cloned from *EoNPV* and expressed in *E. coli*. Western blotting analysis showed that the monoclonal antibody prepared from 7D3 could specifically react with the recombinant polyhedrin. An indirect ELISA method based on this monoclonal antibody for detecting *EoNPV* in infected tea looper was developed.

Keywords: *Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus, polyhedrin, monoclonal antibody

茶尺蠖 *Ectropis obliqua* Prout 属鳞翅目尺蛾科, 是我国主要茶树害虫之一, 广泛分布于长江中下游茶区, 其中浙江、江苏、安徽 3 省发生尤为严重。其幼虫咬食嫩叶和芽头, 严重发生时常将整片茶园茶树啃成光杆, 对茶叶生产影响大。

茶尺蠖核型多角体病毒 (*Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus, *EoNPV*) 于 1977 年在我国首次发现^[1], 属杆状病毒科, 核型多角体病毒属。*EoNPV* 是自然条件下控制茶尺蠖种群的主要病原性天敌因子, 它通过幼虫取食后侵入虫体并迅速增殖, 使其感染发病而死亡, 进而在种群中造成病毒流行病。我国较早开展了 *EoNPV* 的生物学及应用基础研究, 目前该病毒制剂已获批农药登记许可, 广泛应用于浙江省及周边省区茶园。传统的 *EoNPV* 的检测依赖 LT_{50} 和 LC_{50} 两个生物测定参数; 作者前期研究利用荧光定量 PCR 方法测定茶尺蠖核型多角体病毒拷贝数, 为病毒的深入研究和病毒制剂的定量检测提供了方法依据^[2]; 进一步研究建立快速定性、定量检测 *EoNPV* 的技术对茶园昆虫病毒研发与大面积推广应用具有重要的作用。本研究通过制备获得 *EoNPV* 的单克隆抗体, 该抗体能特异地与 *EoNPV* 病毒粒子蛋白结合, 并建立了基于此单抗的 ELISA 检测方法, 从而为 *EoNPV* 的准确快速检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/c 小鼠及其饲料购自上海医科大学; 茶尺蠖野生型种群采自中国农业科学院茶叶所试验茶园, 并经室内继代饲养; 茶尺蠖核型多角体病毒 (*EoNPV*) 由中国农业科学院茶叶研究所保存。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠为 Sigma 公司产品; RPMI-1640、HAT、HT 培养基、PEG6000 购自 Gibco 公司; 牛血清蛋白 (BSA) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 其他常规试剂均为国产分析纯。小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 引自浙江大学农业与生物技术学院生物技术研究所, 用高糖的 DMEM 培养基传代培养。

1.2 *EoNPV* 病毒粒子的分离纯化

收集感染 *EoNPV* 而死亡的茶尺蠖幼虫作为试虫, 将其磨碎; 用 5 层粗棉布过滤其中较大颗粒后, 反复 3 000~5 000 r/min 离心, 用 1×PBS 反复洗涤纯化的多角体, 至乳白色为止; 加入适量新配制的裂解液 0.1 mol/L Na_2CO_3 , 0.05 mol/L NaCl (pH 10.3) 裂解多角体 1~2 h; 用 50% 的 HCl 中和碱液, 3 000 r/min 离心 5 min, 去除其中未裂解的多角体; 在 160 000 r/min、1.5 h 超速离心, 沉淀 *EoNPV* 病毒粒子; 使用 PBS 悬浮纯化的病毒粒子, 存于 4 °C 冰箱待用^[3-4]。

1.3 小鼠免疫

将经超速离心纯化后的茶尺蠖核型多角体病毒粒子作为抗原与等量福氏完全佐剂充分混合,经皮下多点注射 BALB/c 小鼠,每只 200 μ L,间隔 14 d 用含等量的福氏不完全佐剂的蛋白抗原相同剂量作第 2、3 次免疫,14 d 后,腹腔注射不加佐剂的蛋白抗原,每只 200 μ L,3 d 后取脾细胞用于细胞融合^[5-7]。

