

生物技术与方法

属级芯片筛查技术在马铃薯纺锤块茎类病毒属检测中的应用

张永江¹, 辛言言¹, 朱水芳¹, 邓丛良²

1 中国检验检疫科学研究院, 北京 100029

2 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 101312

张永江, 辛言言, 朱水芳, 等. 属级芯片筛查技术在马铃薯纺锤块茎类病毒属检测中的应用. 生物工程学报, 2014, 30(3): 514–523.

Zhang YJ, Xin YY, Zhu SF, et al. Application of screening microarray technology in genus level for detection of Pospiviroid. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 514–523.

摘要: 建立马铃薯纺锤块茎类病毒属 (Pospiviroid) 类病毒有效的芯片筛查技术, 对该属类病毒进行筛查。分析了该属类病毒序列, 得到 19 条具有属级鉴定特征的探针。这些探针符合 GC 含量在 40%与 60%之间、单个核苷酸含量不大于 50%、无多于 4 个核苷酸的连续重复及不形成多于 6 个核苷酸的发卡结构的标准; 将探针点制到玻璃片基上制备芯片。芯片探针有效性实验结果表明, 菊花矮化类病毒 (Chrysanthemum stunt viroid, CSVd) 及番茄雄性株类病毒 (Tomato planta macho viroid, TPMVd) 样品杂交可获得有效信号; 灵敏度实验结果表明, 该芯片可检测到 200 pg/μL 的总 RNA。该芯片可用于 Pospiviroid 类病毒的筛查。

关键词: 马铃薯纺锤块茎类病毒属, 属级探针, 芯片, 菊花矮化类病毒, 番茄雄性株类病毒

Application of screening microarray technology in genus level for detection of Pospiviroid

Yongjiang Zhang¹, Yanyan Xin¹, Shuifang Zhu¹, and Congliang Deng²

1 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China

2 Inspection and Quarantine Testing Center of Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 101312, China

Abstract: The aim was to establish an effective screening microarray at genus level for Pospiviroid. We analyzed

Received: July 4, 2013; **Accepted:** August 9, 2013

Supported by: National Department Public Benefit Research Foundation (No. 201110035).

Corresponding author: Shuifang Zhu. Tel/Fax: +86-10-64896608; E-mail: zhushf020420@gmail.com

受质检公益性行业科研专项 (No. 201110035) 资助。

nucleotide sequences from Pospiviroid viroid and designed 19 probes with genus identification characteristics. The standards of these probes included the characters of (i) a GC content between 40 and 60%, (ii) less than 50% of single nucleotide, (iii) less than 4 continuous mononucleotides, and (iv) less than 6 nucleotides in the inner hairpin. We synthesized microarrays by using these probes on glass slides. The validation results of microarray probes show effective signals from chrysanthemum stunt viroid and tomato planta macho viroid standard samples hybridization. The sensitivity results show that the microarray detected 200 pg/ μ L of total RNA. The microarray can be used to screen Pospiviroid viroid.

Keywords: Pospiviroid, genus level probe, microarray, chrysanthemum stunt viroid, tomato planta macho viroid

马铃薯纺锤块茎类病毒属 (Pospiviroid) 属于马铃薯纺锤块茎类病毒科 (Pospiviroidae), 根据国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 第九次分类报告, 该属包括菊花矮化类病毒 (Chrysanthemum stunt viroid, CSVd)、柑橘裂皮类病毒 (Citrus exocortis viroid, CEVd)、金鱼花潜隐类病毒 (Columnea latent viroid, CLVd)、血苋类病毒 1 (Iresine viroid 1, IrVd-1)、墨西哥心叶茄类病毒 (Mexican papita viroid, MPVd)、马铃薯纺锤块茎类病毒 (Potato spindle tuber viroid, PSTVd)、辣椒小果类病毒 (Pepper chat fruit viroid, PCFVd)、番茄顶缩类病毒 (Tomato apical stunt viroid, TASVd)、番茄褪绿矮缩类病毒 (Tomato chlorotic dwarf viroid, TCDVd) 及番茄雄性株类病毒 (Tomato planta macho viroid, TPMVd) 等 10 种类病毒^[1]。该属类病毒可侵染马铃薯、番茄、菊花及柑橘等多种重要的经济作物, 并可通过种子及苗木迅速扩散传播, 进而导致严重的经济损失^[2-6]。近年来, 该属新的类病毒种不断被鉴定, 从 2007 年的 8 种 (CSVd、CEVd、CLVd、IrVd-1、MPVd、PSTVd、TASVd 和 TCDVd) 增加到 2011 年的 10 种 (新增 PCFVd 和 TPMVd); 新的寄主也不断被报道, 如 TASVd 在 2010–2012 年间报道的新增寄主就

