天敌作用评价专题

定量评价捕食性天敌功能——单克隆抗体技术*

原 鑫[1] 赵伟春[2] 程家安[1] 祝增荣[1**]

（1. 水稻生物学重点实验室，浙江大学昆虫科学研究所，杭州 310058；2. 浙江中医药大学生物工程学院，杭州 310053）

摘 要 如何将定性捕食的数据转化为定量 的数据是评 价捕食性天敌功能的一大挑战。酶联免疫吸附测定（Ezyme-linked immunosorbent assay，ELISA）成功地解决了这一难题。该 ELISA 具有灵敏度高、成本低、操作简便、可大批量检测样品等独特的优点，即使 20 世纪末以来大规模应用的聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction, PCR）及新一代测序技术应用，也并未完全取代 ELISA。由于单抗具有高度特异性和均质性，同时结合了 ELISA 检测方法具有成本低、大批量样品快速检测等优点，在很大程度上改进了节肢动物捕食作用的研究方法。本文以利用褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 单抗评价稻田拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 对褐飞虱的控制作用为例，阐述基于单抗的 ELISA 检测技术用于捕食作用评价的技术路线及应用前景等。

关键词 捕食者，猎物，定量，单克隆抗体，酶联免疫吸附试验

Monoclonal antibody——a powerful tool for quantitatively evaluating predatory function

YUAN Xin[1] ZHAO Wei-Chun[2] CHENG Jia-An[1] ZHU Zeng-Rong[1**]

(1. State Key Laboratory of Rice Biology, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. College of Bioengineering, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract Although molecular analysis techniques enable the detection of the relationship between predators and their prey most of these methods are qualitative. The challenge is to transform qualitative assay results into quantitative data. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has the advantages of high sensitivity, low cost, ease of use and high throughput, and consequently is one of the most effective methods to conquer this challenge. These advantages make ELISA irreplaceable, even since the polymerase chain reaction (PCR) and new generation sequence technology have become widely used. Monoclonal antibodies, with their high specificity and homogeneity, combined with ELISA's low-cost, rapid analysis of large-scale samples, improves the available methods for the evaluation of arthropod predation. In this introductory essay, we use monoclonal antibody to evaluate predation of the brown planthopper (BPH) *Nilaparvata lugens* by the wolf spider *Pardosa pseudoannulata* as an example, and present the main roadmap of the technique and its applications.

Key words predator, prey, quantitative, monoclonal antibody, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

捕食性天敌对害虫控制作用的定量评价一直是生态学和生物防治研究的难点之一。尽管人们已经提出许多研究方法来定量评价节肢动物的捕食作用，但准确定量评价捕食作用仍非常困难。较早用来评价捕食者和猎物之间捕食关系的技术为蛋白电泳（Protein electrophoresis），即提取捕食者或其肠道的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。但该方法不能进行物种特异性识别，而且如果捕

* 资助项目：科技部国家基础重点研究发展规划项目（973 项目，2010CB126200）；农业行业项目（201003031）；支撑项目（2012BAD19B01）；国家自然科学基金项目（31371935）；ADB-IRRI 稻飞虱项目（RETA15）；上海市长三角科技联合攻关项目（13395810100）

**通讯作者, E-mail: zrzhu@zju.edu.cn

收稿日期: 2013-10-08, 接受日期: 2013-11-16

食者同时捕食多种猎物时也不能进行分离（Walrant and Loreau, 1995）。随着免疫酶、放射免疫、免疫荧光、免疫胶体金及亲和层析等免疫学检测技术的发展与成熟，免疫学检测方法成为目前研究捕食者与猎物相互关系的一种比较理想的方法。基于多克隆抗血清的免疫检测（Immunosaasys using polyclonal antisera）应运而生并且在随后的 50 年间被广泛应用于分析无脊椎动物的消化道内含物，但多克隆抗血清特异性差，容易产生交叉反应，不能准确地确定捕食者的种类（赵伟春，2001）。近年来，随着细胞工程技术和基因工程技术的发展，目前应用的具有高度专一、高度均质的单克隆抗体（Monoclonal antibody，单抗）被作为生物探针广泛应用于特定抗原成分的检测，在植物学、动物学、微生物学、细胞生物学、遗传学和酶学等生命科学领域都得到了广泛应用（刘秀梵，1994）。基于单抗的免疫学检测技术被迅速用于捕食者–猎物的定性和定量分析中，并展示了其独特的优势（赵伟春，2001）。

