

建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒联合免疫 胶体金试纸条的研制及应用

于子翔¹, 李 丽², 俞禄珍¹, 杨翠云¹, 吴建祥³, 黄卫昌², 于 翠^{1*}

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 上海辰山植物园, 上海 201602; 3. 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310058)

摘要 为了实现兰花种植苗圃和口岸一线直接检测样品中建兰花叶病毒 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) 和齿兰环斑病毒 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) 的目的, 我们研制了上述两种病毒联合免疫胶体金检测试纸条。采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记单抗 C10 并固定于胶金垫上; 将抗体 5B7 和 4F3 分别固定于硝酸纤维素膜上作为检测线, 将羊抗鼠抗体包被固定于硝酸纤维素膜上作为质控线, 经优化后组装胶体金试纸条。结果表明研制的联合试纸条特异性强, 能够在 10 min 之内同时检出两种病毒, 操作简便。对两个种植苗圃的 93 份兰花样品进行实际检测所得结果与 ELISA 的检测结果符合性好 ($Kappa$ 值分别为 84.6% 和 86.7%), 能满足兰花样品中建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的初筛要求。

关键词 建兰花叶病毒; 齿兰环斑病毒; 联合免疫胶体金试纸条

中图分类号: S 41-30 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.023

Complex gold immunochromatography assay and application for rapid detection of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*

Yu Zixiang¹, Li Li², Yu Luzhen¹, Yang Cuiyun¹, Wu Jianxiang³, Huang Weichang², Yu Cui¹

(1. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China;

2. Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602, China; 3. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract In order to directly detect *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) in planting garden and import port, we developed gold-immunochromatographic assay stripe kit. Tri-sodium citrate with aqueous gold chloride was warmed up and mixed to make colloidal gold particles. Monoclonal antibody (McAb) C10 was selected to conjugate with colloidal gold as the detector antibody that was spotted on a conjugated pad, and the McAb 5B7 and 4F3 were used as capture antibody at the test line (T) respectively. Goat anti-mouse IgG antibody was used capture antibody at the control line (C). After an optimized process, the assay stripes were packaged. The result indicated that the viruses could be specifically detected on immune-strip within 10 minutes. 93 samples from Chenshan Botanical Garden and Sunqiao Agricultural Garden were tested, and the results were compared with those obtained by DAS-ELISA in order to examine the reliability. The two methods showed significant consistence ($Kappa = 84.6\%$ and 86.7% of CymMV and ORSV, respectively). The established gold-immunochromatographic assay could meet the requirements of primary screening of the two viruses in the gardens and the ports.

Key words *Cymbidium mosaic virus*; *Odontoglossum ringspot virus*; complex gold immunochromatography assay

随着人民生活水平的提高, 国人对兰花的品种和数量都有相当大的需求。然而病虫害特别是病毒的侵染会严重影响兰花的品质。目前至少有 28 种病毒

曾被记录可侵染兰科植物, 其中各项特性已被清楚掌握, 分类地位明确的有建兰花叶病毒 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)、齿兰环斑病毒 *Odontoglossum*

收稿日期: 2017-03-28 修订日期: 2017-05-16

基金项目: 上海市绿化和市容管理局(G152427)

* 通信作者 E-mail: yuc@shciq.gov.cn

ringspot virus (ORSV)、黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic virus* (CMV)、烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV)、烟草脆裂病毒 *Tobacco rattle virus* (TRV)、番茄环斑病毒 *Tomato ringspot virus* (ToRSV)、番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt orthotospovirus* (TSWV)、凤仙花坏死斑病毒 *Impatiens necrotic spot orthotospovirus* (INSV)、建兰环斑病毒 *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV)、菜豆黄花叶病毒 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)、芜菁花叶病毒 *Turnip mosaic virus* (TuMV)、三叶草黄脉病毒 *Clover yellow vein virus* (CYVV) 和兰花斑点病毒 *Orchid fleck dichorhavirus* (OFV) 等 13 种^[1-2], 而对于兰花上最近发生的辣椒褪绿病毒 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV)、石斛脉坏死病毒 *Dendrobium vein necrosis virus* (DVMV) 和蝶兰褪绿斑病毒 *Phalaenopsis chlorotic spot virus* (PhCSV) 等 15 种病毒的分类地位、传播方式及侵染过程等尚不十分明确。

