

引起浙贝母黑斑病的交链格孢单抗及检测试纸条的制备

温思思, 赵福运, 郭飘逸, 徐云飞, 赵伟春*

(浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要 浙贝母黑斑病是危害浙贝母茎叶的重要真菌性病害之一, 该病感染叶片产生叶斑、叶枯, 严重时全株枯死。本研究制备了针对浙贝母黑斑病致病菌交链格孢 *Alternaria alternata* 的单克隆抗体(单抗), 并开发了胶体碳免疫层析试纸条用于黑斑病早期精准检测。以交链格孢提取液免疫 Bal b/c 小鼠, 采用杂交瘤技术制备单抗, 间接 ELISA 法和 Western blot 分析单抗的效价、灵敏度、特异性、抗体类型及结合蛋白。以双抗夹心法制备胶体碳免疫层析试纸条。得到 3 种针对交链格孢的单抗及其杂交瘤细胞株 AaA1、AaC2 和 AaC5。3 种单抗对交链格孢均具有高度特异性, 灵敏度为 12.21~24.41 ng/mL, 效价 $\geq 6.40 \times 10^5$, 抗体类型分别为 IgG2a、IgG3 和 IgG3, 结合蛋白的分子量分别为 37、62 kDa 和 66 kDa。以 AaA1 为碳标单抗, AaC2 为划膜单抗的胶体碳试纸条检测交链格孢的方法快速简便、准确灵敏、经济环保。从田间采样到出结果用时少于 15 min, 样品简单研磨后取汁液加入加样孔即完成全部操作, 对交链格孢抗原的检测灵敏度为 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 试纸条采用环保材料制备, 单个试纸条的成本约 1.7 元。

关键词 浙贝母; 黑斑病; 交链格孢; 单克隆抗体; 试纸条

中图分类号: S435.672 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021428

Preparation of monoclonal antibody and test strips for *Alternaria alternata* causing black spot disease of *Fritillaria thunbergii*

WEN Sisi, ZHAO Fuyun, GUO Piaoyi, XU Yunfei, ZHAO Weichun*

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract Black spot disease is one of the important fungal diseases that damage the stems and leaves of *Fritillaria thunbergii*. The disease infects leaves and produces leaf spot, leaf blight, and in severe cases, the whole plant dies. In this study, the monoclonal antibody (McAb) against *Alternaria alternata*, a pathogen of *F. thunbergii*, was prepared, and a colloidal carbon immunochromatographic test strip was developed for the early and accurate detection of black spot. Bal b/c mice were immunized with *A. alternata* extracts, McAb was prepared by hybridoma technology, and the titer, sensitivity, specificity, antibody type and binding protein of McAb were analyzed by indirect ELISA and Western blot, respectively. The colloidal carbon immunochromatographic test strip was prepared by double antibody sandwich method. Three McAbs against *A. alternata* and their hybridoma cell lines, AaA1, AaC2, and AaC5 were obtained separately. The McAbs were highly specific to *A. alternata*, with the sensitivities of 12.21–24.41 ng/mL and the titers of more than 6.40×10^5 . The antibody types were IgG2a, IgG3, and IgG3, respectively, and the molecular weights of the binding proteins were 37 kDa, 62 kDa and 66 kDa, respectively. The colloidal carbon test strip with AaA1 as the carbon-labeled McAb and AaC2 as the scribing McAb can be used to detect *A. alternata* quickly, easily, accurately, sensitively, economically and environmentally. It takes less than 15 minutes from field sampling to the result, simply ground sample juice is added to the sample hole and the whole operation is complete. The minimum detection limit for *A. alternata* is

收稿日期: 2021-08-08 修订日期: 2021-11-08

基金项目: 浙江省基础公益研究计划(LGN21C140004, 2015C32076); 浙江省中医药科技计划(2020B060)

* 通信作者 E-mail: weichunzhao@zcmu.edu.cn

6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The test strip is made of environment-friendly materials, and the cost of a single test strip is about 1.7 yuan.