在捕食作用研究中，常用的免疫学检测方法为抗体夹心酶联免疫吸附试验（Sandwich enzyme linked immunosorbent assay，Sandwich ELISA），其基本原理为：结合在固相载体（酶标板）表面的抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗体既保留其免疫学活性，又增加酶的活性。在测定时，受检样品（猎物蛋白抗原）与固相载体表面的抗体起反应。用洗涤的方法去除未结合在固相载体上的抗体或抗原。再加入酶标记的抗体，也通过免疫反应与结合在固相载体上的抗原抗体复合物中的抗原蛋白相结合。此时固相上的酶量与标本中受检抗原的量呈正比。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物（或发荧光），颜色的深浅或荧光的强弱与样品中受检抗原的量成正相关，故可根据呈色的深浅或荧光的强弱进行猎物蛋白的定性或定量分析；由于酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的灵敏度，且抗原抗体反应具有特异性，因而该方法也具有特异性。

近年来单抗作为分子探针被应用于捕食作用的研究，已被国内外许多研究者采用（Miller, 1981；Crook and Sunderland, 1984；Greenstone and Morgan, 1989；黄葵等, 1992；张古忍等, 1996；刘红玉等, 1997；刘雨芳等, 2002；Symondson，2002）。由于单抗具有高度特异性和均质性，同时结合了 ELISA 检测方法具有成本低、大批量样品快速检测等优点，在很大程度上改进了节肢动物捕食作用的研究方法。本文以利用褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 单抗评价稻田拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 对褐飞虱的控制作用为例，阐述基于单抗的 ELISA 检测技术用于捕食作用评价的技术路线及应用前景等。

1　方法

以水稻的重要害虫褐飞虱怀卵雌成虫匀浆液的上清液作为抗原，采用传统的杂交瘤技术（图 1）制备针对褐飞虱种特异性的单抗（Zhao *et al*., 2004）。

1.1　免疫原的制备

将褐飞虱怀卵雌成虫匀浆，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液定容至 0.05 g/mL 后作为抗原。

1.2　免疫动物

选择体重 18~20 g BALB/C 雌性小鼠，用上述制备的抗原来免疫。50~100 μg 抗原与等体积福氏完全佐剂混合，充分乳化后，经腹腔注射，0.2 mL/只，间隔 3 周，取与第 1 次免疫等量抗原和等体积福氏不完全佐剂充分乳化后，第 2 次腹腔注射 0.2 mL/只，过 3 周后用加倍剂量的抗原进行腹腔注射，3 d 后取脾细胞进行融合。

1.3　细胞融合

取上述免疫小鼠脾细胞与体外培养的小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0）按 5~10∶1 的比例，在无血清的 RPMI-1640 培养基中混匀，1 200 r/m 离心 2 min，去除培养基，在 37℃水浴下加入 0.7 mL 50% PEG（Sigma）作为融合剂，使其融合 2 min，用无血清的 RPMI-1640 培养基终止融合后，1 200 r/min 离心 2 min，沉淀用 HAT 培养基悬浮，分装到含有饲养细胞的 96 孔细胞板中，37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养。