1.4 细胞融合和克隆

在加强免疫后 3 d 左右获取小鼠脾细胞,将其与正处于对数生长期的骨髓瘤细胞进行融合,每次融合后,将细胞接种于 96 孔培养板,用含 HAT 的 1640 完全培养基选择培养 10 d 左右,然后将 HAT 改为 HT 培养 1 周^[8-9]。待细胞长至显微镜视野的 1/4,取培养上清用 ELISA 法检测抗体,将原免疫用抗原 *EoNPV* 病毒粒子稀释 100 倍作为包被抗原^[10-11],使用间接 ELISA 方法检测获得阳性细胞;再以阴性对照(包括 Bt 生物制剂、菜青虫颗粒体病毒)作为包被抗原对所选阳性细胞进行再筛选,最终获得的阳性细胞株只对 *EoNPV* 病毒多角体蛋白表现阳性反应;选择最终的阳性细胞以有限稀释法进行克隆^[12-14]。

1.5 阳性单克隆抗体细胞株的筛选

对克隆后检测为阳性的单克隆细胞株进行规律传代培养,并且每一代检测它们的抗体分泌情况,最终获得稳定分泌抗体的 *EoNPV* 单克隆抗体细胞株。

1.6 小鼠腹水抗体制备及效价测定

将最后筛选出的阳性单克隆杂交瘤细胞株进行扩大培养,并向小鼠腹部注射降植烷。1 周

后,使用生理盐水将细胞沉淀悬浮,接种于小鼠腹腔,待小鼠腹腔明显鼓胀,抽取腹水测定其抗体效价并保存于 -20 $^{\circ}$ C,用于检测^[15]。

培养上清或腹水经稀释后,加到包被原包被的酶标板中,孵育、洗涤后,再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,底物显色。阳性对照为小鼠阳性血清,同时分别以同等稀释的 Sp2/0 培养上清,或无免疫小鼠血清为阴性对照,空白对照为 PBS^[16]。

1.7 单抗的稳定性

将分泌抗体的杂交瘤细胞株体外连续传代,或置液氮中冻存 3 个月后复苏,用间接 ELISA 方法检查该细胞株分泌单抗的稳定性^[17]。

1.8 *ph* 基因的克隆与原核表达

根据 *EoNPV* 基因组序列 (GenBank Accession No. NC_008586.1) 的 *ph* 基因^[18-21],设计了一对特异性引物, *EoNPV ph* F: 5'-GGATCCatgtataactcgttaca-3' 和 *EoNPV ph* R: 5'-CTCGAGttaatacgcaggtcct-3',扩增 *ph* 基因,PCR 反应采用 25 μ L 体系,PCR 扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定,预测片段大小约 741 bp。

扩增的产物克隆至 pMD18-T 克隆载体,连接产物转化 TG1 感受态细胞,提取质粒,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的表达载体质粒 pGEX-4T2,提取质粒并通过 PCR 鉴定,最后得到与谷胱甘肽融合表达的载体质粒 pGEX-4T-2-*ph*。

将 pGEX-4T-2-*ph* 转化至表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达,挑取单菌落于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下振荡培养过夜。次日转接 5% 培

养液于新鲜 5 mL LB 培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.4~0.6 (2~3 h), 加入 IPTG, 37 °C 继续诱导培养 5~8 h, 分别收集菌体, 用适量 PBS 稀释后, 加入 2×SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min 去除不溶物, 取 10 μ L 进行 SDS-PAGE 检测及 Western blotting 分析。同时, 以 BL21 菌液和转化 pGEX-4T2 的诱导菌液作为对照。

1.9 Western blotting 分析

多角体蛋白 (Polyhedrin, PH)、*EoNPV* 病毒粒子、pGEX-4T-2 载体蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后, 分离胶及与胶相同大小的 PVDF 膜和 3 层滤纸在转移缓冲液中平衡 15~20 min; 将 3 层滤纸、分离胶、PVDF 膜和 3 层滤纸依次装入转移夹中, 以 Bio-Rad 转印槽半干转移, 转移条件为恒电压 15V 15 min; PVDF 膜用封闭液 (4% 脱脂奶粉) 室温封闭 1 h; 加入小鼠腹水于洗涤液中稀释 1 000 倍, 室温反应 1 h 或 4 °C 反应过夜; PBST 洗涤 3~5 次, 每次 5 min; HRP 酶标的羊抗鼠二抗于洗涤液中室温反应 1 h; 洗涤 3~5 次, 每次 5 min; 加入 10 mL HRP 反应底物 DAB 溶液覆盖于 PVDF 膜上显色, 待阳性条带显示后, 用 ddH₂O 终止反应^[22-24]。