Key words *Fritillaria thunbergii*; black spot disease; *Alternaria alternata*; monoclonal antibody (McAb); test strip

浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 是著名的“浙八味”之一,具有清热化痰,散结解毒的作用,可治疗风热咳嗽、肺痈喉痹、瘰疬、疮疡肿毒等症^[1]。浙贝母黑斑病是由交链格孢 *Alternaria alternata* 等引起的真菌性病害^[2],侵染的早期症状为叶尖发病,随后向叶基部蔓延,最后导致浙贝母鳞茎瘦小,产量及质量降低^[3]。近年来,分子生物学^[4-5]、光谱学^[6]、红外热成像^[7]等检测技术逐步应用于病害监测,但是上述检测手段技术复杂,成本高昂,不适于田间应用。农户依靠肉眼辨别症状,易误判且发现症状时通常已错过最佳防治时期。农户大多只能通过过量喷洒农药进行防治,不仅不能精准防治,还会造成病原微生物耐药性、农药残留、环境污染等问题。基于此,本项目采用杂交瘤技术制备针对交链格孢的单抗,并研发胶体碳免疫层析试纸条,为农户提供准确、高效、经济、便捷的浙贝母黑斑病检测产品,为田间浙贝母黑斑病的早发现、早防治提供技术支持,为研究浙贝母交链格孢的侵染机制提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种:从浙贝母黑斑病病株上分离并经分子鉴定的交链格孢菌株^[2],本实验室保存。供试动物:Bal b/c 小鼠,生产许可证:SYXK(浙)2021-0006,由浙江中医药大学动物实验中心提供。RPMI-1640 干粉、HAT 干粉、HT 干粉、PEG-4000、降植烷均购自美国 Sigma 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(酶标二抗)购自 KPL 公司,兔 IgG、羊抗兔 IgG、预染蛋白 Marker 均购自 Solarbio 公司,小鼠单抗亚类鉴定试剂盒购自佰奥通实验材料中心,胶体碳标记抗体试剂盒购自北京纳晶生物科技有限公司。

1.2 仪器

酶标仪 Multiskan Flash 购自 Thermo 公司,超声波细胞粉碎机 BILON-250Y 购自上海比昂仪器制造有限公司,电泳仪 DYY-6C 购自北京市六一仪

器厂。

1.3 方法

1.3.1 抗原制备和小鼠免疫

挑取交链格孢单菌落接种于 100 mL PDB 培养基中,25℃振荡培养 5 d 后,收集菌丝和孢子,超声波破碎后 6 000 r/min 离心 20 min,收集上清,酶标仪测定上清的蛋白含量,用 pH7.2 的 PBS 调节至蛋白浓度为 1 mg/mL 作为免疫抗原及后期检测用抗原。其他分离自浙贝母的真菌包括木贼镰刀菌 *Fusarium equiseti*、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*、半裸镰刀菌 *F. incarnatum*、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*、细极链格孢 *A. tenuissima*、茄病镰刀菌 *F. solani*、茎点霉属真菌 *Phoma* sp. 和 *Phomopsis oblonga* 等抗原的制备方法同上。取交链格孢抗原免疫 3 只 6~8 周龄的 Bal b/c 小鼠^[8],0.1 mg/只。第 3 次免疫后 7 d,取小鼠颌下腺血,4℃冰箱放置 15 min 后,4 000 r/min 离心 10 min,取上层血清-20℃保存。采用间接 ELISA 测定血清效价^[9]。用碳酸盐缓冲液将交链格孢抗原稀释 1 000 倍后包被酶标板(即 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),4℃过夜,PBST 洗涤 3 次后用 3% 脱脂奶封闭 60 min。将小鼠血清倍比稀释加入包被孔,以 1% BSA 为阴性对照,每孔 100 μL ,37℃温育 1 h,PBST 洗涤 3 次后加入稀释 5 000 倍的酶标二抗 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37℃温育 1 h,PBST 洗涤后加入邻苯二胺(OPD)底物显色液显色,使用 50 μL 2 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应后,酶标仪测定 OD 值($\lambda=490$ nm),以与阴性对照比值大于 2 为阳性,最低阳性值对应的血清稀释倍数即为抗体的效价。

1.3.2 单抗的制备

采用杂交瘤技术制备单抗^[10]。取效价 $>10^4$ 的小鼠制备脾细胞悬液,与体外培养的小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 在 PEG-4000 的作用下进行细胞融合。将融合细胞接种至 96 孔细胞培养板,用 HAT 培养基选择性培养 13 d 后,换用 HT 培养基继续培养。此时仍在生长的细胞即为杂交瘤细胞。待细胞铺满 96 孔板孔底 1/4 时,取细胞培养上清液,以稀释 1 000 倍的交链格孢抗原包被酶标板,采用间接