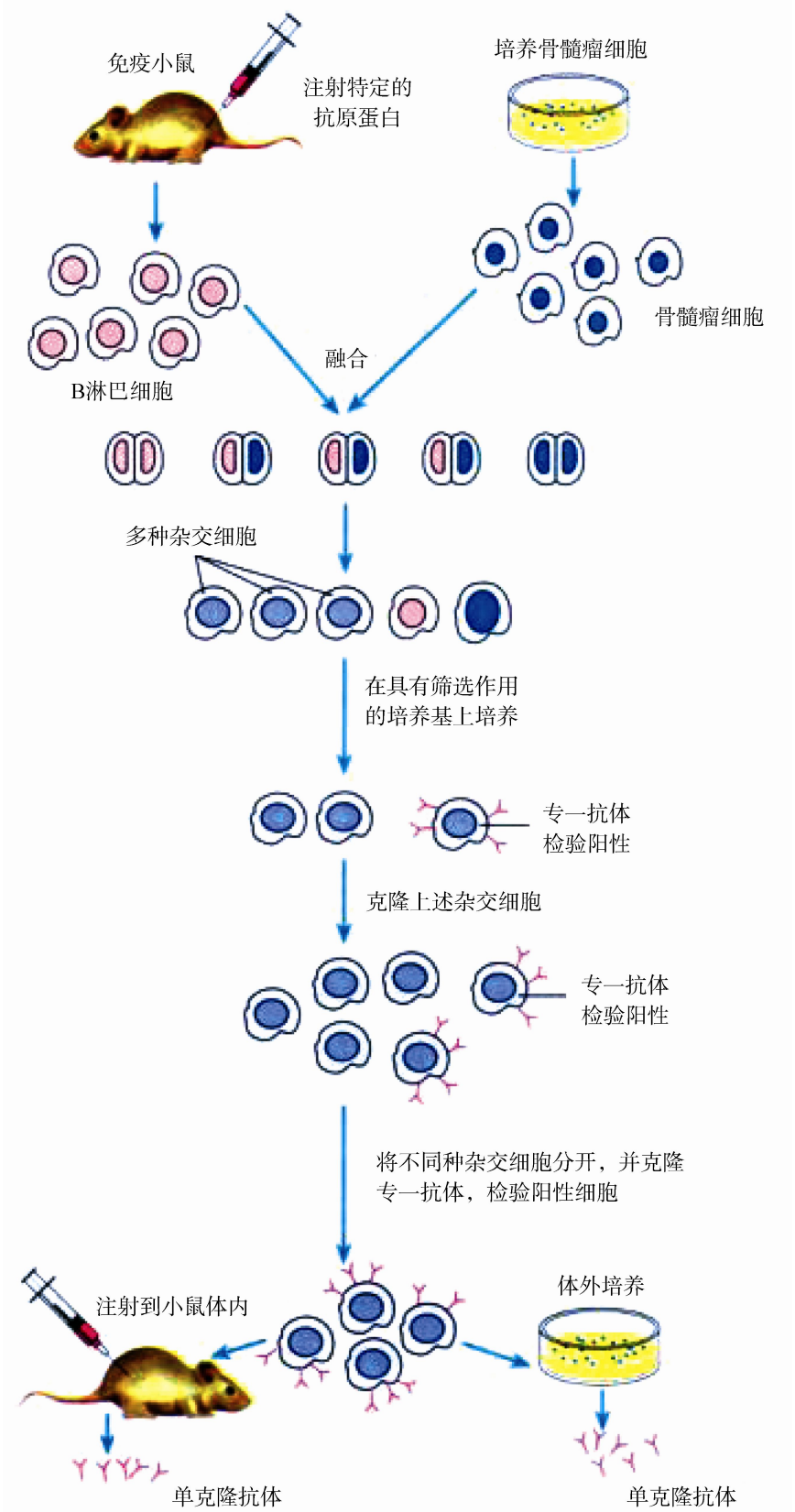

图 1　单克隆抗体制备过程示意图（引自中国统一教育网，2011）

Fig. 1　Flow chart of making monoclonal antibody (from unified China education network, 2011)

1.4　杂交瘤细胞及阳性孔的筛选

细胞培养 5 d 后，用 HAT 培养基换液一次，第 10 天用 HT 培养基换液，等到融合细胞覆盖孔底 10%~50%时，常规间接 ELISA 方法筛选阳性孔，共获 50 多个对上述抗原有反应的阳性孔。