针对侵染兰花的病毒检测, 酶联免疫吸附 (ELISA) 和 RT-PCR 分子检测应用较为普遍^[3-6]。这两种方法特异性较强且灵敏度高, 但是需要一定的试验场所、仪器设备, 不适合口岸一线及苗圃的现场检测。免疫层析胶体金试纸条检测是一种简便、灵敏、适合现场快速检测的方法, 目前已有侵染葫芦科的 4 种病毒的免疫胶体金试纸条研制成功^[7], 但均无成功应用报告, 此外还有烟草环斑病毒和番茄环斑病毒联合免疫胶体金试纸条的研制^[8]等。在兰花病毒病的发生中以 CymMV 和 ORSV 最为普遍, 危害也最大, 而 CymMV 和 ORSV 的复合胶体金免疫层析试纸条的研究尚未见报道, 因此研制这两种主要兰花病毒的试纸条可以快速筛查出带病植株, 将在我国兰花的进出口口岸一线和兰花种植苗圃中发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 病毒来源

建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒阳性对照购自美国 Agdia 公司, 用于试纸条的灵敏度检测; 南芥菜花叶病毒、黄瓜花叶病毒、番茄花叶病毒阳性对照购自美国 Agdia 公司, 用于验证试纸条检测的特异性; 辰山植物园兰花培养温室、孙桥农业园区兰花种植苗圃采集的样品用于验证试纸条检测的准确性。

1.2 胶体金的制备、鉴定

采用常规的氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备胶体金。具体制备和鉴定过程参考魏梅生等的方法^[8-10]。将烧制的胶体金溶液用紫外-可见分光

光度计 (岛津 UV-2450) 进行全波长扫描鉴定。

1.3 抗体配对筛选

先将所有抗体分别稀释至 2 mg/mL, 然后分别标记和包被, CymMV 采用 4×4 配对, ORSV 采用 6×6 配对, 组装简易试纸条进行抗体配对筛选。

1.4 免疫胶体金试纸条制备工艺优化

着重对标记量、标记 pH、复溶液配方、胶体金与抗体配比量进行优化, 具体优化过程参照魏梅生等的文献进行^[9]。

1.4.1 免疫胶体金制备及条件优化

取 10 支洁净小试管分别加入 1 mL 胶体金, 用 0.2 mol/L K_2CO_3 分别调节 pH 至 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0, 加入不同浓度的待标记单抗 50 μ L, 使其终浓度分别为 5、7.5、10、12.5、15 μ g/mL, 混匀后室温静置反应 15 min, 加入 100 μ L 10% NaCl 溶液, 观察颜色变化。根据结果确定免疫胶体金的最适 pH 及抗体标记量。标记了胶体金后的单抗加入 10% BSA 封闭 15 min, 离心弃上清, 用复溶液复溶沉淀至合适的比例, 用喷金仪器涂在玻璃纤维纸上, 制作胶金垫。

1.4.2 检测线和质控线

用 0.02 mol/L PBS (pH 7.4) 将 CymMV 和 ORSV 单克隆抗体稀释到 1.0 mg/mL, 划线于硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 作为检测线 (test line)。T1 线为 ORSV 的检测线, T2 线为 CymMV 的检测线。用 0.02 mol/L PBS (pH 7.4) 将羊抗鼠 IgG 分别稀释到 1.0 mg/mL, 划线在硝酸纤维素膜上, 37℃ 烘干, 作为质控线 (control line), 简称 C 线。

1.5 试纸条组装

以硝酸纤维素膜作为固相载体, 用 1.3 筛选出的 ORSV 特异性单抗制作检测线 T1, CymMV 特异性单抗制作检测线 T2, 羊抗鼠二抗制作质控线 C, 包被在硝酸纤维素膜上 (图 1)。