有蓝花茄 *Lycianthes rantonnetii*、扭管花 *Streptosolen jamesonii*、木曼陀罗属 *Brugmansia* sp.、素馨叶白英 *Solanum jasminoides* 及夜香树属 *Cestrum* sp. 等^[7-9]; 新发生的国家和地区也不断增加, 如 TASVd 的分布已从 2003 年首次报道的突尼斯迅速扩散到了目前的奥地利、芬兰、印度尼西亚、以色列、意大利、科特迪瓦、塞内加尔、荷兰、比利时、德国、法国及斯洛文尼亚^[10-12]等国家。上述 3 种“新”情况表明, 该属类病毒发现及传播扩散速度较以往大大增加, 因而马铃薯等相关产业所面临的危险也将大大增加。为了尽早检测到植物中的类病毒, 防止其传播扩散, 需要有效的技术来作为支撑。

现有的检测方法如指示植物法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法、核酸斑点杂交法及 RT-PCR 法等都是针对该属特定类病毒种的特异性检测技术, 在上述 3 种“新”情况下, 这些特异性检测技术将会延缓发现新类病毒的速度, 也会增大检测的强度; 同时, 很多寄主受侵染后会无症状表现, 增加了特异性检测的难度, 漏检的可能性非常大。为了解决这个问题, 可以采用广谱性筛查技术。广谱性筛查技术 (Broad spectrum screening techniques, BSST) 是目前流行的一类技术, 如用于免疫学检测的属级抗体技术、用于分子生物学检测的科或属级引物及属级兼容

性探针芯片技术等。这类技术往往具备某类病原物较高分类单元上的鉴定特征，因而具有较高的兼容性，可以对科或属中变异大且变异位点多的病原物进行鉴定；特别是对于科或属内可能出现的新种，具有较强的发现能力；同时，这类技术具有高通量的特点，一次样品反应可检测到科或属内已知和未知的病原物；这些特点使得该类技术可以大大提高新发病原体预报式筛查的效率，从而提前发现可能的危险性病原物，如 Zhang 等^[13]建立的植物病毒属级寡核苷酸芯片可以有效筛查到样品中的新病毒，表明了这类筛查技术的实用性。

为了弥补目前特异性检测技术的不足，提高 3 种“新”情况下筛查马铃薯纺锤块茎类病毒属类病毒的能力，本文开展了该属筛查芯片技术的研究，着重解决具备属级鉴定特征芯片探针的获得及其有效性验证的问题，初步建立了该类病毒属属级水平上的筛查芯片体系。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

CSVd 及 TPMVd 阳性材料来自美国 ATCC (ATCC-PV-105, ATCC-45052)。

9N 随机引物为 Invitrogen 公司产品；纳米磁珠检测试剂盒来源由北京出入境检验检疫局

植物实验室提供；*ExTaq* DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶、dNTPs、RNasin 为大连 TaKaRa 公司产品；CbcScript 酶为 AMBION 公司产品；RNA 及 DNA 纯化试剂盒购自 MN 公司。

1.2 RT-PCR 反应

根据 NCBI 中发表的序列，分别设计 CSVd 及 TPMVd 的种简并性全长扩增引物如表 1。

总 RNA 提取：称取 100 mg 样品置于研钵中，加入适量的研磨液，用研磨棒充分研磨，使样品均匀分散。将研磨后的样品转入离心管，5 000 r/min 离心 5 min。取 100 μ L 离心上清于 1.5 mL 离心管中，再加入适量纳米磁珠和 1 倍体积的结合液，上下颠倒充分混匀，室温放置 5 min。磁分离后弃上清，用 200 μ L 清洗液清洗 2–5 次。加入 50 μ L 洗脱液，缓慢抽吸均匀，室温放置 2–5 min 后，磁分离，小心吸取上清液至新的离心管中进行下游实验。

反转录：体系 20 μ L，DEPC-H₂O 10 μ L、dNTPs 1 μ L、下游引物 2 μ L (20 μ mol/L)、RNA 模板 1 μ L (200 ng/ μ L)；70 $^{\circ}$ C 反应 5 min，冰上放置 5 min 加入 M-MLV 酶 5 \times 缓冲液 4 μ L、M-MLV 酶 1 μ L、RNA 酶抑制剂 1 μ L，42 $^{\circ}$ C 反应 1 h。