1.10 最适工作浓度的确定

把浓度为 1.5 g/L 的纯化病毒从 1 : 100 开始依次倍比稀释, 稀释至 1 : 204 800。由左至右依次加入 96 孔板, 置于 4 °C 包被过夜或者 37 °C 包被 2 h。使用间接 ELISA 进行检测, 当需加入一抗时, 将单克隆抗体从 1 : 1 500 开始依次倍比稀释, 稀释至 1 : 192 000, 由上而下依次加入 96 孔板。显色后置于酶标仪上读板^[25-26]。

1.11 检测灵敏度的测定

感染 *EoNPV* 的虫体汁液按 1 : 10~1 : 327 680 倍比稀释, 把纯化后的 *EoNPV* 病毒粒子 (1.5 g/L) 使用包被液从 1 : 10~1 : 5 120 倍比稀释后, 分别作为抗原, 设置 3 个重复, 并以未感染病毒的茶尺蠖虫体汁液作为阴性对照。再将上述稀释液加入反应孔中, 4 °C 包被过夜, 使用间接 ELISA 方法进行灵敏度检测^[27-28]。

1.12 样品检测

获取涂抹 *EoNPV* 的叶片饲喂的茶尺蠖和健康叶片饲喂茶尺蠖各 30 头, 称取虫体重量。磨碎后, 根据体重分别稀释 10 倍, 进行 ELISA 检测。用提纯的 *EoNPV* 作阳性对照, 包被液作阴性对照。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的建立

杂交瘤细胞培养上清的间接 ELISA 的检测结果表明: 以细胞培养上清对 *EoNPV* 抗原 OD_{492} 值, 与正常 BALB/c 小鼠血清对 *EoNPV* 抗原的 OD_{450} 值之比大于 2.1, 且杂交瘤细胞上清对 Bt 的检测结果为阴性, 判为阳性杂交瘤细胞。经过筛选和有限稀释法亚克隆, 获得了 1 株阳性杂交瘤细胞, 命名为 7D3。

2.2 单抗的稳定性

经过连续传代冻存 2 个月后, 将杂交瘤细胞复苏, 该细胞株仍能分泌抗体, 间接 ELISA 检测效价和原来效价无差别, 表明该杂交瘤细胞分泌抗体的稳定性较好。

2.3 杂交瘤细胞腹水效价测定

把杂交瘤细胞注射进入小鼠腹部后, 获得该

杂交瘤细胞的腹水。腹水先稀释 100 倍，而后再依次倍比系列稀释，最后使用间接 ELISA 法测定 OD_{450} 值，同时设立阳性阴性血清对照。杂交

瘤细胞腹水的 OD_{450} 值之比大于 2.1 时的最大稀释度即为其 ELISA 效价，经检测得知该杂交瘤细胞的效价为 10^6 (图 1)。

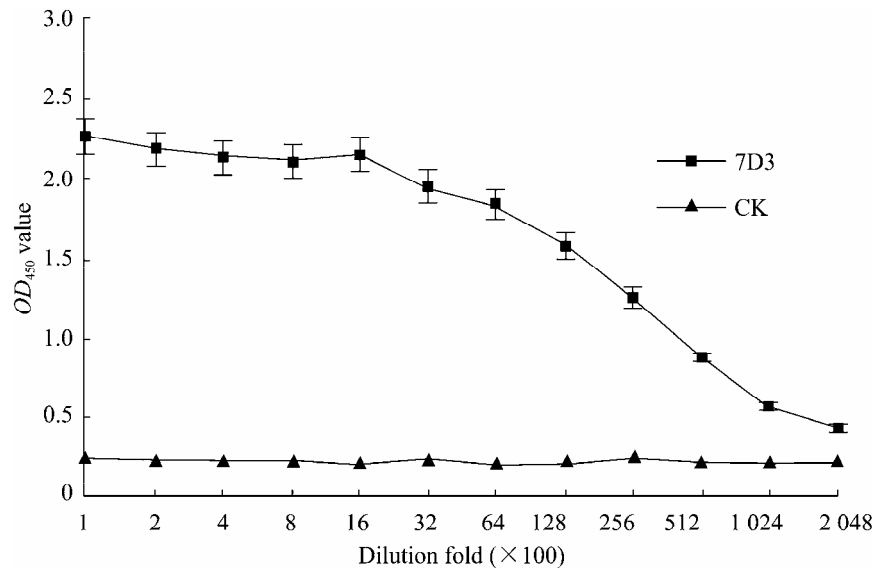


图 1 细胞株 7D3 的抗体效价测定

Fig. 1 The titres of ascitic of cell line 7D3.