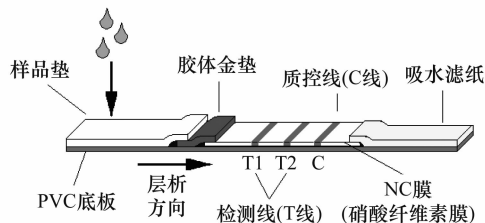


图 1 联合免疫胶体金试纸条工艺设计图

Fig. 1 Design of the complex gold immunochromatography assay stripe

用 1.4.1 筛选出的 ORSV/CymMV 通用型单抗 C10 制作成胶金垫。将包被膜和胶金垫配以样品

垫、吸水滤纸、PVC 底板等制作成大板,然后用切条机切割成一定宽度的试纸条,装卡、装袋、包装。

1.6 试纸条的质量检测

1.6.1 特异性检测

分别将建兰花叶病毒、齿兰环斑病毒、南芥菜花叶病毒、黄瓜花叶病毒、番茄花叶病毒阳性对照按照说明与 2 mL 的 PBS 缓冲液混匀,低速离心 5 min,上清即为制备好的待检样品。将上述溶液取 60 μL 滴于加样孔中进行检测,每种病毒重复 2 次。

1.6.2 灵敏度检测

取 CymMV 和 ORSV 阳性对照进行倍比稀释获得 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍、160 倍、320 倍、640 倍和 1 280 倍的样品稀释液,分别用试纸条进行灵敏度检测,测试方法同 1.6.1。

1.7 兰花样品检测

分别在辰山植物园兰花培养温室、孙桥农业园区兰花种植苗圃采集有症状样品,利用免疫胶体金试纸条及 DAS-ELISA 方法分别进行检测,将结果进行对比分析,若结果不一致,再利用 RT-PCR 方法进行验证。

1.8 Kappa 值计算

Kappa 值用于评价两种不同方法的检测结果是否具有-致性,是描述检测-致性较为理想的指标。本文采用不带加权的计算方法评价 DAS-ELISA 和免疫胶体金试纸条的-致性。 $Kappa = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$,其中 P_o 为实际-致率, P_e 为理论-致率。 $P_o = (a + d) / n$; $P_e = [(a + b)(a + c) + (c + d)(b + d)] / n^2$ 。

表 1 Kappa 值计算表格
Table 1 Table for calculating the value of Kappa

方法 1 Method 1	方法 2 Method 2		
	阳性数量/份 Positive sample numbers	阴性数量/份 Negative sample numbers	合计 Total
阳性数量 Positive sample numbers	a	b	g1
阴性数量 Negative sample numbers	c	d	g2
合计 Total	f1	f2	n

2 结果与分析

2.1 抗体配对筛选

抗体经过纯化后分别通过 4×4 和 6×6 的交叉配对反应,确定 CymMV 的 C10 与 5B7、ORSV 的 4F3 和 6B4 配对最佳。将上述 4 株单抗分别组合,制作二合一试纸条。利用该试纸条分别检测 CymMV 和 ORSV,结果发现两个病毒之间存在严重的交叉反应,结果无法判定。进一步研究分析,单抗 C10 与 ORSV 存在明显的交叉反应,因此可利用此特性,将 C10 作为通用型抗体用来制作胶体金,然后再用 CymMV 和 ORSV 特异性单抗分别制作检测线。经进一步筛选,确定最佳配对方式为:胶体金标记 C10—分别包被 4F3 和 5B7 作为 T1 和 T2 检测线。

2.2 免疫胶体金试纸条优化参数

经过试验,免疫胶体金试纸条的条件优化如下:胶体金制备按照 $V_{\text{氯金酸}(1\%)} : V_{\text{柠檬酸三钠}(1\%)} = 1 : 1$ 的比例烧制,粒径约 40 nm;单抗 C10 标记量为 10 μg/mL,标记 pH 为 8.0;金标记物复溶液配方为: 0.1 mol/L Tris+10% 蔗糖+1% PVP+1% BSA+0.5%