1.5　阳性孔的特异性检测及特异性阳性孔的克隆

阳性孔的特异性鉴定采用间接 ELISA 方法。取稻田常见节肢动物同免疫原制备的方法制备各物种的蛋白初提液，用包被液稀释成 1~10 μg/mL 的蛋白初提液 100 μL/孔包被 ELISA 板，4℃过夜，使其吸附于酶标板上；PBST 洗涤 3 次后用 1%~5%的脱脂奶粉或 1%~3% BSA 封闭 30~60 min 加入阳性孔培养上清 100 μL/孔，37℃ 1~2 h；PBST 洗涤 3 次后加入按说明书稀释 10 000 倍的辣根过氧化物酶标记兔抗鼠 IgG 二抗（Sigma 公司）100 μL/孔，37℃, 1~2 h，PBST 洗涤 3 次后，用 OPD-H_2O_2 底物显色，2 mol/L H_2SO_4 终止反应后，用酶标仪读取 OD_{492} 的值，以与阴性 OD 值比值大于 2.1 为阳性。获分别对褐飞虱抗原有特异性反应的阳性孔 4 个。筛选出的特异性阳性孔用常规的有限稀释法克隆，获对褐飞虱抗原有特异性反应的杂交瘤细胞株二株。细胞株进一步扩大培养，用于制备单抗腹水和液氮冻存。

杂交瘤细胞通常用含有 8%~10%的二甲亚砜和 20%小牛血清的培养基冻存于液氮中，在液氮中细胞可以保存多年，在－80℃中可以作 3~6 个月短期保存。冻存细胞需要缓慢降温，复苏细胞时需快速升温，这样可以确保细胞有较高的存活率。

1.6　单抗腹水制备及纯化

取 8 周龄左右 BALB/C 小鼠，腹腔注射 0.3~0.5 mL 降植烷（Sigma），7~10 d 后腹腔注入（5~10）×10^5 个杂交瘤细胞，注射后 7~10 d 可见小鼠腹部明显膨大，取腹水，2 000 r/min 离心 3 min，收集上清液，即为腹水型单抗。取 1 倍体积腹水加 2 倍体积 0.06 mol/L pH 4.8 醋酸缓冲液稀释，加辛酸（30 μL/mL 腹水），室温下边加边搅拌，4℃澄清 1 h，12 000 r/min 离心 20 min，收集上清，再用 50%饱和硫酸铵沉淀免疫球蛋白，4℃放置 2 h，3 000 r/min 离心 20 min，沉淀用 2 倍体积的 PBS 溶液溶解，在 4℃流动透析 24 h 后即获纯化的腹水型抗体，－70℃保存。

1.7　单抗的亚类鉴定和腹水效价测定

将单抗腹水与 Sigma 公司的标准抗小鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgM 抗体，作双向琼脂扩散试验，结果表明，二株单抗的亚类均为 IgG1。用常规间接 ELISA 方法检测腹水型单抗的效价，结果表明上述二种单抗的效价均在 10^{-6}~10^{-8} 之间。

1.8　待测样品处理

将田间采集到的褐飞虱的捕食性天敌拟环纹豹蛛－20℃冻死，加入 100 μL 的 0.01 mol/L 的 PBS（pH 7.2）研磨，待样品成匀浆状后加入 900 μL PBS，定容至 1 mL/头，转移到离心管中，5 000 r/min 离心 10 min，取上清，15 000 r/min 低温离心 15 min，取上清，－20℃保存待测，同时以供水饥饿 15 d 的拟环纹豹蛛作为阴性对照，处理方法同上。

1.9　ELISA 检测

田间捕获的拟环纹豹蛛均单头检测。采用以上制作的单抗进行抗体夹心 ELISA 检测（Crook and Sunderland，1984；赵伟春等，2002）。酶标单抗采用改良的过碘酸钠法制备（郭春祥和郭锡琼，1983）。检测过程中单抗稀释 1 000 倍，辣根过氧化物酶标记单抗稀释 4 000 倍，每头拟环纹豹蛛样品稀释 100 倍。用拟环纹豹蛛 100 倍稀释液将褐飞虱抗原进行倍比稀释（50~51 200 倍）做标准曲线。求出阴性对照 OD 值得平均值 N 和标准误 SD，样品 OD 值 $P \geq N + 3SD$，视为阳性反应，否则为阴性反应。计算各样品对褐飞虱单抗的阳性反应率，并根据抗原标准曲线将检测的 OD 值转换为褐飞虱雌成虫数。