PCR 扩增：即在 0.2 mL 的反应管中加入 cDNA 产物 2 μ L、上游引物 0.5 μ L (20 μ mol/L)、下游引物 0.5 μ L (20 μ mol/L)、dNTPs 0.5 μ L、*Taq*

表 1 CSVd 和 TPMVd RT-PCR 引物

Table 1 Primers used for RT-PCR of CSVd and TPMVd

Primers name	Primers sequences (5'–3')	Length (bp)	Protocols
CSVdf	CGGGACTTACTTGTGGTTCC	354	94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 55 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 30 s, 30 cycles; 72 $^{\circ}$ C, 8 min
CSVdr	AGGGAACAAAATAAGGTTCCAC		
45052f	GGATCCCCGGGAAACCT	360	94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 58 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 30 s, 30 cycles; 72 $^{\circ}$ C, 8 min
45052r	CTGAAGCGCTCCTTTGGC		

酶 0.5 μL 、PCR 缓冲液 2 μL 及 DEPC- H_2O 14 μL ，然后按照 PCR 反应程序进行扩增，产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 芯片体系

探针设计步骤如下：

1) 从美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 及国际病毒学分类委员会 (ICTV) 数据库下载类病毒属全基因组及核酸序列数据。

2) 分别使用类病毒全基因组序列和全部核酸序列设计探针。使用全部核酸序列时需进行筛选，去除小于 250 bp 长度的核酸序列。并使用 NCBI 的 BLASTN 对核酸序列去冗余，即如果某核酸序列 90% 以上长度与其他序列有 95% 相似度，则删除此序列。

3) 从 NCBI RefSeq 数据库下载全部植物 mRNA 序列数据、全部植物病毒基因组序列数据，作为探针设计的特异性数据库。

4) 使用 BLASTN 联配类病毒属内序列，以 5 个碱基作为间隔，连续提取所有 40 bp 的核酸序列，对选取的核酸序列进行筛选，标准为 GC 含量在 40% 与 60% 之间、单个核苷酸含量不大于 50%、没有多于 4 个核苷酸的连续重复及不形成多于 6 个核苷酸的发卡结构。

5) 使用 BLASTN 将通过步骤 4) 筛选的序列与步骤 3) 得到的特异性数据库以及非此类病毒属的其他所有植物类病毒核酸序列进行特异性比对，筛选标准为联配序列长度乘以相似性小于 25 bp，并且无 20 bp 以上的完全吻合序列匹配。

6) 使用 BLASTN 将通过步骤 5) 筛选的探针序列与本类病毒属的所有类病毒序列进行比对，比对标准为联配序列长度乘以相似性大于 34 bp，且有连续 15 bp 的序列匹配。满足此标准的序列，即为可以检测到相应类病毒的探针。

7) 使用维也纳大学理论化学研究所 (Institute for Theoretical Chemistry, University of Vienna) 开发的 RNACofold 程序计算探针与相应类病毒序列结合的自由能及自身形成 RNA 二级结构的自由能。

8) 将步骤 5) 得到的探针序列进行排序，排序标准依次为探针对本类病毒属所有类病毒的覆盖率、探针与本类病毒属序列结合总自由能、探针与本类病毒属病毒序列结合总相似度、探针与特异性数据库非特异结合相似度及探针形成自身 RNA 二级结构自由能。

9) 将步骤 5) 得到的探针去冗余，去掉重复探针，使得探针之间最大重复长度不超过 25 bp。重复的探针依步骤 8) 的标准排序，只保留最佳的探针。此步骤得到的探针即为非重复的特异性探针。

10) 按步骤 8) 的标准对步骤 9) 得到的探针进行排序，依排序结果依次选择探针，使本类病毒属每个类病毒序列至少有 3 个探针对应。选择时，如果某些类病毒序列已经达到 3 个探针对应，则对其他未被选择的探针的排序，优先考虑对其他未达到 3 个探针对应的类病毒序列的覆盖率，之后再按照步骤 8) 的标准进行排序。如果经过步骤 9) 无法达到本类病毒属每个类病毒序列至少 3 个探针对应的标准，则在步骤 3) 降低序列保守性标准，重新设计，依此循环直到所有类病毒序列都有 3 个探针对应。如果无法从保守区域设计探针，或类病毒属内序列无保守区域，则使用所有类病毒序列全长序列设计探针。探针设计标准与步骤 4) 到步骤 9) 相同。