ELISA 检测各细胞培养孔中细胞分泌抗体的阳性反应情况。筛选出强阳性的细胞接种于 24 孔细胞培养板进行扩大培养。待细胞铺满 24 孔板孔底 1/4 时,取细胞培养上清液,以稀释 1 000 倍的木贼镰刀菌、茄病镰刀菌、半裸镰刀菌、尖孢镰刀菌、交链格孢、细极链格孢、灰葡萄孢、茎点霉属真菌和 *P. oblonga* 的抗原分别包被酶标板,用间接 ELISA 法检测抗体的特异性,筛选只与交链格孢反应的特异性细胞株,用有限稀释法进行克隆化培养^[10];重复进行阳性孔筛选、扩大培养、特异性筛选和克隆化培养,直至获得阳性率为 100% 的单株细胞。进一步扩大培养,以细胞数 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/只注入预先腹腔注射降植烷的小鼠。收集腹水,纯化后 -80°C 保存。

1.3.3 单抗的特性鉴定

1.3.3.1 单抗的效价检测

采用间接 ELISA 测定抗体的效价。操作流程见 1.3.1,将小鼠血清替换为纯化后的腹水型单抗。

1.3.3.2 单抗的特异性检测

以 1.3.2 所述的 8 种真菌为检测对象,将上述抗原用包被液稀释至 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 后包被酶标板。以 1% BSA 为阴性对照,用间接 ELISA 法检测腹水型单抗的特异性,其中单抗稀释 20 000 倍,酶标二抗稀释 5 000 倍。操作流程见 1.3.1。

1.3.3.3 单抗的灵敏度检测

采用间接 ELISA 测定单抗的灵敏度。步骤同 1.3.1,将抗原倍比稀释($1:80 \times 2^0 \sim 1:80 \times 2^{10}$)后包被在酶标板上,重复 8 次,第 12 列为阴性对照,用 1% BSA 包被。以稀释 20 000 倍的双抗作为一抗,与阴性对照比值大于 2 则视为阳性,测得抗原最大稀释倍数,检测灵敏度 = $1\ 000 \mu\text{g}/\text{mL} \div$ 最大稀释倍数。

1.3.3.4 单抗的类型及亚类鉴定

用鉴定小鼠单抗亚类的 ELISA 试剂盒对单抗类型和亚类进行鉴定。单抗稀释 20 000 倍用于检测,每种单抗重复 3 次,其他操作步骤按试剂盒说明书进行。阳性孔所对应的抗体 Ig 类型及亚类即为该单抗的抗体类型及亚类。

1.3.3.5 抗体结合蛋白的检测

采用 Western blot 技术检测抗体结合蛋白。浓

缩胶和分离胶的浓度分别为 5% 和 10%,样品和预染的 Marker 的上样量分别为 $20 \mu\text{L}$ 和 $3 \mu\text{L}$ 。经 10 mA 恒流后改为 120 V 恒压。半干转印法在 25 V 恒压下转印 30 min 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。转印后的膜用 3% 脱脂奶室温封闭,单抗稀释 20 000 倍,酶标二抗稀释 5 000 倍,二氨基联苯胺(DAB)显色液显色,蒸馏水终止显色反应。以标准蛋白(M)的对数对相对迁移率(x)拟合线性方程。根据待测蛋白质样品的相对迁移率,计算其相对分子质量: $\log(M) = a \log x + b$ 。

1.3.4 胶体碳免疫层析试纸条的制备及检测

试纸条的制备:取稀释 10 倍后的腹水型单抗 AaA1 和兔 IgG 抗体,按照胶体碳标记抗体试剂盒说明书分别制备碳标抗体。将 $15 \mu\text{L}$ 碳标单抗 AaA1、 $25 \mu\text{L}$ 碳标兔 IgG 抗体与 $25 \mu\text{L}$ 喷碳稀释液混合后按 $4 \mu\text{L}/\text{cm}$ 喷点在玻璃纤维膜上, 37°C 烘干。在 NC 膜上,喷涂 $45 \mu\text{L}$ 羊抗兔 IgG 作为质控线,喷涂 $45 \mu\text{L}$ 单抗 AaC2 作为检测线, 37°C 干燥过夜。将样品垫、喷有碳标抗体的玻璃纤维膜、包被有羊抗兔 IgG 和单抗 AaC2 的 NC 膜、吸水纸按序粘于双面胶板上,完成后切割成 3 mm 的试纸条,组装至包装盒内成胶体碳免疫层析试纸条^[11]。