根据赵伟春等（2005）建立的估计拟环纹豹蛛对褐飞虱捕食量的计算公式，将猎物残留生物量、田间调查前 3 d 的温度和捕食者密度代入方程：

t_{Dp} = 0.1526 + *exp*（3.9716-0.1347 × T），

$P = Q_0\ d/f\ t_{Dp}$。

其中，t_{Dp}：猎物可测定时间，T：田间温度，P：捕食量，Q_0：猎物残留量，d：捕食者密度，f：消化系数。

计算田间被拟环纹豹蛛捕食的褐飞虱的生物量，再根据被捕食褐飞虱的生物量及田间褐飞虱生物量，计算田间褐飞虱的被捕食率，从而分析拟环纹豹蛛对褐飞虱的捕食作用（图 2）（赵伟春等，2005）。

2 单抗技术在定量分析捕食者和猎物关系的一些应用实例

节肢动物的捕食作用受捕食者的捕食频率、捕食量和消化速率等各种因子的影响，因此捕食作用的定量评价非常困难。自从单抗方法引入捕食作用研究以来，一系列定量评价捕食量的公式被建立起来。Hagler 等（1991）制备出豆荚草盲蝽 *Lygus hesperus* 的单抗，用于比较多种捕食性天敌的 OD 值和阳性反应率，粗略地评价了天敌的控制作用。Greenstone 和 Hunt（1993）利用单抗研究了美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 5 龄幼虫在长足胡蜂 *Polistes metricus* 肠道中的降解动态，为定量研究长足胡蜂取食美洲棉铃虫奠定基础。Hagler 等（1995）利用红铃虫作为抗原制备的单抗检测了捕食性天敌暗小花蝽 *Orius triaticolor* 肠道中抗原含量，定量地评价了暗小花蝽对红铃虫卵的捕食作用。赵伟春等（2005）用怀卵褐飞虱用抗体夹心 ELISA 对浙江稻田拟环纹豹蛛与褐飞虱关系进行了研究，结果表明拟环纹豹蛛对褐飞虱单抗的阳性反应率与田间褐飞虱生物量及拟环纹豹蛛对褐飞虱的占有量显著相关，并且定量地评估了拟环纹豹蛛在特定密度下对褐飞虱的捕食率。Monzo 等（2012）利用地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 重组单抗成功检测到捕食者体内地中海实蝇的抗原，该重组单抗特异性比传统单抗的特异性更高。Schmidt 等（2012）制作了双翅目蝇类的单抗 Dros W-VI-B8 用来检测在玉米田和大豆田以及室内饲养的豹蛛 *Pardosa milvina* 对蝇类捕食量与蝇类种群密度的关系。

3 讨论

1971 年 Engvall 和 Perlmann 第一次建立了 ELISA 检测方法，使对抗原和抗体的检测和定量可以通过简单的颜色反应实现，它把抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机的结合在