样品标记、芯片杂交与洗涤方法均按照文献 [14] 的方法进行。芯片数据分析时，探针的信号值为探针前景值的中位值减去背景值的中位值。信噪比为图像对应点内所有信号值的中位

值与背景值中位值的比值。样品中若至少一条探针的信号值 ≥ 600 且信噪比 ≥ 3 , 判为阳性 (为 Pospiviroid 类病毒侵染); 探针的信号值 < 600 且信噪比 < 2 , 判为阴性 (不为 Pospiviroid 类病毒侵染); 其余情况判为可疑, 需重复验证。

1.4 芯片探针有效性验证

分别取 CSVd 及 TPMVd 的 PCR 扩增产物按照 1.3 的方法进行标记、杂交及检测, 分析芯片探针的有效性。

1.5 芯片与 RT-PCR 灵敏度比较实验

将 CSVd 总 RNA (200 ng/ μ L) 进行 10 倍梯度稀释后用作模板, 分别按照 1.2 和 1.3 的方法

进行芯片与 RT-PCR 检测, 比较两者的灵敏度。

2 结果与分析

2.1 探针设计与芯片制备

采用生物信息学方法分析 Pospiviroid 类病毒的核苷酸序列, 根据设定的探针设计标准, 获得了 19 条 40 单体单元 (Monomeric unit, mer) 的属级鉴定特征的寡核苷酸探针 (表 2)。将寡核苷酸探针通过芯片点样仪点制到醛基基片上制备芯片。每条探针重复 5 次, 矩阵为 10×12 。芯片包括 4 个部分: 芯片固定阳性质控 Hex, 杂交阳性质控 PC, 杂交阴性质控 NC, 其他位点为检测探针 (图 1)。

表 2 寡核苷酸探针

Table 2 Nucleotide probes

Probes No.	Probes sequences (5'-3')
1	CGCTCTGGCTACTACCCGGTGGAAACAACCTGTAGCTTGAA
2	TCTTTGTTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCGTGGAAC
3	TTCTCTCTGGAGACTACCCGGTGGACACTACTGAAGCTTT
4	CCTGGTTGAGACAGGAGTAATCCCAGCTGAAACAGGGTTT
5	AACAGGACCTGGTGTCTTTCCTTTTCGCTGCTGGCTCCACA
6	TCGCCCGGAGCTTCTCTGTGCTTAATAGCCGGTGGATAACA
7	CGACCGGTGGCATCACCGAGTTTCGCTCAAACCTCAATCT
8	ACCTTCTTTAGCACCCGGGCCAGGGAGTTAGCCCTTGGAAC
9	TCCTGGAGAGGTCTTCTGCCCTAGCCCGGTCTTCGAAGCT
10	GGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTTCAGATAGGAGT
11	AAAGACCGGAGAACTCCACGCGGCGGAAGAAACAGGAGCT
12	CCCTGTACACACCCGCCGTCACACCCTGGGAATAGGTTTC
13	TCAGCATGCCGCGGTGAATATGTACCCGGGCCCTGTACAC
14	GTTTCGCCCCGAAGCATCGGACCAATGATCACCCATGACTT
15	AGAACGGGAGAAGAAAGAGCAAGAGCGGTCTCAGGAGCCC
16	TCTCGTGGTCGAGGGCGTTTCGGATCATTCCAGACAGGTGT
17	AAAGCCGGTCTCGGGAGCTTCACTTGGTTCCACCCGGTAA
18	TTTCTTCGGGTTTCTTCTCAGTCGACCCGACCCGCGTCG
19	CCACAGGTACCACGAGTTTAGTTCCGAGGAACCTCTGCGG

| Hex |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| PC | PC | PC | PC | PC | NC | NC | NC | NC | NC | NC |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |
| 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | Hex | Hex | Hex | Hex | Hex | Hex |

图1 芯片矩阵图 (10×12)

Fig. 1 Microarray construction (10×12).