Tween-20,盐酸调 pH 至 8.5;胶体金复合物浓缩比例为 100 μL/mL;胶体金复合物喷涂量为 10 μL/cm;检测线 T1,单抗 4F3 浓度为 1.5 mg/mL;检测线 T2,单抗 5B7 浓度为 1.5 mg/mL;质控线,羊抗鼠 IgG 浓度为 1.5 mg/mL;检测线 T1、T2 和质控线划膜量均为 1 μL/cm。

2.3 试纸条特异性

分别使用滴管滴加建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒阳性对照约 60~100 μL 后,相应病毒的检测线及质控线出现明显条带;两种病毒阳性对照混合后各取 50 μL 加入检测孔后,两条检测线和质控线均出现明显条带;加入南芥菜花叶病毒、黄瓜花叶病毒、番茄花叶病毒的阳性对照,仅质控线出现条带,因此本试纸条具有较好的特异性。

2.4 试纸条灵敏度

分别将稀释 10、20、40、80、160、320、640、1 280 倍的 CymMV 和 ORSV 阳性对照滴加于样品孔检测试纸条的灵敏度。结果发现试纸条可检测稀释至 40 倍的齿兰环斑病毒汁液,而建兰花叶病毒汁液稀释至 160 倍仍可以检测到。

2.5 DAS-ELISA 检测与免疫胶体金试纸条的检测 对比结果

从辰山植物园采集带有症状的兰花样品 7 份, 分别进行免疫胶体金试纸条检测和 DAS-ELISA 检测, 结果(表 2)表明, 除 7 号样品外, DAS-ELISA 检测

与免疫胶体金检测结果基本一致, 反应程度也基本一致。7 号样品 ORSV 试纸条检测为阴性, 而 DAS-ELISA 检测为阳性, 对该样品进行 RT-PCR 检测, 结果为阳性, 这一结果表明免疫胶体金试纸条对 ORSV 的检测灵敏度较低, 有可能出现假阴性结果。

表 2 兰花样品 DAS-ELISA 和免疫胶体金试纸条检测结果比较¹⁾
Table 2 Detection result of DAS-ELISA and complex gold-immunochromatography assay stripes

检测方法 Methods	阳性对照 Positive control		样品 Sample														健康对照 Healthy control	
	ORSV	CymMV	1 号		2 号		3 号		4 号		5 号		6 号		7 号		ORSV	CymMV
			ORSV	CymMV	ORSV	CymMV	ORSV	CymMV	ORSV	CymMV	ORSV	CymMV	ORSV	CymMV	ORSV	CymMV		
试纸条 Assay stripe	+++	+	+++++++		±	++++	++	++++	-	++++	±	+	-	++++	±	+	-	-
DAS-ELISA (OD)	1.060	0.435	1.370	3.550	0.270	3.341	0.985	3.612	0.174	3.195	0.219	0.342	0.146	3.209	1.000	0.373	0.12	0.129

1) “+”表示试纸条检测线颜色的深浅, +越多, 表明病毒含量越高; “±”表示试纸条检测线颜色肉眼不易判定; “-”表示未检出。OD 值为酶标仪在 405 nm 波长下测得的数值。
“+” means the depth of the color of the test line, more “+”, more virus; “±” means the test line cannot be determined with eyes; “-” means the result was not detected. OD value is the absorption values under wave 405 nm with microplate reader.

2.6 兰花样品检测

我们从辰山植物园、孙桥农业园区采集 93 份样品进行检测对比, 免疫胶体金试纸条检出 CymMV 阳性样品 51 份, ORSV 阳性样品 38 份, 其中 CymMV 和 ORSV 同时侵染样品 28 份, 而 DAS-ELISA 检测出 CymMV 阳性样品 58 份, ORSV 阳性样品

43 份, CymMV 和 ORSV 同时侵染样品 31 份。利用 Kappa 值来比较两种检测方法的符合性, 由表 3、表 4 可知免疫胶体金试纸条与 DAS-ELISA 检测 CymMV 和 ORSV 的符合率均超过 80%, 基本能够满足田间及口岸一线的检测需求。