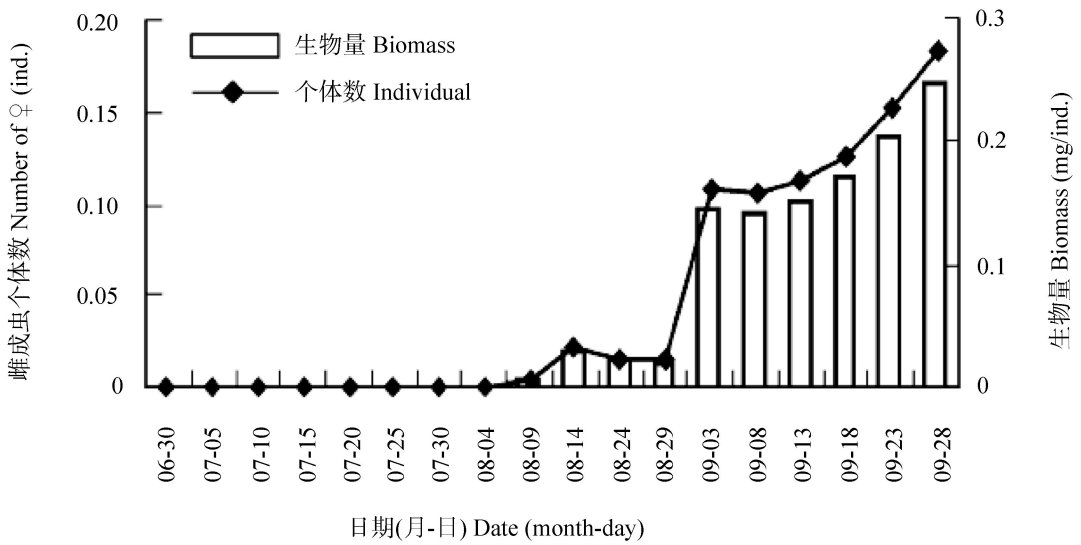

图 2 拟环纹豹蛛捕食褐飞虱数量随时间变化（引自赵伟春等，2005）

Fig. 2 Dynamics of *Nilaparvata lugens* consumed by *Pardosa pseudoannulata* (from Zhao *et al*., 2005)

一起。免疫学检测方法的前提基础是必须要先制备高度特异性的单抗，一旦获得单抗，此后的免疫学检测方法最大的特点为灵敏度高（1~20 ng），同时具有操作简单、易于标准化且批次间差异小、特异性好、安全并可同时检测大批量样品的优点。单克隆抗体技术的最大优点为一个单抗特异性的结合一个抗原。由于单抗针对某一特定的抗原决定簇，我们可以制备出针对某一特定害虫且不与其他昆虫发生反应的单抗，通过检测捕食者消化道中是否含有该特定害虫的蛋白，就可以确定捕食者是否取食该害虫。但是，制备单抗需要相对较长的时间，而且技术要求高、难度大，因此，到目前为止，只有少数的单抗被真正用于田间捕食者和猎物相互关系的研究（黄葵等，1992；Hagler and Naranjo，1994；张古忍等，1997）。虽然捕食者对猎物的捕食作用受多种因素的影响，如果消化时间和每次取食的量以及与温度等因素的关系通过实验研究确定的话，对捕食数量进行估计就成为可能，但是要想在实验条件下完全模拟自然界的环境温度、捕食者密度以及猎物密度等因素是不可能的，因此对捕食者和猎物的定量评价也是相对的。

20 世纪末，聚合酶链式反应（PCR）被大规模应用，越来越多的人开始使用这种方法来研究捕食者和猎物之间的关系（Wang *et al*., 2013），但是单抗技术并未被完全取代。PCR 准确度确实高，这是因为 PCR 检测技术建立在 DNA 提取、扩增、测序和序列分析等现代先进的分子生物学基础上，鉴定准确度非常高，适合用于实验室的科学研究。但 PCR 操作复杂、耗时长、成本高，而且需要 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、测序仪等昂贵的仪器设备，对检测员的操作技能和知识储备的要求也相对较高，而且每次检测的样本数也比较少，不适合大量样本的检测，也不适合基层植保站和检验检疫部门的农技人员进行操作。此外，PCR 技术只能检测种的特异性，对于该种的不同发育阶段则无能为力，而单克隆技术可以精确到各个龄期（Greenstone *et al.*，2013）。同时，在生态系统中，利用 PCR 检测方法来评估捕食者对猎物的捕食作用也同样受猎物密度、捕食者密度、饥饿状态、环境温度和取食频率等众多因素的影响，这两种技术间并不是取代与被取代关系，而是可以相辅相成的。Hagler 等（2013）结合单抗技术及 PCR 技术对柑橘园中褐透翅尖头叶蝉 *Homalosisca vitripennis* 和它的捕食性天敌进行研究，结果表明，这两种方法检测的捕食性天敌捕食猎物的阳性率存在一定的差异。随着定量 PCR 技术和新一代测序技术的发展，使我们对捕食者和猎物间关系的检测有了更多的方法可以选择，但各种方法间存在一定的差异，我们面临的挑战是如何结合这几种方法，使捕食者捕食猎物的量更加接近实际情况。