试纸条的初步应用:取 $1\ 000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的交链格孢抗原,用 PBS 缓冲液倍比稀释($1:10 \times 2^1 \sim 1:10 \times 2^6$),吸取 $100 \mu\text{L}$ 滴加于试纸条加样孔中。以滴加相同体积的 PBS 缓冲液为空白对照。10 min 内观察检测线和质控线的颜色变化。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的制备

共获得杂交瘤细胞生长孔 189 个,融合率为 33.1%,其中阳性孔 26 个,阳性率为 13.7%。最终得到 3 株稳定分泌针对交链格孢抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 AaA1、AaC2 和 AaC5。各细胞株分别制备获得腹水型单抗约 10 mL。

2.2 单抗的效价测定

如图 1 所示,AaA1 的效价为稀释 6.40×10^5 倍,AaC2、AaC5 的效价均为稀释 1.28×10^6 倍,稀释 20 000 倍时 OD 值明显降低,选择稀释 20 000 倍用于后续试验。

2.3 单抗的特异性检测

单抗 AaA1、AaC2、AaC5 均只与交链格孢抗原反应,均不与木贼镰刀菌、灰葡萄孢、半裸镰刀菌、细极链格孢、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、茎点霉属真菌、*P. oblonga* 的抗原反应。结果见图 2。

2.4 单抗的灵敏度测定

如图 3 所示, AaA1 的抗原最大稀释倍数为 81 920 倍,即检测灵敏度为: $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL} \div 81\ 920 = 12.21\ \text{ng}/\text{mL}$ 。AaC2、AaC5 的抗原最大稀释倍数均为 40 960 倍,即检测灵敏度为: $24.41\ \text{ng}/\text{mL}$ 。

2.5 单抗类型及亚类测定

当单抗与某种已知类型或亚型的酶标第二抗体特异性结合时,则该单抗即为对应的抗体 Ig 类型及亚类。如图 4 所示, AaC2、AaC5 抗体类型均为 IgG3, AaA1 则为 IgG2a。

2.6 单抗结合蛋白检测

如图 5 和表 1 所示,以标准蛋白质 M 的对数对相对迁移率 x 拟合方程,计算得出 AaA1、AaC2、AaC5 的结合蛋白分子量分别为 37、62 kDa 和 66 kDa。