2.4 用制备的单抗对病毒进行 Western blotting 检测

把 *EoNPV* 进行 SDS-PAGE 后转移到 PVDF 膜，用制备的单抗为一抗，进行 Western blotting 检测。结果显示，在约 28 kDa 处有强阳性条带 (图 2)，与 SDS-PAGE 上出现的多角体蛋白条带大小相近，推测所获得的单抗应是一种多角体蛋白 (PH 蛋白) 单抗。

2.5 *ph* 基因原核表达质粒的构建

为了确认获得的单抗是一种多角体蛋白单抗，进一步克隆表达多角体蛋白基因 *ph*。首先用引物 *ph* F、*ph* R 从 *EoNPV* 基因组 DNA 中扩增出长度 741 bp 的 *ph* 基因，连接至 pMD18-T 克隆载体，测序结果与预期结果相符，使用 *Bam*H I

和 *Xho* I 双酶切鉴定，回收片段，将其定向克隆至由 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切过的 pGEX-4T-2 载体，PCR 鉴定，结果显示获得表达质粒 pGEX-4T-2-*ph* (图 3)。

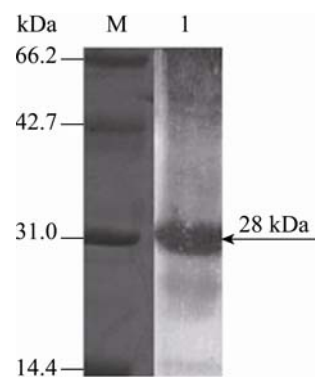


图 2 *EoNPV* 的 Western blotting 分析

Fig. 2 Western blotting analysis of *EoNPV*. M: protein marker; 1: virus of *EoNPV*.

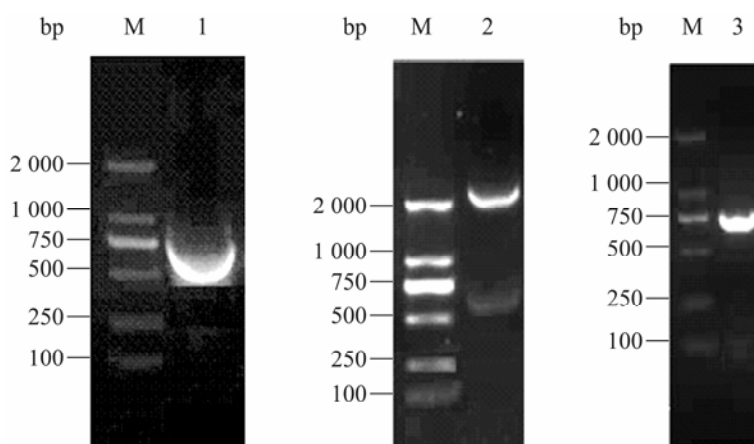


图3 *ph* 基因原核表达质粒的构建

Fig. 3 Construction of *ph* gene prokaryotic expression-vector plasmid. 1: PCR product of *ph* gene; 2: recombinant pMD18-T vector was identified by double enzyme digestion with *Bam*H I and *Xho* I; 3: pGEX-4T-2-*ph* was identified by PCR.

2.6 *ph* 基因的表达和 Western blotting 分析

表达质粒 pGEX-4T-2-*ph* 转化大肠杆菌 BL21, 收集经 IPTG 诱导的菌体进行 SDS-PAGE 检测, 结果表明, 大约 54 kDa 处有明显的特异性条带 (图 4), 与 GST 和 polyhedrin 融合表达产物大小相符。然后使用已制备的 *Eo*NPV 的单抗进行 Western blotting 分析, 发现该抗体与 *Eo*NPV 病毒粒子和 *ph* 基因原核表达蛋白均有特异性条带, 而且蛋白大小与预期一致, 同时显示阳性的还有一条分子量约为 40 kDa 的条带, 可能是 *ph* 基因不完全表达产物或表达产物的降解产物。而作为阴性对照的空 PGEX-4T-2 载体表达产物与杂交瘤细胞的腹水无明显的条带出现 (图 4)。

2.7 工作浓度的确定

检测用的 *Eo*NPV 单抗腹水倍比稀释后进行间接 ELISA 检测, 单抗在 1:192 000 范围内均

可用于检测, 与在此范围内的阴性对照的 *OD* 值非常低, *P/N* 值大于 >8, 但是在实际应用时要求有较高的灵敏度, 因此我们选择单抗腹水稀释倍数为 1:6 000 作为间接 ELISA 的最适工作浓度, 另外二抗的最适浓度为 1:5 000。