由于单克隆抗体技术只是一种相对定量的方法，而不是绝对定量。因为：（1）由于被捕食猎物在捕食者体内的残留量与检测时间和实际捕食时间的间隔时间长度，以及此期间的温度有关，而我们并不知道捕食者实际捕食的时间；（2）同种不同年龄个体测得的结果是不同的，田间猎物不同年龄的个体同时存在，不同捕食者对不同年龄也会有一定的选择性，但田间条件下实际捕食不同年龄个体数或比例需要取样调查方可得知。因而，为了提高该方法的准确性，需要结合特定猎物捕食后随时间的降解动态与温度等环境因子之间的关系的实验、对特定猎物不同年龄捕食选择性及其受相关因子影响的实验、田间猎物和捕食者的群落动态取样调查。在此基础上，构建综合评判模型，可更加准确、精细地评估捕食者对猎取的捕食功能。

参考文献 (References)

* 资助项目：科技部国家基础重点研究发展规划项目（973 项目，2010CB126200）；农业行业项目（201003031）；支撑项目（2012BAD19B01）；国家自然科学基金项目（31371935）；ADB-IRRI 稻飞虱项目（RETA15）；上海市长三角科技联合攻关项目（13395810100）

**通讯作者, E-mail: zrzhu@zju.edu.cn

收稿日期: 2013-10-08, 接受日期: 2013-11-16

Crook NE, Sunderland KD, 1984. Detection of aphid remains in predatory insects and spiders by ELISA. *Ann. Appl. Biol*., 105: 413–422.

Engvall E, Perlmann P, 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa.3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, 109(1): 129–135.

Greenstone MH, Morgan CE, 1989. Predation on *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae): an instar-specific ELISA assay for stomach analysis. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 82(1): 45–49.

Greenstone MH, Hunt JH, 1993. Determination of prey antigen half-life in *Polistes metricus* using monoclonal antibody-based immunodot assay. *Entomol. Exp. Appl.*, 68: 1–7

Greenstone MH, Payton ME, Weber DC, Simmons AM, 2013. The detectability half-life in arthropod predator-prey research: what it is, why we need it, how to measure it, and how to use it. *Mol. Ecol.*, doi: 10.1111/mec.12552.

Hagler JR, Naranjo SE, 1994. Qualitative survey of two Coleopteran predators of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) and *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) using a multiple prey gut content ELISA. *Environ. Entomol.*, 23(1): 193–197.

Hagler JR, Buchmann SL, Hagler DA, 1995. A simple method to quantify dot blots for predator gut content analyses. *J. Entomol. Sci*., 30: 95–98.

Hagler JR, Blackmer F, Krugner R, Groves RL, Morse JG, Johnson MW, 2013. Gut content examination of the citrus predator assemblage for the presence of Homalodisca vitripennis remains. *Bio. Control*, 58: 341–349.

Miller MC, 1981. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay of narrow- and broad-spectrum anti-adult southern pine beetle serum. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 74(3): 279–282.

Monzo C, Urbaneja A, Ximenez-Embun M, Garcia-Fernandez J, Garcia JL, Castanera P, 2012. Selection of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) specific recombinant monoclonal phage display antibodies for prey detection analysis. *PLoS ONE*, 7(12): e51440.

Symondson WOC, 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Mol. Ecol*., 11: 627–641.

Schmidt JM, Harwood JD, Rypstra AL, 2012. Foraging activity of a dominant epigeal predator: molecular evidence for the effect of prey density on consumption. *Oikos*, 121: 1715–1724.

Walrant A, Loreau M, 1995. Comparison of iso-enzyme electrophoresis and gut content examination for determining the natural diets of the groundbeetle species *Abax ater* (Coleoptera: Carabidae). *Entomolgia Generalis*, 19: 253–259.

Wang GH, Wang XQ, Qiao F, Zhu ZR, Cheng JA, 2013. Development and preliminary application of a triplex real-time polymerase chain reaction assay for evaluating predation on three planthoppers in a rice ecosystem. *Mol. Ecol. Resour.*, 3(5): 811–819.