2.2 探针有效性验证

应用 CSVd 及 TPMVd 的样品对芯片探针进行验证, 杂交结果如图 2 及图 3 所示。图 2 中 1#、3#、9#探针及图 3 中 1#、3#、4#、18#探针的信号值均大于 600, 信噪比均大于 3, 达到阳性结果判定的标准, 说明本研究建立的芯片杂交体系能够在样品检测中获得有效的探针信号点, 可以对样品中是否含有该属类病毒进行判断。图 2 中的 8#探针虽然具有肉眼可见的信号, 且其信噪比大于 3, 但由于其信号值小于 600, 因而判为可疑点, 在实际样品检测时需进行重复检测 (表 3)。

2.3 芯片灵敏度检测结果

CSVd 总 RNA 按 10^1 、 10^2 及 10^3 梯度稀释后进行 cDNA 合成、Klenow 酶标记和杂交, 反应结束后对芯片进行洗涤扫描。结果如图 4 所示, 其中对照 Hex、PC 和 NC 杂交符合预期效果; 而样品杂交结果则随着稀释梯度的增大, 探针信号强度越来越小; 10^3 稀释梯度仅有 9 号探针信号达到阳性探针判断的标准, 因此所建立的芯片的灵敏度阈值大约是 10^3 。具体阳性探

针信号值及信噪比见表 4。

2.4 RT-PCR 灵敏度检测结果

CSVd 总 RNA 按 10^0 、 10^1 、 10^2 及 10^3 梯度稀释后进行 RT-PCR 检测, 电泳结果表明可从阳性材料中扩增出约 354 bp 的特异性目标条带。随着总 RNA 稀释倍数的增大, 可以观察到明显的浓度梯度谱带, 稀释梯度限点为 10^3 (图 5)。

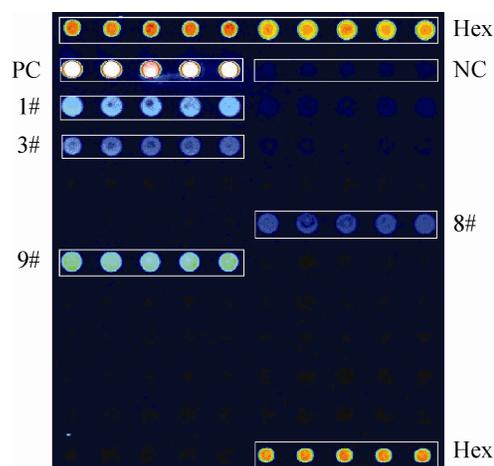


图2 菊花矮化类病毒样品杂交
Fig. 2 Hybridization using CSVd.

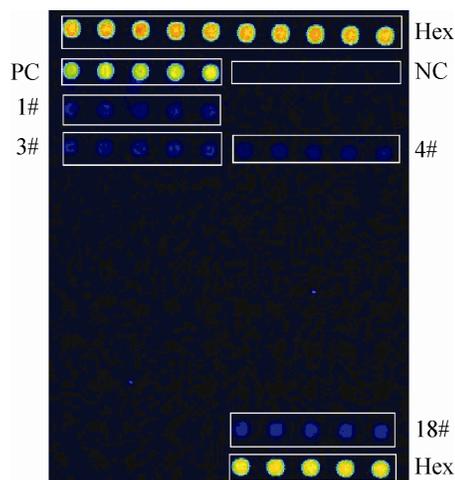


图3 番茄雄性株类病毒样品杂交
Fig. 3 Hybridization using TPMVd.

表 3 芯片探针有效性验证结果

Table 3 Results of microarray probes efficiency validation

Virus species	CSVd				TPMVd			
Probe No.	1#	3#	8#	9#	1#	3#	4#	18#
Probe signal intensity	3 823	2 008	580	5 285	1 600	1 792	1 556	3 472
Probe signal-to-noise ratio	13	8	3	19	6	7	7	14
Results	+	+	+/-	+	+	+	+	+

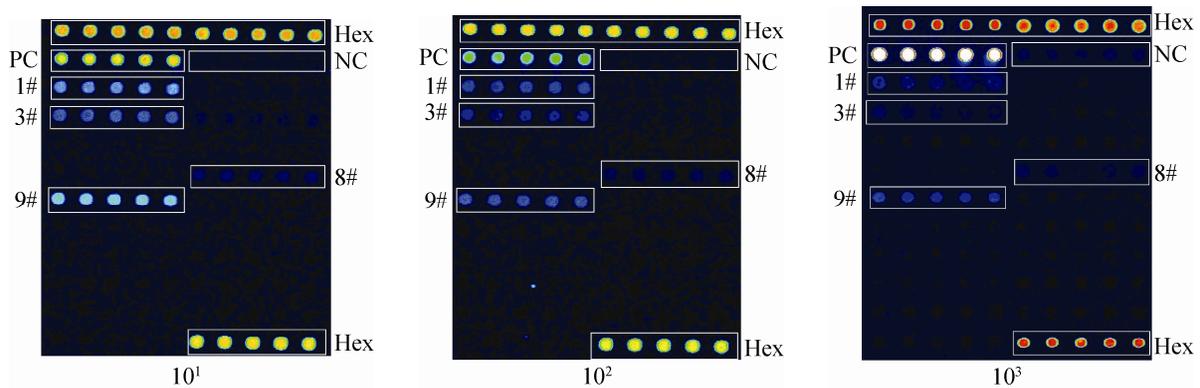


图 4 芯片灵敏度结果

Fig. 4 Sensitivity test of microarray.

