

间接竞争 ELISA 法对柞蚕微孢子虫的检测*

姜义仁^{1,2} 王伯阳¹ 孙 影¹ 王 勇² 石生林¹ 杨瑞生¹ 段玉玺^{2**} 秦 利^{1**}

(1. 沈阳农业大学生物科学技术学院 辽宁省昆虫资源工程技术研究中心

沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110866)

摘 要 柞蚕微孢子虫病是柞蚕唯一的检疫性病害,其致病病原物为柞蚕微孢子虫(*Nosema pernyi* Ding, Su & Wen),因此,柞蚕微孢子虫的检测对于该病的防治具有重要意义。本文通过制备柞蚕微孢子虫多克隆抗体,建立柞蚕微孢子虫间接竞争 ELISA 检测法。结果表明,柞蚕微孢子虫多克隆抗体效价为 $1:10^4$ 、浓度为 $3\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,主要由 2 条大小约 50 ku 和 25 ku 蛋白条带组成,可作为后续试验多克隆抗体材料。间接竞争 ELISA 法最佳抗原工作浓度为 $2.0\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 微孢子虫孢壁蛋白溶液,最佳抗体工作浓度为兔抗血清按 $1:10^2$ 倍浓度稀释,酶标二抗最佳工作浓度为 $1:5 \times 10^4$ 倍稀释,柞蚕微孢子虫间接竞争 ELISA 检测法的灵敏度为 $1.6 \times 10^5\text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。间接竞争 ELISA 法在柞蚕微孢子虫的检测方面具有一定的应用价值。

关键词 柞蚕微孢子虫,酶联免疫吸附测定,多克隆抗体,检测

Use of IC-ELISA to detect *Nosema pernyi*

JIANG Yi-Ren^{1,2} WANG Bo-Yang¹ SUN Ying¹ WANG Yong² SHI Sheng-Lin¹

YANG Rui-Sheng¹ DUAN Yu-Xi^{2**} QIN Li^{1**}

(1. College of Bioscience & Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Liaoning Engineering &

Technology Research Center for Insects Resources, Shenyang 110866, China; 2. College of Plant

Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract Microsporidiosis is the only quarantinable disease of *Antheraea pernyi*. *Nosema pernyi* is the lethal pathogen of microsporidiosis. Therefore, the detection of the spores of *N. pernyi* is important to prevent and treat this disease. In this paper, the effectiveness of an indirect competitive ELISA for detecting the spores of *N. pernyi* in *A. pernyi* was studied by preparing the polyclonal antibody for *N. pernyi*. The polyclonal antibody against *N. pernyi* was prepared by immunizing rabbits using a suspension containing spores of *N. pernyi*. The titre and antibody concentration were $1:10^4$ and $3\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively, the antibody mainly contained two protein straps with molecular weights of 50 ku and 25 ku, respectively. The resultant polyclonal antibody can be kept for further study. The optimal antigen concentration for the IC-ELISA was $2.0\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ spore wall protein of *N. pernyi*, the optimal polyclonal antibody concentration was $1:10^2$, HRP-IgG optimal concentration was $1:5 \times 10^4$ and the sensitivity of the method was $1.6 \times 10^5\text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$. The method had some value in the detection of *N. pernyi*.

Key words *Nosema pernyi*, ELISA, polyclonal antibody, detection

柞蚕微孢子虫病是影响柞蚕生产最为严重的病害之一,也是柞蚕生产中唯一的检疫性病害,病原为柞蚕微孢子虫(*Nosema pernyi* Ding, Su & Wen)(丁杰等,1992)。柞蚕微孢子虫病在我国柞蚕产区均有分布,且近年的发病率也呈现上升趋势

,已严重威胁到柞蚕产业的健康发展(徐耀军和陈大光,2006)。柞蚕微孢子虫病检测对于保障柞蚕种卵质量、防治病害经胚种传染等具有重要的作用,一直是柞蚕种生产过程中重要的组成部分。酶联免疫吸附剂测定(enzyme linked

* 资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-22);辽宁省教育厅科研项目(L2010512);沈阳农业大学校青年基金项目(201010002)。