Zhao WC, Cheng JA, Chen ZX, 2004. Development of a monoclonal antibody to detect predation of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Int. J. Pest Manage*., 50(4): 317–321.

黄葵, 郭予元, 谢云陆, 1992. 应用酶联免疫吸附法鉴定粘虫的捕食性天敌. 植物保护学报, 19(3): 207−211.[Huang K, Guo YY, Xie YL, 1992. The application of enzyme-liked immunosorbent assay(ELISA) for identifying the predators of oriental armyworm. *Acta Phytophylacica Sinica*, 19(3): 207–211.]

郭春祥, 郭锡琼, 1983. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. 上海免疫学杂志, 3(2): 97–100.[Guo CX, Guo XQ, 1983. Introducing a simple, fast, efficient Sodium periodate method horseradish peroxidase labeled antibody. *Shanghai Journal of Immunology*, 3(2): 97–100.]

刘秀梵, 1994. 单克隆抗体在农业上的应用. 合肥: 安徽科技出版社. 1-411.[Liu XF, 1994. Application of monoclonal antibody to aquaculture. Hefei: *Anhui Science and Technology Press*. 1-411.]

刘红玉, 陈常铭, 江汉华, 1997. 测定节肢动物捕食者与猎物关系的 A 蛋白双抗体夹心酶联免疫吸附技术. 昆虫学报, 40(2): 219−224.[Liu HY, Chen CM, Jiang HH, 1997. Protein a double antibody sandwich enzymelinked immunosorbent assay(pas-ELISA)for identifying the relationship between arthropod predator and prey. *Acta Entomologica Sinica*, 40(2): 219–224.]

刘雨芳, 张古忍, 古德祥, 温瑞贞, 2002. 用 ELISA 方法研究稻田节肢动物的食物关系. 昆虫学报, 45(3): 352−358. [Liu YF, Zhang GR, Gu DX, Wen RZ, 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay used to detect the food relationships of the arthropods in paddy fields. *Acta Entomologica Sinica*, 45(3): 352-358.]

赵伟春, 2001. 应用单克隆抗体评价稻田天敌的捕食作用. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学.[Zhao WC, 2001. Evaluation of the predation of natural enemies in rice field by using monoclonal antibodies. *Doctoral Dissertation.* Hangzhou :Zhejiang University.]

赵伟春, 程家安, 陈正贤, 2002. 褐飞虱抗原检测最佳 ELISA 条件的建立. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 28(6): 629−634.

[Zhao WC, Cheng JA, Chen ZX, 2002. Calibration of a suitable enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Nilaparvata lugens (stl) antigen detection. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 28(6): 629-634.]

赵伟春, 程家安, 张文俊, 2005. 应用单克隆抗体评价拟环纹豹蛛对褐飞虱的控制作用. 生态学报, 25(1): 78−82. [Zhao WC, Cheng JA, Zhang WJ, 2005. Evaluation of the control effects of Pardosa pseudoannulata on Nilaparvata lugens (st(a)l) with a monoclonal antibody. *Acta Ecologica Sinica*, 25(1): 78-82.]

张古忍, 古德祥, 张文庆, 1996. 酶联免疫吸附试验在捕食作用研究中的方法与应用. 中国生物防治, 12(1): 33−38.[Zhang GR, Gu DX, Zhang WQ, 1996. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)and its application in predation studies. *Chinese Journal of Biological Control*, 12(1): 33−38.]

张古忍, 张文庆, 古德祥, 1997. 用 ELISA 研究稻田节肢类捕食者对稻飞虱的捕食作用. 昆虫学报, 40(2): 171−176.[Zhang GR, Zhang WQ, Gu DX, 1997. Application of ELISA method for determining control effects of predatory arthropods on rice planthoppers in rice field. *Acta Entomologica Sinica*, 40(2): 171−176.]

中国统一教育网, 2011. http://res.tongyi.com/resources/article/student/others/201103120133/g2/26.htm 2013 年 12 月 7 日查询.