2.8 检测灵敏度的确定

把感染病毒的病虫体液倍比稀释后经间接 ELISA 检测, 从 1:10 到 1:20 480 都是较理想的稀释度, 当稀释度为 1:10 240 时, *P/N*<2.1, 所以其检测极限为 1:5 120。纯化后的 *Eo*NPV 粒子 (1.5 g/L) 及未感染的茶尺蠖虫体液倍比稀释后, 进行间接 ELISA 检测, 7D3 细胞株所得单抗对纯化的 *Eo*NPV 粒子有较高的灵敏度, 灵敏度可达到 6 ng (图 5)。由此可建立了一条标准曲线, 方程为 $y = -0.4144x + 3.0742$ ($R^2 = 0.9929$, 图 6)。该标准曲线可计算未知样品的稀释倍数 x , 病毒浓度 (g/L) 即为 $1.5 \div (2^x \times 100)$ 。一般实验中

都以多角体个数为病毒的单位, 即 PIB/mL, 通过实验得知多角体数量与 g/L 的换算关系为 $1 \text{ g/L} = 2.75 \times 10^8 \text{ PIB/mL}$ 。因此在使用图 6 所示公式计算出病毒的浓度后, 再换算成多角体个数。

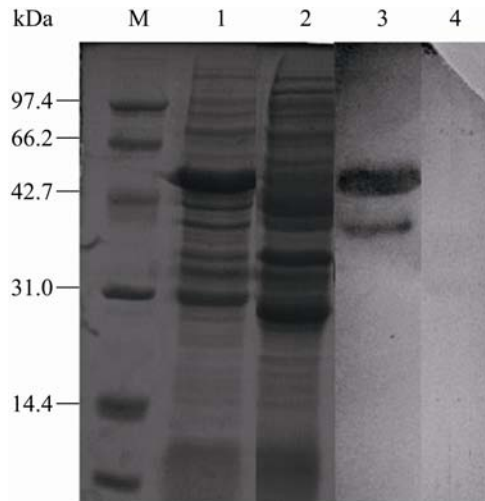


图 4 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果

Fig. 4 SDS-PAGE and Western blotting analysis. M: protein molecular weight marker; 1,2: SDS-PAGE analysis of ph protein, PGEX-4T-2 vector, respectively; 3,4: Western blotting analysis of GST-ph fusion protein, PGEX-4T-2 vector, respectively.

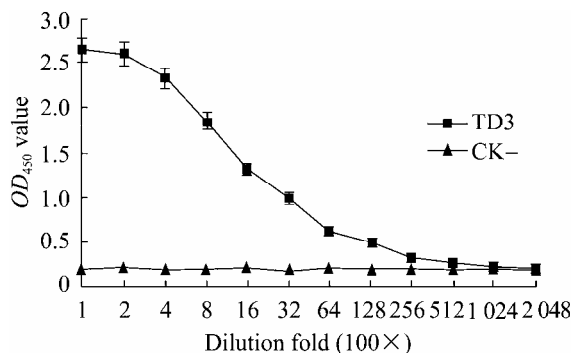


图 5 细胞株 7D3 对纯病毒的检测

Fig. 5 Detection of the purified *EoNPV* with cell line 7D3.

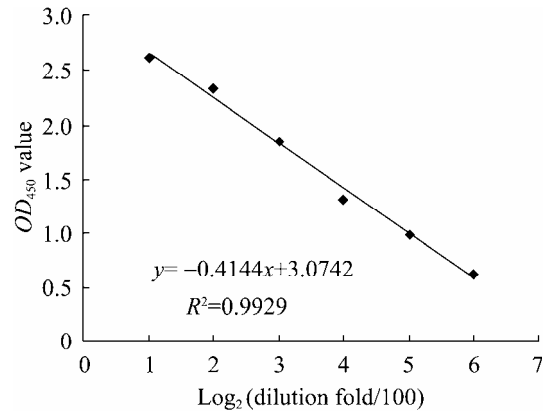


图 6 不同浓度梯度的纯化病毒 OD_{450} 值的标准曲线

Fig 6 Standard curve of OD_{450} value with different concentration of purified *EoNPV*.