**通讯作者, E-mail: duanyx6407@163.com; qinli1963@163.com

收稿日期:2012-07-05,接受日期:2013-06-22

immunosorbent assay, ELISA) 是由 Engvall 和 Perlmann 在 1971 年建立的一种生物活性物质微量测定技术,主要是基于抗原或抗体能吸附至固相载体的表面并保持其免疫活性,抗原或抗体与酶形成的酶结合物仍保持其免疫活性和酶催化活性的基本原理。由于其具有灵敏度高、特异性强、操作简便、设备简单、对人体无害等特点,在生物科学各领域得到了广泛应用。唐啸尘等(1998)报告了柞蚕微孢子虫单克隆抗体制备及免疫胶体金银染色法诊断,对 6 种微孢子虫进行检测,发现光镜下柞蚕微孢子虫呈现特异的褐色,能与其他 5 种微孢子虫区分开。研究柞蚕微孢子虫的 ELISA 检测法对于进一步探讨柞蚕微孢子虫的最佳检测技术具有重要的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 家兔购自沈阳龙元经济动物养殖场;纯化后的柞蚕微孢子虫孢子(姜义仁等, 2011);纯化的柞蚕微孢子虫孢壁蛋白(王伯阳等, 2011)。

1.1.2 药品与试剂 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 抗体、弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)、四甲基联苯胺(TMB)显色液和酶标板购自北京鼎国生物技术有限公司,其它试剂均为国产分析纯。

包被缓冲液: Na_2CO_3 5.3 g、 NaHCO_3 4.3 g, 双蒸水定容至 1 L, pH 9.6。

洗涤液: NaCl 9.0 g、Tween20 1 mL, 双蒸水定容至 1 L, pH 7.4。

封闭液: NaCl 8.0 g、 Na_2HPO_4 1.42 g、 KH_2PO_4 0.2 g、 KCl 0.2 g、BSA 5.0 g, 双蒸水定容至 1 L, pH 7.4。

$2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液: 量取浓 H_2SO_4 11.1 mL, 加入到 80 mL 蒸馏水中, 冷却后, 定容至 100 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 家兔免疫 家兔体重约为 1.5 kg, 雄性, 经 1 周的观察, 兔子健康状况良好, 可以进行免疫。首次免疫取 750 μL 柞蚕微孢子虫孢子液(10^8 spores $\cdot \text{mL}^{-1}$)与等体积的 FCA 充分混合后免疫家兔, 第 4 次追加免疫为不添加 FCA 的孢子液 1 mL。第 5 次免疫 7 d 后, 利用间接 ELISA 法

测定抗体效价。

1.2.2 抗血清制备 间接 ELISA 法测定效价符合试验要求后, 进行末次免疫, 免疫 10 d 后于家兔心脏取血, 收集的血液 37℃ 下温育 2 h 凝固后, 置 4℃ 下过夜析出血清, 离心后在无菌条件下吸出血清, -20℃ 保存。

1.2.3 多克隆抗体纯化 利用饱和硫酸铵盐析法纯化多克隆抗体。取抗血清 1 mL, 加入等量 0.9% NaCl 溶液摇匀, 再缓慢加入饱和硫酸铵溶液 2 mL, 充分混合后 4℃ 下静置 40 min, 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min。沉淀加入生理盐水 2 mL, 摇匀, 再加入 1 mL 饱和硫酸铵, 充分混合后 4℃ 下静置 40 min。取出后离心, 以饱和度为 33% 的硫酸铵溶液洗涤沉淀 2 次。将离心后的沉淀用少量生理盐水溶解, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。滤液装入透析袋中, 以去离子水 4℃ 下透析 3 d, 换液 6 次。纯化后抗体溶液于 -20℃ 下保存备用。

1.2.4 多克隆抗体的蛋白含量测定及 SDS-PAGE 检测 利用考马斯亮蓝 G-250 法测定抗体蛋白含量。用 30% 丙烯酰胺和 0.8% 亚甲双丙烯酰胺的溶液配制 15% 分离胶和 5% 浓缩胶, 加入含有 β -巯基乙醇的上样液, 上样总体积为 10 μL , 样品体积约为 5 μL 。以 1 mm 厚的垂直板电泳至凝胶下端 1 cm 处停止电泳。用考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后采用凝胶成像系统照相。