表 3 免疫胶体金试纸条与 DAS-ELISA 检测 CymMV 的一致性评价(Kappa 值)
Table 3 Result consistency between DAS-ELISA and complex gold immunochromatography assay stripes based on Kappa value for detection of CymMV

免疫胶体金试纸条 Complex gold immunochromatography assay stripes	双抗体夹心酶联免疫吸附法 DAS-ELISA			Kappa 值=
	阳性数量/份 Positive sample numbers	阴性数量/份 Negative sample numbers	合计 Total	
阳性数量 Positive sample numbers	51	0	51	84.6%
阴性数量 Negative sample numbers	7	35	42	
合计 Total	58	35	93	

表 4 免疫胶体金试纸条与 DAS-ELISA 检测 ORSV 的一致性评价(Kappa 值)
Table 4 Result consistency between DAS-ELISA and complex gold immunochromatography assay stripes based on Kappa value for detection of ORSV

免疫胶体金试纸条 Complex gold immunochromatography assay stripes	双抗体夹心酶联免疫吸附法 DAS-ELISA			Kappa 值=
	阳性数量/份 Positive sample numbers	阴性数量/份 Negative sample numbers	合计 Total	
阳性数量 Positive sample numbers	38	0	38	86.7%
阴性数量 Negative sample numbers	6	49	55	
合计 Total	44	49	93	

3 讨论

本研究在获得建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒

单克隆抗体的基础上研制了建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒联合免疫胶体金试纸条。该试纸条能够在 10 min 之内检出这两种严重危害兰花的病毒,

且特异性强,效果稳定,操作简便,与 DAS-ELISA 的检测结果显示符合性好($Kappa$ 值分别为 84.6% 和 86.7%),能够满足兰花实际样品中建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的检测,实现种植苗圃及口岸现场一线使用的目标。

免疫胶体金试纸条在现场使用过程中虽然操作比较简单,但是还需注意以下两点:①由于病毒分布的不均一性,不同位置取样会导致结果出现差异性,特别是不同样本之间相对强度的偏差,在生产调试过程中,检测 7 个样本时,ORSV 未检出明显反应,而 DAS-ELISA 阳性,出现这一结果原因可能是两种方法使用抗体不同,对病毒的检测灵敏度不同,而导致结果有差异;②样本处理之后,放置时间较长,结果会出现明显的波动性,建议样本处理后及时检测,不要放置过夜。

参考文献

- [1] Zettler F W, Ko N J, Wisler G C, et al. Viruses of orchids and their control [J]. Plant Disease, 1990, 74: 621 - 625.
- [2] Ryu K H, Park W M. Rapid detection and identification of *Odontoglossum ringspot virus* by polymerase chain reaction amplification [J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 133: 265 - 269.
- [3] Hu J S, Ferreira S, Wang M, et al. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Tomato spotted wilt virus*, and potyviruses infecting orchids in Hawaii [J]. Plant Disease, 1993, 77: 464 - 468.
- [4] 闻伟刚, 谭中, 崔俊霞. 实时荧光 RT-PCR 方法检测齿兰环斑病毒与建兰花叶病毒[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 101 - 104.
- [5] 中国检验检疫科学研究院. 中华人民共和国上海出入境检验检疫局. SN/T 2155 - 2008, 建兰花叶病毒检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 28981 - 2012, 齿兰环斑病毒检测鉴定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [7] 梁新苗, 边勇, 李建光, 等. 4 种葫芦科植物病毒复合胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 植物检疫, 2013, 27(1): 39 - 42.
- [8] 魏梅生, 杨翠云, 李桂芬. 番茄环斑病毒和烟草环斑病毒复合型胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 植物检疫, 2008, 22(2): 75 - 77.
- [9] 魏梅生, 李桂芬, 张周军, 等. 马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 139 - 141.
- [10] 孙艳秋, 赵奎华, 曹远银, 等. 黄瓜细菌性角斑病免疫胶体金试纸条的研制[J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 131 - 138.
- [11] Zettler F W, Ko N J, Wisler G C, et al. Viruses of orchids and their control [J]. Plant Disease, 1990, 74: 621 - 625.
- [12] Ryu K H, Park W M. Rapid detection and identification of *Odontoglossum ringspot virus* by polymerase chain reaction amplification [J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 133: 265 - 269.
- [13] Hu J S, Ferreira S, Wang M, et al. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Tomato spotted wilt virus*, and potyviruses infecting orchids in Hawaii [J]. Plant Disease, 1993, 77: 464 - 468.
- [14] 闻伟刚, 谭中, 崔俊霞. 实时荧光 RT-PCR 方法检测齿兰环斑病毒与建兰花叶病毒[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 101 - 104.
- [15] 中国检验检疫科学研究院. 中华人民共和国上海出入境检验检疫局. SN/T 2155 - 2008, 建兰花叶病毒检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 28981 - 2012, 齿兰环斑病毒检测鉴定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [17] 梁新苗, 边勇, 李建光, 等. 4 种葫芦科植物病毒复合胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 植物检疫, 2013, 27(1): 39 - 42.
- [18] 魏梅生, 杨翠云, 李桂芬. 番茄环斑病毒和烟草环斑病毒复合型胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 植物检疫, 2008, 22(2): 75 - 77.
- [19] 魏梅生, 李桂芬, 张周军, 等. 马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 139 - 141.
- [20] 孙艳秋, 赵奎华, 曹远银, 等. 黄瓜细菌性角斑病免疫胶体金试纸条的研制[J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 131 - 138.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 126 页)