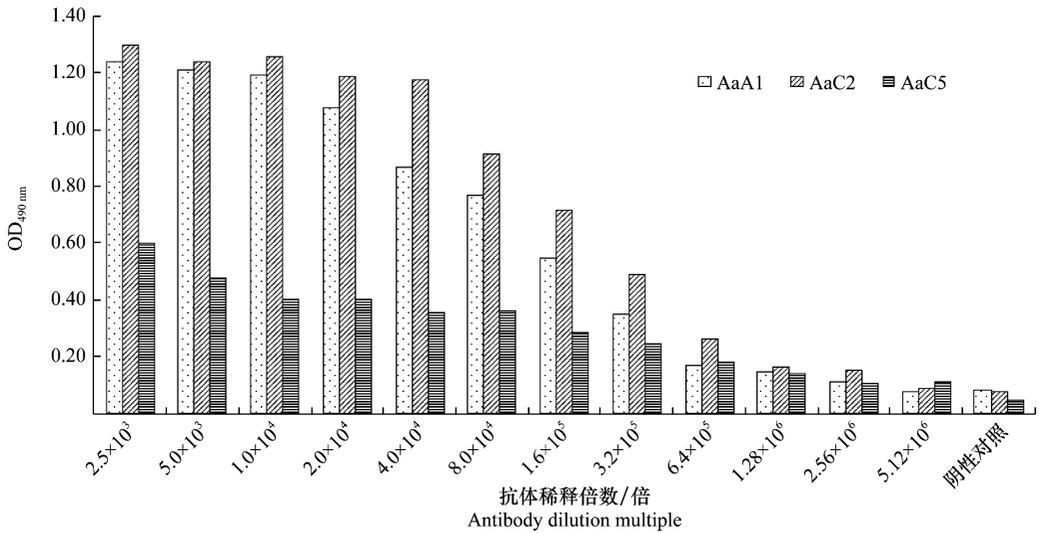


图 1 交链格孢单抗效价

Fig. 1 Titer of monoclonal antibody (McAbs) against *Alternaria alternata*

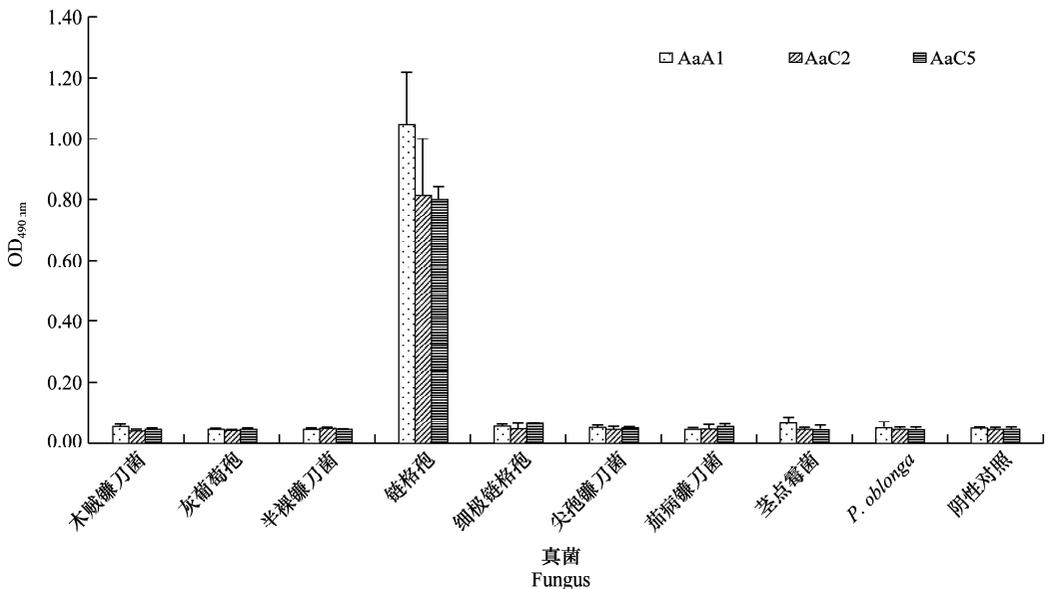


图 2 交链格孢单抗的特异性检测

Fig. 2 Specific detection of McAbs against *Alternaria alternata*

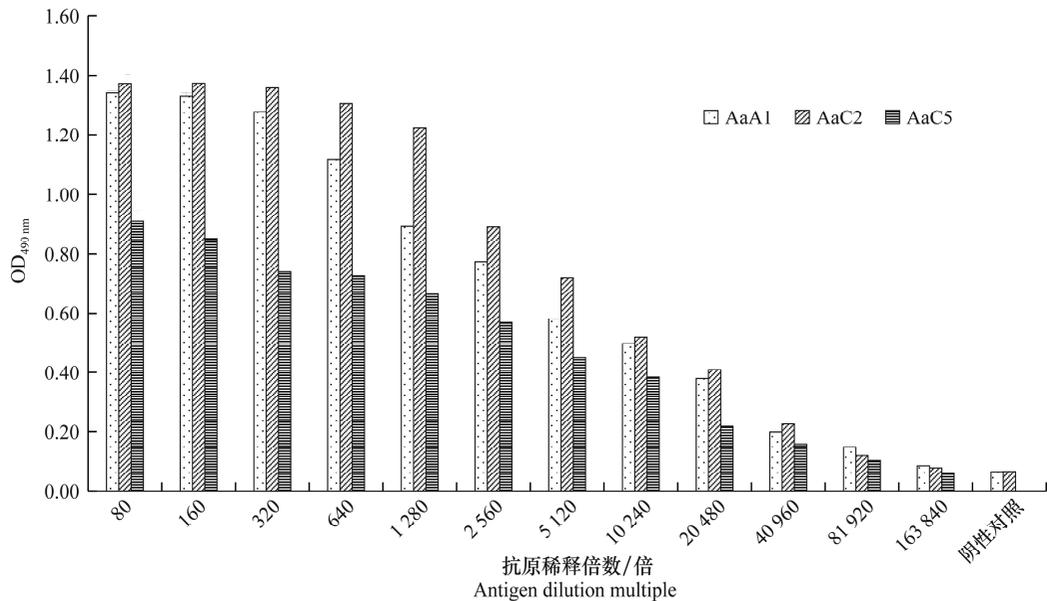


图 3 交链格孢单抗灵敏度

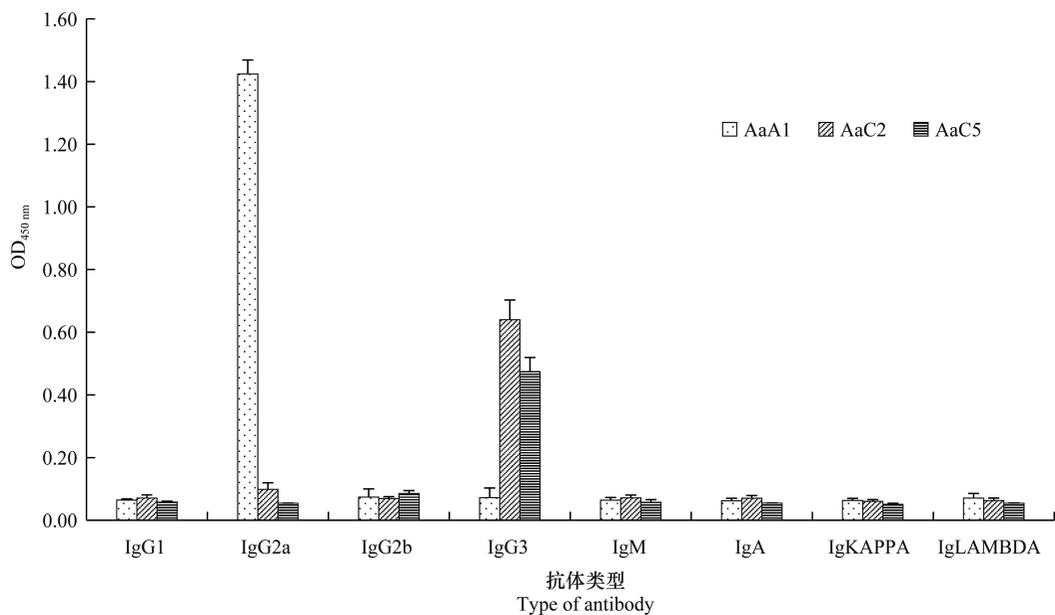
Fig. 3 Sensitivity of McAbs against *Alternaria alternata*

图 4 交链格孢单抗类型与亚类

Fig. 4 Antibody type of McAbs against *Alternaria alternata*

表 1 单抗结合蛋白标准曲线及分子量

Table 1 McAbs binding protein standard curve and molecular weight

蛋白质样品 Protein sample	标准曲线 Standard curve	相关系数(R ²) Correlation coefficient	迁移率 Mobility ratio	分子量/kDa Molecular weight
AaA1	$y = -0.0098x + 0.0986$	0.9952	0.543	37
AaC2	$y = -0.0098x + 0.0986$	0.9952	0.313	62
AaC5	$y = -0.0098x + 0.0867$	0.9968	0.276	66

2.7 胶体碳免疫层析试纸条的制备及初步应用

随着抗原浓度升高,检测线从无到有,由浅入深,

抗原最低检测浓度为 $6.25 \mu\text{g/mL}$ (图 6)。由于检测时加样量为 $100 \mu\text{L}$,抗原最低检测量为 625 ng 。