1.2.5 间接竞争 ELISA 检测法反应程序

(1) 酶标板预处理: 将新购酶标板用双蒸水浸泡过夜, 晾干后备用。

(2) 包被: 每孔加 100 μL 最适工作浓度抗原液, 4℃ 包被过夜。

(3) 洗涤: 倒去板孔中液体, 倒置拍干孔内残余反应液。用洗涤液反复漂洗 3 次, 后将反应板倒置在吸水纸上, 使孔中洗涤液流尽。

(4) 封闭: 加封闭液 200 μL /孔, 37℃ 孵育 2 h, 然后洗涤(方法同前), 已封闭过的酶标板, 4℃ 保存备用。

(5) 加样: 加稀释至最适工作浓度 2 倍的兔抗血清 50 μL /孔及待测抗原液 50 μL /孔, 以包被液代替待测抗原液为阴性对照, 以包被液代替兔抗血清及待测抗原液为空白对照, 37℃ 孵育 2 h 后洗涤。

(6) 加酶标二抗: 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 100 μL /孔, 37℃ 孵育 1 h, 然后洗涤。

(7) 显色: 加入 TMB 显色液, 100 μL /孔(A

液、B 液各 50 μL), 37℃ 避光显色 15 min, 2 mol · L⁻¹ H₂SO₄ 50 μL /孔终止反应, 20 min 内酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

1.2.6 间接竞争 ELISA 检测法反应程序优化

(1) 抗原抗体最适工作浓度确定 抗体和抗原分别进行系列稀释。用包被液将微孢子虫孢壁蛋白稀释为工作浓度 1.0、2.0、4.0 和 8.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为抗原备用。将兔抗血清按 1: 10²、1: 10³、1: 10⁴ 和 1: 10⁵ 稀释浓度, 以正常兔血清稀释为 1: 10³ 为阴性对照, 以包被液为空白对照。采用间接 ELISA 法比较检测效果, 以发光值与阴性对照的比值最大的抗原抗体浓度作为包被抗原和抗体最佳工作浓度。

(2) 酶标二抗最适工作浓度的确定 将 HRP 标记的羊抗兔 IgG 稀释 5 × 10³ 倍、1 × 10⁴ 倍、2 × 10⁴ 倍、3 × 10⁴ 倍、4 × 10⁴ 倍、5 × 10⁴ 倍和 6 × 10⁴ 倍作为二抗。待测抗原液选用 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 孢壁蛋白为阳性对照、不加待测抗原液为阴性对照, 采用间接 ELISA 法比较检测效果。

(3) 特异性反应 以微孢子虫悬液为阳性对照, 采用间接竞争 ELISA 法对健康柞蚕血淋巴作

检测, 根据 OD 值判断是否发生交叉反应。

1.2.7 间接竞争 ELISA 工作曲线 将微孢子虫溶液分别稀释为 1、5、10、50、10²、5 × 10²、10³、5 × 10³、10⁴、5 × 10⁴、10⁵、5 × 10⁵ 和 10⁶ 倍, 作为待测抗原, 另加阴性对照及空白对照, 根据下述公式计算竞争率。以微孢子虫孢子稀释倍数的自然对数值为横坐标, 竞争率为纵坐标, 绘制竞争标准曲线, 取竞争标准曲线中线性较好的坐标点绘制检测工作曲线。

竞争率 =
$$\frac{\text{竞争抗原孔 OD 值} - \text{空白对照孔 OD 值}}{\text{阴性对照孔 OD 值}}$$

2 结果与分析

2.1 间接竞争 ELISA 法检测效价

用包被液将包被用抗原“微孢子虫孢壁蛋白”稀释为工作浓度 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为抗原, 间接 ELISA 测定的多克隆抗体效价如表 1。当血清稀释至 10⁴ 时, OD₅₉₅ 为 1.022 大于 0.28, 且与阴性对照比值大于 2.1, 所以柞蚕微孢子虫多克隆抗体效价为 1: 10⁴, 可作为后续试验多克隆抗体材料。

表 1 柞蚕微孢子虫多克隆抗体效价测定
Table 1 Titer detection of the polyclone antibody against Nosema pernyi

抗原 Antigen (0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	血清稀释 Serum dilutions					阴性对照 Negative control	空白对照 Blank control
	10 ² 倍	10 ³ 倍	10 ⁴ 倍	10 ⁵ 倍	10 ⁶ 倍		
OD ₅₉₅	2.542	2.346	1.022	0.278	0.138	0.133	0.148