表 4 芯片灵敏度结果

Table 4 Results of microarray sensitivity

RNA dilutions	10^1				10^2				10^3
Probe No.	1#	3#	8#	9#	1#	3#	8#	9#	9#
Probe signal intensity	9 447	5 796	1 093	16 571	3 107	1 889	769	5 258	719
Probe signal-to-noise ratio	27	16	5	50	29	21	12	75	13
Results	+	+	+	+	+	+	+	+	+

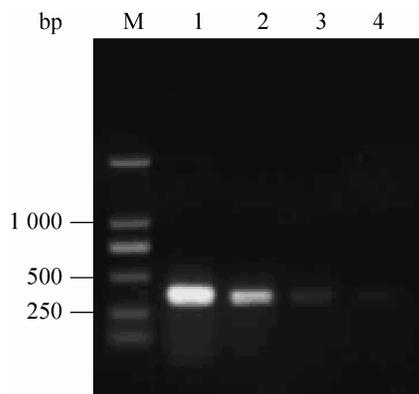


图 5 RT-PCR 灵敏度检测结果

Fig. 5 Sensitivity test of RT-PCR. 1: 10^0 dilution; 2: 10^1 dilution; 3: 10^2 dilution; 4: 10^3 dilution; M: marker DL2000.

3 讨论

足够量的标记产物是芯片杂交时获得足够强度杂交信号的重要环节。选择何种标记策略，需要根据样品中病原物含量的多寡及病原物基因组二级结构的复杂程度等因素来确定，目前主要有 3 种标记方式：随机引物反转录获得标记的 cDNA 作为标记产物；随机引物反转录后特异性引物 PCR 获得标记的 PCR 产物作为标记产物；特异性引物 RT-PCR 获得标记的 PCR 产物作为标记产物^[14]。其中以第一种标记方式为

最好,可以使芯片具有更强的实用性。为此,本文最初采用第一种标记策略来获取标记产物,但得到的产物与芯片杂交后没有获得杂交信号(结果未显示),这种状况与的研究结果相同^[15],可能是类病毒基因组复杂的二级结构所致。由于本研究的重点在于验证所获得的属级探针的有效性,故在后续的实验采用了特异性引物扩增来获得标记产物的策略;为了增加芯片的实用性,需要进一步研究更简便有效的标记方式。

芯片灵敏度的高低决定了芯片在实际应用中的效果。一般情况下,对于同一种样品,RT-PCR的检测灵敏度要高于芯片检测灵敏度;也有两者持平的情况;甚至后者高于前者的情况^[16-17],这种情况的影响因素较多,比如琼脂糖凝胶电泳检测中凝胶的厚度、电泳缓冲液的新鲜程度或电泳电压的高低等都可能影响到PCR的检测灵敏度,使其检测的灵敏度要比理论上的灵敏度低。在本文中,因为使用的是类病毒种的简并引物,获得的PCR产物的特异性要比随机引物或科属简并引物获得的PCR产物剪剪性强,产物量也大,与芯片杂交时获得的杂交信号的质量就高,信号就强,两者的检测灵敏度持平,均可检测到 10^{-3} 稀释梯度的样品总RNA。对于特异性检测芯片来说,其特异性与灵敏度一样,也是建立有效芯片检测技术的重要一面。不过,因为本文建立的芯片是广谱性的筛查芯片,而非特异性的检测芯片,因此,信号点的探针对应的类病毒种类不一定绝对是探针序列来源的类病毒种类;是何种类病毒最终要由序列测定来确定。所以,本文没有应用其他属的类病毒进行芯片的特异性研究,这并不影响该技术的建立和使用。