2.9 样品检测

通过间接 ELISA 检测得知, 使用 *EoNPV* 的叶片饲喂的茶尺蠖检测率为 100%, 另外用血清计数法对其进行观察, 表明饲喂 *EoNPV* 的叶片的茶尺蠖体内确含有 *EoNPV* 病毒, 而饲喂健康叶片的茶尺蠖检测率为 0, 使用血清计数法检测未发现 *EoNPV* 的多角体。因此间接 ELISA 方法与血清计数法检出阳性率一致。

3 讨论

单克隆抗体技术是当今生物学领域中一次重大技术突破, 杂交瘤细胞既具有大量无限生长的特性, 又具有合成和分泌抗体的能力, 是由识别单一抗原决定簇的细胞克隆所产生的均一性抗体。与常规多克隆抗体相比, 由杂交瘤技术制备的单克隆抗体, 具有特异性强, 灵敏度高、质地均一, 可以大量生产等优点, 因此在近 20 年内得到了快速地发展, 而且在生物科学的许多领域得到了广泛的应用, 但是用杂交瘤技术制备单

抗耗时长,成本也较高,又难获得对某些半抗原和抗原的抗体,因而阻碍了单抗技术应用的进一步发展。在植保科研领域,国内外先后研制出多种植物病毒、真菌、细菌和昆虫病毒等病原微生物的单克隆抗体,并初步开始相关的应用研究,突显出其广阔的应用前景^[29]。1982年德国的Robert等首次研制出5株分泌抗苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)单抗杂交瘤细胞株^[30],接着加拿大的Hohman等研制出34株抗AcNPV单克隆抗体^[31]。随后10年来,相继研发出一些昆虫病毒单克隆抗体。虽然与其他动物病毒相比,昆虫病毒单克隆抗体应用研究起步比较晚,但已初步显示出广泛的应用前景,因此研制昆虫病毒单克隆抗体诊断试剂逐渐取代常规的抗血清已成为大势所趋。

单抗的专一性与选用的抗原有密切的关系,在NPV中多角体蛋白量最大,制备方便,抗原性也很强。在本试验中,利用细胞融合技术制备了能稳定分泌抗EoNPV多角体蛋白的杂交瘤细胞株(7D3),该细胞株灵敏度较高,效价为 10^5 ,能够检测EoNPV生物制剂中是否含有EoNPV的多角体,由此建立了快速检测的ELISA检测方法。由于自然界存在许多种杆状病毒,EoNPV多角体蛋白与其他多种NPV的多角体基因同源性比较高^[3],例如茶刺蛾核型多角体病毒、茶毛虫核型多角体病毒、家蚕核型多角体病毒等杆状病毒等,所制备的抗体可能对含有多角体蛋白的其它杆状病毒也能特异性结合,因此有必要作进一步研究,以明确目前所筛选出的是否是只对EoNPV专一性结合的单克隆抗体,进而建立更加完善的定性定量检测EoNPV的方法。

REFERENCES

- [1] Zhang YM, Wang XL, Zhang SM, et al. Primary studies on the Ultrastructure of *Ecotropis obliqua* nuclear polyhedrosis virus. *Chin Sci Bull*, 1985(24): 1918–1920.
张益民, 王学兰, 张世敏, 等. 茶尺蠖核型多角体病毒超微结构的初步研究. *科学通报*, 1985(24): 1918–1920.
- [2] Du JL, Zhang CX, Xiao Q, et al. Development of the fluorescent quantitative PCR for detection of *EoNPV* in *Ectropis oblique*. *J Tea Sci*, 2010, 30(3): 203–207.
杜军利, 张传溪, 肖强, 等. 茶尺蠖核型多角体病毒荧光定量PCR检测方法的建立. *茶叶科学*, 2010, 30(3): 203–207.
- [3] Liu NC, Meng XL. Analysis of the structural polypeptides of nuclear polyhedrosis virus From *Buzura suppressaria* guenee. *Virologia Sin*, 1988(1): 48–53.
刘年翠, 孟小林. 油桐尺蠖核型多角体病毒结构多肽的分析. *病毒学杂志*, 1988(1): 48–53.
- [4] Zhang YL, Zhong J, Su DM, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *J Fudan Univer: Nat Sci*, 2001, 40(5): 504–508.
张亚力, 钟江, 苏德明, 等. 斜纹夜蛾核型多角体病毒单克隆抗体的制备和分析. *复旦学报: 自然科学版*, 2001, 40(5): 504–508.
- [5] Li XJ, Jiang H, Gao HP, et al. Expression and purification of the excision repair cross-complementing 1 and preparation of its monoclonal antibodies. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2008, 24(11): 1104–1109.
李晓杰, 蒋华, 高慧萍, 等. ERCC1的表达纯化及其单克隆抗体的制备. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(11): 1104–1109.
- [6] Cui SJ, Guo X, Yang HC, et al. Preparation of monoclonal antibodies against hemagglutinin of a subtype H5 avian influenza virus. *Chin J Vet Med*, 2006, 42(7): 17–19.
崔淑鹃, 郭鑫, 杨汉春, 等. H5亚型禽流感病毒单克隆抗体的制备. *中国兽医杂志*, 2006, 42(7):