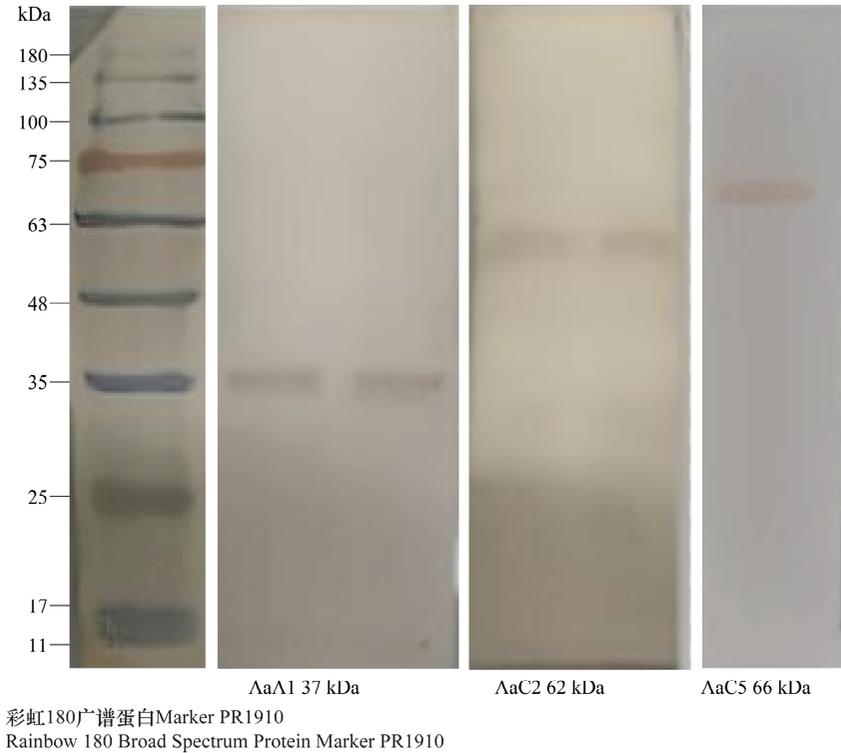


图 5 交链格孢单抗结合蛋白

Fig. 5 *Alternaria alternata* McAbs binding protein



基于单抗AaA1的试纸条, 从左至右的交链格孢浓度依次为: 0、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 µg/mL

The concentrations of *Alternaria alternata* on the test strip based on AaA1 from left to right are 0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL, respectively

图 6 胶体碳免疫层析试纸条的初步应用

Fig. 6 Preliminary application of colloidal carbon immunochromatographic test strips

3 结论与讨论

植物感染真菌性病害是一个病原真菌在体内不断累积的过程。当病原真菌侵染至一定程度时会表现出病害症状, 此时植物体内的病原真菌数已达到较高的水平, 施用杀菌剂的防治效果不尽如人意, 亟须一种快捷简便的早期诊断技术。近年来, 植物病害检测技术发展迅速, 赵森等^[6]利用高光谱技术, 已

实现刺五加黑斑病的早期诊断, 能够保证较高的准确性和实时性, 但光谱技术目前仅适用于科学研究; 向日葵黑斑病的检测方式主要集中于 PCR 检测技术^[12], 不适用农户田间应用; 月季^[13]、冬枣^[14]、菊花^[15]、浙贝母^[2]等植物黑斑病检测方式集中于形态学和分子生物学方法, 分子生物学检测方法虽然精准度高, 但是需要较高成本, 缺乏实用性^[7]。因此, 为准确且及时地确定病害种类, 需要更为精准且实

用的检测手段。制备针对基于单抗的浙贝母黑斑病胶体碳免疫层析试纸条将为诊断黑斑病提供新的便捷手段。

不同于常规单抗制备过程中采用单一特异性目的蛋白作为免疫原^[17-18],本文以交链格孢的孢子和菌丝经超声波破碎后溶解于 PBS 的上清蛋白为抗原免疫小鼠,全菌体蛋白成分复杂,不同真菌间存在相似抗原成分,尤其是同属的不同种间,能与抗体发生相似的分子识别作用,使得相互间可能发生交叉反应。为此,本文通过对抗体进行大规模的特异性筛选,得到了不与其他 8 种分离自浙贝母的其他属的病原真菌交叉反应,只针对交链格孢的单抗及其细胞株。经检测,单抗灵敏度高,且不受浙贝母提取液干扰;特异性强,能够与交链格孢抗原强烈反应而不与其他菌种交叉反应并且与目标蛋白结合单一;灵敏度高,与目标蛋白结合的分子量大小固定,具有良好的开发前景。