2.2 抗体蛋白含量

如图 1 所示, 蛋白质标准曲线方程为 $y = 0.0008x + 0.0025$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 通过计算可知, 纯化后柞蚕微孢子虫多克隆抗体浓度为 3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 多克隆抗体的 SDS-PAGE 检测

纯化后柞蚕微孢子虫多克隆抗体通过 SDS-PAGE 检测 (图 2), 显示其主要由 2 条蛋白条带组成, 大小约 50 ku 和 25 ku。

2.4 间接竞争 ELISA 法确定抗原抗体最适工作浓度

将抗体和抗原分别进行系列稀释, 用包被液

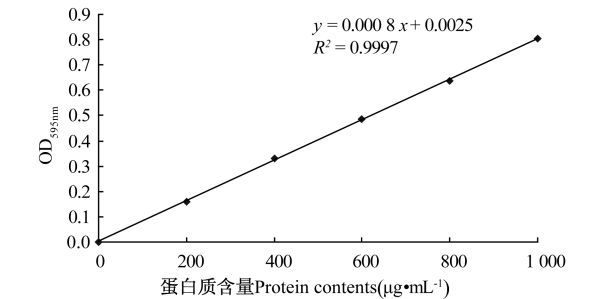


图 1 蛋白质标准曲线
Fig.1 Protein standard curve

将微孢子虫孢壁蛋白稀释为工作浓度 1.0、2.0、

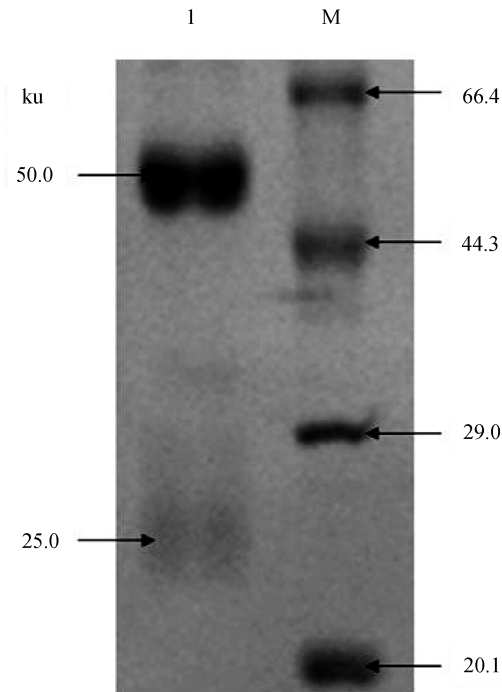


图2 纯化柞蚕微孢子虫多克隆抗体的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE patterns of purified polyclone antibody against *Nosema pernyi*

1 为纯化后的多克隆抗体;
M 为蛋白质低分子质量 marker
lane 1, purified polyclone antibody;
lane M, protein molecular weight marker.

4.0 和 8.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为待测抗原,采用间接竞争 ELISA 法比较检测,确定最佳抗原工作浓度为 2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 微孢子虫孢壁蛋白溶液,最佳抗体工作浓度为兔抗血清按 1:10² 倍浓度稀释(表 2)。

2.5 酶标二抗最适工作浓度的确定

依次稀释酶标二抗至 5 × 10³ 倍、1 × 10⁴ 倍、2 × 10⁴ 倍、3 × 10⁴ 倍、4 × 10⁴ 倍、5 × 10⁴ 倍和 6 × 10⁴ 倍进行测定,阴性对照与阳性对照比值最大的酶标二抗浓度作为最佳工作浓度,最后选择 1:5 × 10⁴ 倍稀释浓度作为酶标二抗最佳工作浓度(表 3)。

2.6 特异性试验结果

特异性试验结果表明,柞蚕血淋巴因氧化而略现红褐色,影响对结果的判断(表 4)。可将柞蚕血淋巴 1 × 10⁴ r · min⁻¹,离心 3 min 后取沉淀用于进行检测,以排除血淋巴对检测试验的干扰。

2.7 间接竞争 ELISA 工作曲线

将微孢子虫溶液分别稀释为 1、5、10、50、10²、5 × 10²、10³、5 × 10³、10⁴、5 × 10⁴、10⁵、5 × 10⁵ 和 10⁶ 倍,作为待测抗原,另加阴性对照及空白对照,结果见表 5。