- 17-19.
- [7] Song S, Ling T, Shao JJ, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody against Foot-and-mouth disease virus serotype O. *Chin J Prev Vet Med*, 2009, 31(4): 325-328.
宋帅, 林彤, 邵军军, 等. O型口蹄疫病毒单克隆抗体的制备和鉴定. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(4): 325-328.
- [8] Long M, Yang ZT, Zhang NS, et al. Preparation of monoclonal antibody of danofloxacin. *Anim Hus Vet Med*, 2008, 40(11): 73-75.
龙淼, 杨正涛, 张乃生, 等. 达氟沙星单克隆抗体的制备与鉴定. *畜牧与兽医*, 2008, 40(11): 73-75.
- [9] Wang YR, Li L, Liu WM, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against MATSA. *J Northwest A & F Univ: Nat Sci Ed*, 2009, 37(6): 25-28.
王业荣, 李立, 刘文明, 等. 抗 MATSA 单克隆抗体的制备与鉴定. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(6): 25-28.
- [10] Li HY, Xin XG, Tian GB, et al. Optimum for indirect enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian influenza virus in chicken. *Chin J Anim Poul Infect Dis*, 1998, 20(4): 233-235.
李海燕, 辛晓光, 田国斌, 等. 间接酶联免疫吸附试验检测禽流感抗体的最佳工作条件. *中国畜禽传染病*, 1998, 20(4): 233-235.
- [11] Martyn JC, Gould AR, Eaton BT. High level expression of the major core protein VP7 and the non-structural protein NS3 of bluetongue virus in yeast: use of expressed VP7 as a diagnostic, group-reactive antigen in a blocking ELISA. *Virus Res*, 1991, 18(2/3): 165-178.
- [12] Zhao YL, Wang JH, Wang ZL, et al. Preparation of monoclonal antibody and development of ciELISA kit for rapid detection of enrofloxacin. *J Northwest A & F Univ: Nat Sci Ed*, 2009, 37(2): 33-39.
赵银丽, 王建华, 王自良, 等. 恩诺沙星单克隆抗体的制备及 ciELISA 试剂盒的研制. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(2): 33-39.
- [13] Zeng J, Yang CY, Pang W, et al. Preparation of monoclonal antibodies against tomato Ringspot virus. *J Microbiol*, 2007, 27(3): 35-37.
曾洁, 杨翠云, 潘卫, 等. 番茄环斑病毒单克隆抗体的制备. *微生物学杂志*, 2007, 27(3): 35-37.
- [14] Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol*, 1976, 6(7): 511-519.
- [15] Lian XW, Du XH, Li KS, et al. Development and identification of monoclonal antibodies against H5N1 subtype avian influenza virus. *J Gansu Agri Univ*, 2007, 42(2): 26-29.
连晓雯, 杜惠芬, 李克生, 等. 抗 H5N1 型禽流感病毒单克隆抗体的制备与鉴定. *甘肃农业大学学报*, 2007, 42(2): 26-29.
- [16] Pang HZ, Huang X, Yao XY, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against Ra1B. *J Sichuan Univ: Med Sci Edi*, 2008, 39(4): 651-653.
潘华政, 黄湘, 姚小艳, 等. 抗 Ra1B 单克隆抗体的制备及初步应用. *四川大学学报: 医学版*, 2008, 39(4): 651-653.
- [17] Guo YJ, Yang JX, Hua QY, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against epizootic hemorrhagic disease virus. *Progress Vet Med*, 2009, 30(3): 14-17.
郭莹洁, 杨俊兴, 花群义, 等. 鹿流行性出血病病毒单克隆抗体的制备与鉴定. *动物医学进展*, 2009, 30(3): 14-17.
- [18] Su JQ, Qiu MS, Wang HL, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against canine distemper virus. *J Jilin Agric Univ*, 2009, 31(1): 88-92.
苏建青, 岳妙姝, 王化磊, 等. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及特性鉴定. *吉林农业大学学报*, 2009, 31(1): 88-92.
- [19] Ma XC, Shang JY, Yang ZN, et al. Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus that infects the tea looper caterpillar, *Ectropis obliqua*. *Virology*, 2007, 360(1), 235-246.