基于此单抗的免疫层析试纸条抗原最低检测限为 $6.25 \mu\text{g/mL}$,采用的胶体碳颗粒具备更高的灵敏度、稳定性和环保性^[16],更符合田间检测条件和需求。田间应用时操作简便,只需要利用配备的一次性离心管、研磨棒、吸管等进行简单的研磨和加样就可完成全部操作,并且不需要复杂的仪器设备。检测时间从采样到出结果只需 15 min,特别适用于田间样品的大规模快速检测。此外,1 株单抗的开发成本约为 3.5 万元,相较于杂交瘤细胞株的制备,后续单抗及试纸条的制备所需成本更为低廉。并且试纸条的大量生产使得制备杂交瘤细胞株所需的费用分摊至单个试纸条的费用降低,生产成本仅为 1.7 元/条。同时出于试纸条运输、储存、推广等额外费用及盈利的考虑,试纸条定价 5 元/条。与其他检测方法相比较,成本非常低,基层人员普遍可以承受。目前试纸条仍处于实验室应用阶段,后期将逐步开展该试纸条的田间检测应用。

由交链格孢引起的黑斑病危害农作物的种类众多^[19-20],制备针对交链格孢的单抗及其检测试纸条不但可为浙贝母黑斑病的田间快速、简便、经济的检测提供手段和方法,也可能为其他植物黑斑病的快速检测提供科学依据,为植物黑斑病的早发现、早防治提供可能。

参考文献

- [1] 彭丹丹,张源明,舒灿炜,等. 植物病原真菌分子检测技术的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(5): 2015-2022.
- [2] 徐云飞,祁依佳,温思思,等. 浙贝母黑斑病致病菌的分离鉴定及分子检测[J]. 浙江中医药大学学报, 2020, 44(2): 111-118.
- [3] 黄雅俊,宋会鸣,丁佩,等. 325 g/L 苯甲·啮菌酯悬浮剂防治贝母黑斑病田间药效评价[J]. 农药科学与管理, 2017, 38(8): 44-47.
- [4] 李亚立,王建明. 植物病害的分子检测技术及其应用[J]. 农业技术与装备, 2011(2): 46-47.
- [5] 姚含笑,陆雯,吴佳佳,等. 核酸检测在植物检疫性病害诊断中的应用[J]. 种子, 2013, 32(7): 83-86.
- [6] 赵森,付芸,崔江南,等. 高光谱的刺五加黑斑病的早期检测研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(6): 1898-1904.
- [7] 许蕾,侯泽禹,陈科涵,等. 果蔬病害实时检测方法研究进展[J]. 农业工程技术, 2019, 39(1): 58-63.
- [8] 谢志勤,谢芝勋,刘加波,等. 禽呼肠病毒 S1733 株 σ NS 单克隆抗体的制备及其特性鉴定[J]. 动物医学进展, 2013, 34(5): 6-10.
- [9] 王丹依. 浙贝母主要病原真菌的分离鉴定及药物敏感性研究[D]. 杭州:浙江中医药大学, 2017.
- [10] 赵凯,孙立新,孙宇石,等. 抗紫杉醇单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(4): 436-442.
- [11] 马志宏,杨明,郭慧琳,等. 鸽 I 型副黏病毒免疫胶体金诊断试纸条的制备[J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(5): 67-71.
- [12] 李易初,石凤梅,马立功,等. 向日葵黑斑病国内外研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2021(1): 146-151.
- [13] 冯宝珍,李培谦. 月季黑斑病病原菌鉴定及室内药剂初步筛选[J]. 植物保护学报, 2019, 46(5): 1147-1154.
- [14] 宋聪,黄亚丽,谢晨星,等. 河北省冬枣黑斑病病原菌的分离鉴定及生物防治初探[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(5): 85-89.
- [15] 许高娟,陈发棣. 菊花黑斑病菌的分离鉴定[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(4): 752-757.
- [16] LIU Bing, WANG Lingling, TONG Bei, et al. Development and comparison of immunochromatographic strips with three nanomaterial labels: Colloidal gold, nanogold-polyaniline-nanogold microspheres (GPGs) and colloidal carbon for visual detection of salbutamol [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 85: 337-342.
- [17] 郝惠文,任萌,宋慧茹,等. 卡他莫拉单克隆抗体胶体金试纸的制备及初步应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(6): 634-637.
- [18] 王兆芹,张富生,邓家军,等. 基于单克隆抗体的胶体金免疫层析法快速检测丙溴磷[J]. 河南农业科学, 2020, 49(12): 77-82.
- [19] 沈钰森,王建升,盛小光,等. 十字花科植物黑斑病的研究进展[J]. 核农学报, 2021, 35(3): 623-634.
- [20] 于国光,孙彩霞,赵学平,等. 铁皮石斛黑斑病防治药剂的筛选[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(11): 2298-2299.