以孢子稀释倍数的自然对数值为横坐标,竞争率为纵坐标,绘制竞争标准曲线(图 3)。当微孢子虫浓度为 1.6 × 10⁵ ~ 1.6 × 10⁸ spores · mL⁻¹

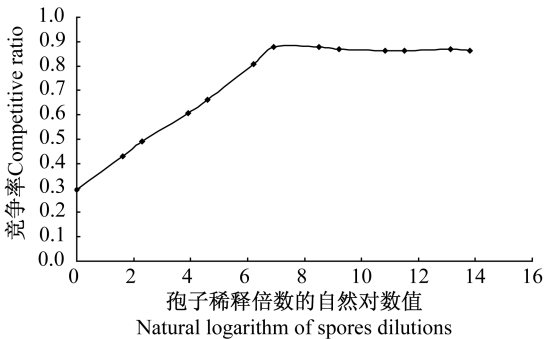


图3 竞争标准曲线

Fig.3 The standard curve of IC-ELISA

表2 抗原抗体最适工作浓度试验结果

Table 2 IC-ELISA optimal concentration

待测抗原浓度(μg · mL ⁻¹) Antigen concentration	抗体稀释倍数 Polyclone antibody dilutions				阴性对照 Negative control	空白对照 Blank control
	10 ² 倍	10 ³ 倍	10 ⁴ 倍	10 ⁵ 倍		
1.0	1.33	1.02	0.28	0.15	0.15	0.13
2.0	1.37	1.23	0.34	0.15	0.14	0.12
4.0	1.37	1.33	0.45	0.17	0.18	0.14
8.0	1.39	1.32	0.48	0.17	0.15	0.19

表 3 酶标二抗最适工作浓度试验
Table 3 HRP-IgG optimal concentration

	二抗稀释倍数 HRP-IgG dilutions						
	5 × 10 ³ 倍	1 × 10 ⁴ 倍	2 × 10 ⁴ 倍	3 × 10 ⁴ 倍	4 × 10 ⁴ 倍	5 × 10 ⁴ 倍	6 × 10 ⁴ 倍
阴性对照 Negative control	1.39	1.38	1.35	1.36	1.12	1.12	0.99
阳性对照 Positive control	1.36	1.36	1.24	1.25	1.03	0.98	0.88
阴性对照/阳性对照 Negative control/Positive control	1.02	1.01	1.09	1.09	1.09	1.14	1.12

表 4 特异性试验结果
Table 4 Result of specificity test

待测抗原 Antigen	阳性对照 Positive control	柞蚕血淋巴 Tussah hemolymph	阴性对照 Negative control
OD 值	0.69	0.81	1.30

表 5 间接竞争 ELISA 法检测结果
Table 5 Detection result of IC-ELISA

孢子稀释倍数 Spores dilutions	OD 值 OD value	孢子稀释倍数自然对数值 Natural logarithm of spores dilutions	竞争率 Competitive ratio	孢子浓度(个 · mL ⁻¹) Spores concentration
1 × 10 ⁶	1.25	13.81551	0.861538	1.6 × 10 ²
5 × 10 ⁵	1.26	13.12236	0.869231	0.8 × 10 ²
1 × 10 ⁵	1.25	11.51293	0.861538	1.6 × 10 ³
5 × 10 ⁴	1.25	10.81978	0.861538	0.8 × 10 ³
1 × 10 ⁴	1.26	9.21034	0.869231	1.6 × 10 ⁴
5 × 10 ³	1.27	8.517193	0.876923	0.8 × 10 ⁴
1 × 10 ³	1.27	6.907755	0.876923	1.6 × 10 ⁵
5 × 10 ²	1.18	6.214608	0.807692	0.8 × 10 ⁵
1 × 10 ²	0.99	4.60517	0.661538	1.6 × 10 ⁶
50	0.92	3.912023	0.607692	0.8 × 10 ⁶
10	0.77	2.302585	0.492308	1.6 × 10 ⁷
5	0.69	1.609438	0.430769	0.8 × 10 ⁷
1	0.51	0	0.292308	1.6 × 10 ⁸
空白对照 Blank control	0.13	—	—	—
阴性对照 Negative control	1.30	—	—	—