- [9] 李腾武, 宗静, 高希武, 等. 寄主植物对桃蚜羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的诱导作用[J]. 植物保护, 1997, 23(2): 14 - 16.
- [10] 魏秋学, 何玉仙, 杨秀娟, 等. 寄主植物对南美斑潜蝇羧酸酯酶及乙酰胆碱酯酶活力的影响[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(3): 345 - 347.
- [11] 安志兰, 褚栋, 郭笃发, 等. 寄主植物对 B 型烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 几种主要解毒酶活性的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(4): 1536 - 1543.
- [12] 鲁艳辉, 高广春, 郑许松, 等. 诱集植物香根草对二化螟幼虫致死的作用机制[J]. 中国农业科学, 2017, 50(3): 486 - 495.
- [13] 傅强, 袁哲明, 戴长庚, 等. 一种大螟的半人工饲料及制备方法: CN103110009A [P]. 2013 - 05 - 22.
- [14] Habig W H, Pabst J, Jackoby W B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. Journal of Biological Chemistry, 1974, 249(22): 7130 - 7139.
- [15] Rose R L, Barbhuiya L, Roe R M, et al. Cytochrome P450 - associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1995, 51(3): 178 - 191.
- [16] Ellman G L, Courtney D, Andres V, et al. A new and rapid col-

- orimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochemical Pharmacology, 1961, 7(2): 88 - 95.
- [17] Bradford M M A. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 25(1): 248 - 256.
- [18] 夏岳章, 孙文岳. 香根草对水稻螟虫的诱杀及应用[J]. 浙江农业科学, 2012(12): 1693 - 1695, 1698.
- [19] 赵中华, 杨普云. 2011 年全国农作物病虫害绿色防控工作进展[J]. 中国植保导刊, 2012, 32(8): 17 - 19.
- [20] 陈桂华, 朱平阳, 郑许松, 等. 应用生态工程控制水稻害虫技术在金华的实践[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(1): 31 - 36.
- [21] 陈长琨. 昆虫生理生化实验[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [22] 吕朝军, 韩巨才, 刘慧平, 等. 寄主植物对苹果黄蚜药剂敏感性及解毒酶活性的影响[J]. 植物保护学报, 2007, 34(5): 534 - 538.
- [23] 李飞, 韩召军, 吴智锋, 等. 我国棉蚜抗药性研究现状[J]. 棉花学报, 2001, 13(2): 121 - 124.
- [24] 尹姣, 冯红林, 李克斌, 等. 寄主植物对草地螟中肠解毒酶及保护性酶活性的影响[J]. 植物保护, 2012, 38(1): 35 - 39.

(责任编辑: 田 喆)