目前对于 Pospiviroid 类病毒的检测方法有生物学测定^[18]、聚丙烯酰胺凝胶电泳^[19]、Northern 杂交^[20-21]、RT-PCR^[22-24]及 RT-PCR-ELISA^[25]等,这些方法适用于样品中已知类病毒的特异性检测,对于潜在的未知类病毒则无法进行有效检测;且一次反应最多检测几种类病毒。下一代测序技术(Next generation sequencing technologies, NGST)的发展为潜在未知类病毒的有效检测提供了一个选择。通过小RNA库的构建及深度测序,NGST可以鉴定样品中已知和未知的类病毒种类。Li等应用小RNA深度测序技术分析了受感染的番茄样品,发现其中感染了马铃薯纺锤块茎类病毒、柏平缕瓜花叶病毒和一种新的马铃薯Y病毒属病毒^[26]。不过,NGST费用昂贵、数据量庞大且分析复杂。为了弥补上述技术的缺陷,本研究根据 Pospiviroid 类病毒的序列设计了19条40mer的具有该属鉴定特征的探针,制备相应芯片后以CSVd及TPMVd样品进行验证,结果表明探针剪剪性良好,具有较高的灵敏度,初步建立了 Pospiviroid 芯片筛查技术,为该属类病毒的筛查探索了一种有效和有前景的技术体系;对今后在植物类病毒的检测鉴定中应用广谱筛查技术作为快速和高通量筛查方法具有借鉴意义。

REFERENCES

- [1] King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, et al. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2011.
- [2] Pfannenstiel MA, Slack SA. Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid. *Phytopathology*, 1980, 70(9): 922-926.
- [3] Cho WK, Jo Y, Jo KM, et al. A current overview of

- two viroids that infect chrysanthemums: Chrysanthemum stunt viroid and Chrysanthemum chlorotic mottle viroid. *Viruses-Basel*, 2013, 5(4): 1099–1113.
- [4] Batuman O, Gilbertson RL. First report of Columnea latent viroid (CLVd) in tomato in mali. *Plant Dis*, 2013, 97(5): 692.
- [5] Verhoeven JT, Roenhorst JW, Owens RA. Mexican papita viroid and tomato planta macho viroid belong to a single species in the genus Pospiviroid. *Arch Virol*, 2011, 156(8): 1433–1437.
- [6] Chung BN, Pak HS. Seed Transmission of Chrysanthemum stunt viroid in *Chrysanthemum*. *Plant Pathol J*, 2008, 24(1): 1–35.
- [7] Verhoeven JThJ, Botermans M, Jansen CCC, et al. First report of tomato apical stunt viroid in the symptomless hosts *Lycianthes rantonnetii* and *Streptosolen jamesonii* in the Netherlands. *Plant Dis*, 2010, 94(6): 791.
- [8] Olivier E, Demonty J, Govers K, et al. First report of a *Brugmansia* sp. infected by tomato apical stunt viroid in Belgium. *Plant Dis*, 2011, 95(4): 495.
- [9] 北美植物保护组织植物检疫预警系统番茄顶缩类病毒[EB/OL]. [2013-08-06]. <http://www.pestalert.org/viewNewsAlert.cfm?naid=60&keyword=Tomato%20apical%20stunt%20viroid> (in Chinese).
- [10] 欧洲植物保护组织植物检疫番茄顶缩类病毒[EB/OL]. [2013-08-06]. http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/viruses/TASVD0.htm (in Chinese).
- [11] Gausgruber-Gröger S, Gottsberger RA. First report of tomato apical stunt viroid and Chrysanthemum stunt viroid in *Solanum jasminoides* in Austria. *New Disease Reports*, 2011, 24: 4.
- [12] Viršček Marn M, Mavrič Pleško I. First report of tomato apical stunt viroid in *Solanum jasminoides* in Slovenia. *New Disease Reports*, 2012, 26: 7.
- [13] Zhang YJ, Yin J, Li GF, et al. Oligonucleotide microarray with a minimal number of probes for the detection and identification of thirteen genera of plant viruses. *J Virol Methods*, 2010, 167: 53–60.
- [14] Zhang YJ, Xin YY, Zhu SF, et al. Establishment of the screening oligonucleotide microarray of Apscaviroid in genus level. *Biotechnol Bull*, 2013, 2: 151–156 (in Chinese).
张永江, 辛言言, 朱水芳, 等. 苹果锈果类病毒属属级寡核苷酸芯片筛查方法的建立. *生物技术通报*, 2013, 2: 151–156.
- [15] 类病毒芯片检测 [EB/OL]. [2013-07-24]. <http://cost853.acw-online.ch/pdf-files/spain%20meeting/Posters/Tomlinson%20mircoarray%20v2.pdf> (in Chinese).
- [16] Shi FY, Miao JK, Zhang LP, et al. Detection of bovine, goat, pig and chicken derived ingredients in animal products with universal PCR-microarray method. *Chin J Biotech*, 2010, 26(6): 823–829 (in Chinese).
石丰运, 缪建锟, 张利平, 等. 运用基因芯片技术检测牛、山羊、猪和鸡源性成分. *生物工程学报*, 2010, 26(6): 823–829.
- [17] Zhai JH, Song YJ, Du ZM, et al. Study on universal microarray system for detection of common clinical infectious bacteria. *Chin J Public Health*, 2003, 19(4): 430–431 (in Chinese).
翟俊辉, 宋亚军, 杜宗敏, 等. 通用基因芯片检测感染性细菌方法的研究. *中国公共卫生*, 2003, 19(4): 430–431.
- [18] Lü DQ. Detection and control of potato spindle tuber disease. *Chin Potato J*, 2005, 19(6): 361–365 (in Chinese).
吕典秋. 马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的检测与防治研究进展. *中国马铃薯*, 2005, 19(6): 361–365.
- [19] Lü DQ, Li XZ, Bai YJ, et al. Application of NASH and R-PAGE techniques to the detection of potato viroid. *J Northeast Agricul Univ*, 2003, 34(1): 15–18 (in Chinese).
吕典秋, 李学湛, 白艳菊, 等. NASH 技术和 R-PAGE 技术在马铃薯类病毒检测上的应用. *东北农业大学学报*, 2003, 34(1): 15–18.
- [20] Antignus Y, Lachman O, Pearlsman M. The spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed