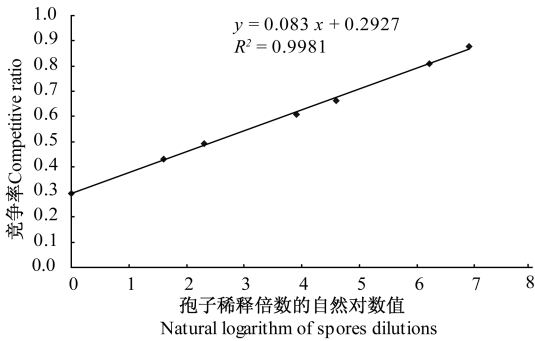


图4 检测工作曲线

Fig. 4 The work curve of IC-ELISA

时,曲线线性较好,取该浓度中的7个坐标点绘制检测工作曲线(图4)。由该工作曲线可知,微孢子虫间接竞争 ELISA 检测法的灵敏度为 1.6×10^5 spores $\cdot$ mL $^{-1}$ 。

3 讨论

目前,柞蚕生产上仍一直沿用显微镜检查雌蛾中是否含有柞蚕微孢子虫孢子来淘汰感病雌蛾的方法进行微粒子病的防治,该法只能检查出已经发育到孢子阶段的柞蚕微孢子虫,且检出效率及准确性等难以得到保障,因此开发高效、准确、灵敏的实用检测技术势在必行。Sharan 等(1992)提出利用蚕蜕取代雌蛾进行显微镜检测,可以减轻制种过程中的镜检工作;Hussain and Buhroo (2011)也提出利用蚕蜕涂片的镜检方法,且发现蛹组织及蚕蜕中的微孢子虫检出没有差异,可以在制种过程中进行应用。Åkerstedt (2002)建立一种间接 ELISA 检测兔脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon cuniculi*) 的方法,并且与碳免疫、间接免疫荧光等检测该微孢子虫的常用血清学检测方法的检测效果无明显差异。Kawarabata 和 Hayasaka (1987)利用家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 碱溶性孢子表面抗原代替完整孢子,建立了家蚕微孢子虫 ELISA 检测方法。利用从家蚕微孢子虫中分离纯化的极丝蛋白制备多克隆抗体并用 ELISA 法测定其效价,滴度为 $1:1.024 \times 10^5$ (高永珍等,2001)。Mike 等(1988)制备3种微孢子虫的特异性单克隆抗体,ELISA 抑制研究表明3种单克隆抗体能够被相应的微孢子虫所抑制。陈建国等(1988)筛选了6株家蚕微孢子虫单克隆抗体细胞株,除 Nb4 和 Nb6 外,其余均对家蚕微孢子

虫具有特异性,且 ELISA 检测最低量为 700 个孢子。Ke 等(1990)利用家蚕微孢子虫单克隆抗体的 ELISA 法检测出最低可达等量于 400 个孢子的碱溶性抗原,且可以利用 ELISA 分析不同微孢子虫之间的免疫相关性。万森等(2008)建立家蚕微孢子虫单克隆抗体的双抗夹心 ELISA 检测法,结果表明该方法对纯化家蚕微孢子虫孢子和混入蚕卵组织液样本的检测灵敏度分别为 3.125×10^5 spores $\cdot$ mL $^{-1}$ 和 5×10^6 spores $\cdot$ mL $^{-1}$ 。微粒子病检测的技术根本是解决基于实际应用条件下的灵敏度和特异性的问题,微孢子虫 ELISA 检测法在很多方面还存在不足之处,如抗体捕获孢子的能力较弱(尤其是单抗)、灵敏度的稳定性较差等问题,由于 *N. bombycis* 孢子个体和比重较大,造成包被或抗体捕获孢子效果不佳引起检测灵敏度不稳定,因此,实用化检测技术尚有待进一步深入研究(鲁兴萌等,2011)。