- [20] Chen SW, Wei YJ, Long QX, et al. Research advances on structures and functions of baculovirus p10 genes and proteins. *Viol Sin*, 1998, 13(3): 185-191.
陈尚武, 魏永杰, 龙紫新, 等. 杆状病毒 p10 基因及蛋白结构与功能的研究进展. *中国病毒学*, 1998, 13(3): 185-191.
- [21] Wang LZ, Xiao Q, Zhang CX. Preparation of the antibody against *EupsNPV* polyhedrin and its utilization in detection of the viral pesticide. *J Tea Sci*, 2008, 28(4): 260-266.
王礼中, 肖强, 张传溪. 茶毛虫核型多角体病毒 *ph* 基因抗体的制备与利用. *茶叶科学*, 2008, 28(4): 260-266.
- [22] Wang JK, Cheng SP, Yan XJ, et al. Preparation and biological characteristic of monoclonal antibodies against mink enteritis virus. *Chin Vet Sci*, 2009, 39(3): 227-232.
王建科, 程世鹏, 闫喜军, 等. 抗水貂肠炎病毒单克隆抗体的制备及其生物学特性鉴定. *中国兽医科学*, 2009, 39(3): 227-232.
- [23] Chen XQ, Xu GL, Wang JL, et al. Primary studies and application of monoclonal antibody against respiratory syncytial virus. *Chin J Immunol*, 2007, 23(11): 1015-1018.
陈晓琦, 徐葛林, 王继麟, 等. 呼吸道合胞病毒单克隆抗体的制备及鉴定. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(11): 1015-1018.
- [24] Wang Q, Luo JL, Jiang WH, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against Newcastle disease virus. *J South China Agri Univ*, 2009, 30(2): 112-114.
王琴, 罗晶璐, 蒋文鸿, 等. 新城疫病毒单克隆抗体的制备及鉴定. *华南农业大学学报*, 2009, 30(2): 112-114.
- [25] Shi ML, Wu JX, Guo W, et al. Preparation of monoclonal antibodies to *Turnip Mosaic Virus* and its application for the virus detection. *Acta Microbiol Sin*, 2004, 44(2): 186-188.
施曼玲, 吴建祥, 郭维, 等. 芜菁花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用. *微生物学报*, 2004, 44(2): 186-188.
- [26] Wang Y, Zhang L, Rao X, et al. Establishment of McAb-based competitive ELISA for detection of Chloramphenicol. *Chin J Lab Diagn*, 2007, 11(11): 1530-1533.
王颖, 张磊, 饶星, 等. 氯霉素单克隆抗体 ELISA 检测方法的建立. *中国实验诊断学*, 2007, 11(11): 1530-1533.
- [27] Wang GZ, Zhou YJ, Chen ZX, et al. Production of monoclonal antibodies to Rice stripe virus and application in virus detection. *Acta Phytopathol Sin*, 2004, 34(4): 302-306.
王贵珍, 周益军, 陈正贤, 等. 水稻条纹病毒单克隆抗体的制备及检测应用. *植物病理学报*, 2004, 34(4): 302-306.
- [28] Meng CM, Wu JX, Xie L, et al. Production of monoclonal antibodies to *Cymbidium mosaic virus* and application in Orchids virus detection. *Acta Microbiol Sin*, 2007, 47(5): 928-931.
孟春梅, 吴建祥, 谢礼, 等. 建兰花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用. *微生物学报*, 2007, 47(5): 928-931.
- [29] Hu GJ, Lu ZQ, Hang SB, et al. Applications of monoclonal antibody technique in the studies of insect baculoviruses. *Chin J Biol Control*, 1993, 9(2): 76-79.
胡广淦, 陆自强, 杭三保, 等. 单克隆抗体技术在昆虫病毒研究中的应用. *生物防治通报*, 1993, 9(2): 76-79.
- [30] Roberts PL, Naser W. Characterization of monoclonal antibodies to the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1982, 122(2): 424-430.
- [31] Hohman AW, Faulkner P. Monoclonal antibodies to baculovirus structural proteins: determination of specificities by Western blot analysis. *Virology*, 1982, 125(2): 432-444.