- transmission and bumble bee activity. *Plant Dis*, 2007, 91(1): 47–50.
- [21] Cohen O, Batuman O, Stanbekova G, et al. Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. *Virus Genes*, 2006, 33(3): 287–292.
- [22] Ragozzino E, Faggioli F, Barba M. Development of a one tube-one step RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: Apscaviroid, Hostuviroid, Pelamoviroid and Pospiviroid. *J Virol Methods*, 2004, 121: 25–29.
- [23] Wang XF, Zhou CY, Tang KZ, et al. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *Eur J Plant Pathol*, 2009, 124: 175–180.
- [24] Verhoeven JThJ, Botermans M, Meeke ETM, et al. Tomato apical stunt viroid in the Netherlands: most prevalent pospiviroid in ornamentals and first outbreak in tomatoes. *Eur J Plant Pathol*, 2012, 133: 803–810.
- [25] Shamloul AM, Faggioli F, Keith JM, et al. A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: Apscaviroid, Hosuviroid, Pelamoviroid, and Pospiviroid. *J Virol Methods*, 2002, 105: 115–121.
- [26] Li R, Gao S, Hernandez AG, et al. Deep sequencing of small RNAs in tomato for virus and viroid identification and strain differentiation. *PLoS ONE*, 2012, 7: e37127.

(本文责编 陈宏宇)



科学出版社书讯



作者：《新生物学年鉴 2013》编委会

定价：118 元

装帧：圆脊精装 页码：324

初版时间：2014 年 1 月 1 日

内容介绍

《新生物学年鉴 2013》为一本由《新生物学丛书》10 位编委组稿并把关、各地大学及研究所骨干研究人员撰写，反映近年来分子生物学、生物化学、细胞生物学等最前沿领域的 10 篇文章组成的文集。这些文章的内容均为撰写者的最新研究成果，因此年鉴可以在一定程度上体现出我国生物学领域的发展现状。去年的《新生物学年鉴 2012》在社会上引起了较好的反响。今年的《年鉴 2013》秉承了去年的制作理念，并扩充了涉及的生物学子学科，有更多的中国生物学研究领域的中坚力量参与撰写，务求使相关领域的研究人员获得第一手权威的综述性文章。

订购方式 1: 网上购书

淘宝商城科学出版社旗舰店: <http://kxcbs.tmall.com/>

卓越亚马逊: <http://www.amazon.cn/>; 当当网: <http://www.dangdang.com/>; 京东图书: <http://book.360buy.com/>

订购方式 2: 电话购书

联系人: 科学出版社 贾海涛 13501022258 010-64017321

订购方式 3: 邮件购书

生物分社: lifescience@mail.sciencep.com; 贾海涛: jiahaitao@mail.sciencep.com