王伯阳等(2012)利用柞蚕微孢子虫孢子液直接免疫家兔获得柞蚕微孢子虫多克隆抗体,采用双抗夹心法和竞争法制作胶体金免疫层析试纸条,建立柞蚕微孢子虫胶体金免疫层析检测法,2种方法的检测时间均为 10 min,检测灵敏度为 0.8×10^7 spores $\cdot$ mL $^{-1}$ 。本研究表明,采用间接竞争 ELISA 法检测柞蚕微孢子虫灵敏度可达到 1.6×10^5 spores $\cdot$ mL $^{-1}$,检测特异性及灵敏度效果较好。柞蚕微孢子虫含有多种孢壁蛋白(王林玲,2007;张玺等,2010;王伯阳等,2011),可引起哺乳动物的免疫反应。本研究结果为开发针对柞蚕微孢子虫特异性的单克隆抗体、进一步解决检测假阳性、提高检测灵敏性及特异性等方面提供了基础。

参考文献 (References)

- Åkerstedt J, 2002. An indirect ELISA for detection of *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). *Acta vet. Scand.*, 43(4):211–220.
- Engvall E, Perlmann P, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9):871–874.
- Hussain A, Buhroo AA, 2011. An alternative method to secure pebrine free silkworm eggs. *Int. J. Entomol.*, 2(1):40–42.
- Kawarabata T, Hayasaka S, 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect alkali-soluble spore surface

- antigens of strains of *Nosema bombycis* (Microspora: Nosematidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 50(2):118–123.
- Ke ZX, Xie WD, Wang XZ, Long QX, Pu ZL, 1990. A monoclonal antibody to *Nosema bombycis* and its use for identification of microsporidian spores. *J. Invertebr. Pathol.*, 56(3):395–400.
- Mike A, Ohwaki M, Fukada T, 1988. Preparation of monoclonal antibodies to the spores of *Nosema bombycis*, M11 and M12. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(3):189–195.
- Sharan SK, Bansal AK, Shukla RM, Thangavelu K, 1992. A new method of detection of pebrine disease in tasar silk moth, *Antheraea mylitta* Drury (Saturniidae). *J. Res. Lepid.*, 31(1/2):12–15.
- 陈建国, 胡萃, 金伟, 马可, 陆元林, 陈钦培, 1988. 家蚕微孢子虫单克隆抗体的研制及其在检测上的初步应用. 蚕业科学, 14(3):168–170.
- 丁杰, 宿桂梅, 问锦曾, 1992. 中国柞蚕微孢子虫病病原的研究. 蚕业科学, 18(2):88–90.
- 高永珍, 黄可威, 常智杰, 2001. 家蚕病原性微孢子虫极丝蛋白的研究. 蚕业科学, 27(2):128–130.
- 姜义仁, 邓真华, 王伯阳, 段玉玺, 秦利, 2011. 柞蚕微孢子虫分离纯化方法. 应用昆虫学报, 48(2):452–456.
- 鲁兴萌, 蔡顺风, 邱海洪, 孙文静, 何永强, 2011. 蚕病检测中免疫学技术的研究与应用. 蚕桑通报, 42(3):1–4.
- 唐啸尘, 黄自然, 宁波, 张春艳, 1999. 柞蚕微孢子虫单克隆抗体的研制及诊断. 蚕业科学, 25(4):221–224.
- 万森, 何永强, 张海燕, 张凡, 钱永华, 鲁兴萌, 2008. 家蚕成品卵微孢子病 McAb-ELISA 检测方法的研究. 蚕桑通报, 39(4):13–16.
- 王伯阳, 姜义仁, 杨瑞生, 李艳卓, 王勇, 秦利, 2011. 柞蚕微孢子虫 3 种孢壁蛋白的提取与鉴定. 蚕业科学, 37(2):330–336.
- 王伯阳, 姜义仁, 臧敏, 石生林, 杨瑞生, 包臣, 秦利, 2012. 柞蚕微孢子虫胶体金免疫层析检测法. 蚕业科学, 38(1):97–101.
- 王林玲, 2007. 柞蚕微孢子虫核糖体基因及家蚕、柞蚕微孢子虫蛋白质组以及侵染家蚕后中肠的比较蛋白质组学研究. 博士学位论文. 南京:江苏大学.
- 徐耀军, 陈大光, 2006. 柞蚕微孢子虫病上升的原因和防治措施. 特种经济动植物, 9(8):15–16.
- 张玺, 许金山, 张小燕, 周泽扬, 2010. 柞蚕微孢子虫部分孢壁蛋白的分离鉴定及孢壁蛋白 8 的序列分析. 蚕业科学, 36(6):949–956.