

马铃薯类病毒 dDNA 双体探针的研制及其在检测上的应用

吕典秋*, 邱彩玲, 王绍鹏, 李 勇, 高云飞

(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心, 哈尔滨 150086)

摘 要: 在马铃薯纺锤块茎类病毒 (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) 基因组中 *Bam*H 位点处 (87~92 nt), 设计两对含有 *Bam*H 重叠区 (overlap) 的引物。将 PCR 扩增获得的全长 PSTVd 分别插入到 pGM-T 载体中。通过 *Bam*H 位点, 将两个 PSTVd 单体连接, 构建了 PSTVd 双载体。以此载体为模板, 通过 PCR 标记技术, 制备了高灵敏高专化的 PSTVd 双体 dDNA 地高辛标记探针。以 CDP-Star 为反应底物进行化学发光反应结果判读, 建立了 PSTVd 的高效杂交检测体系。该体系可以对马铃薯薯块、叶片、芽等不同组织样品进行检测, 检测灵敏度达到 0.05 pg。通过对 67 份田间采集的样品和实验室保存的资源材料进行检测, 比较了 dDNA 双体探针核酸斑点杂交技术 (nucleic acid spot hybridization, NASH)、反转录聚合酶链式反应 (reverse-transcriptional polymerase chain reaction, RT-PCR) 和往返一聚丙烯酰胺凝胶电泳 (return-polyacrylamide gel electrophoresis, R-PAGE) 检测技术的阳性样品检出率, 结果显示, NASH 技术阳性样品检出率为 67.7%, 与 RT-PCR 相一致, 高于 R-PAGE 技术的阳性检测率 (53.7%)。

关键词: 马铃薯; 马铃薯纺锤块茎类病毒; 探针; 双体; 核酸斑点杂交

中图分类号: S 532 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 10-1538-07

Development of dDNA Dimeric Probes and Its Application in Diagnosis of Potato spindle tuber viroid

LÜ Dian-qiú*, QIU Cai-ling, WANG Shao-peng, LI Yong, and GAO Yun-fei

(Virus-free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Supervision and Testing Center for Virus-free Potato Seeds of Ministry of Agriculture, Harbin 150086, China)

Abstract: Two PCR amplifying full-length PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) with the *Bam*H (87 - 92 nt) overlap were linked to pGM-T to construct the recombinant vector containing dimeric PSTVd dDNA. Highly sensitive and specific dimeric probe labeled with digoxin was produced with PCR amplification. An efficient hybridization system was established by with the substrate of CDP-star in this study. The minimum concentration of PSTVd detected by this probe was 0.05 pg. The samples prepared from leaves, tubers and sprouts could be detected successfully. Compared the positive sample percentage detected from potato fields and conserved potato resource of plantlets in vitro with RT-PCR (reverse-transcriptional polymerase chain reaction) and R-PAGE (return-polyacrylamide gel electrophoresis), NASH (nucleic acid spot hybridization) could give the same positive sample percentage as RT-PCR did (67.7%), but was higher than R-PAGE (53.7%).

Key words: potato; *Potato spindle tuber viroid*; PSTVd; probe; dimeric PSTVd; nucleic acid spot hybridization (NASH)

收稿日期: 2009 - 04 - 18; 修回日期: 2009 - 07 - 06

基金项目: 国家科技部基础研究重大项目 (2004ccc02900); 黑龙江省科技攻关重大项目 (GA08B102); 黑龙江省青年基金项目 (QC03c05)

* E-mail: snalpatoes@126.com

类病毒 (viroid) 是已知最小的 (246 ~ 475 nt) 能够在寄主体内进行自我复制的单链闭合环状 RNA。类病毒不编码蛋白, 具有广泛的传播途径和寄主范围。马铃薯纺锤块茎类病毒 (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) 是发现最早的一种类病毒, 严重危害我国及世界众多国家马铃薯的产量和品质。目前尚无有效的脱毒方法将类病毒从植物体内汰除。在生产中, 通常是通过对种薯的严格检测, 筛选健康无类病毒的种苗进行种薯生产, 从而实现控制 PSTVd 危害的目的。在我国, PSTVd 的检测主要是利用往返一聚丙烯酰胺凝胶电泳 (R-PAGE) 技术。但 R-PAGE 操作复杂, 检测灵敏度不高, 很难在种薯质量检验方面得到普及。随着分子生物学技术的发展, RT-PCR 已应用于 PSTVd 检测中 (Ragozzino et al, 2004; Bemad & Duran-Vila, 2006; Ryoji & Masaaki, 2006; Singh et al, 2006)。Owen 等 (1981) 利用放射性 α DNA 探针在硝酸纤维素膜上进行类病毒检测。Salazar 等 (1988) 利用切口平移、M13 引物扩增和 RNA 转录标记等方法制备了 32 P 放射性 ssDNA (+)、ssDNA (-)、 α DNA 和 ssRNA 探针, 在硝酸纤维素膜上进行 PSTVd 检测, 比较了不同探针的检测灵敏度。但放射性标记探针存在对人体的危害, 操作不方便等问题, 限制了该技术在日常检测工作中的应用。不同的非放射性标记得到越来越广泛的应用, 其中最多的为生物素、地高辛和荧光素标记探针 (Hoppe et al, 1988; Podleckis et al, 1993; Maria et al, 1996; Du et al, 2007)。由于 RNA 探针通常比 DNA 探针灵敏度更高, 因此国外种薯类病毒检测主要利用 RNA 探针。但 RNA 探针存在易降解的缺点, 在操作中带来诸多不便。

本研究的目的是为了利用 DNA 探针稳定性好的优点, 通过适当延长探针长度, 制备 PSTVd 双体 α DNA 探针, 提高探针的检测灵敏度, 以期建立准确、高效的核酸杂交反应体系, 应用于日常检测工作中。

1 材料与方法

1.1 材料及引物设计

马铃薯 PSTVd 阳性和阴性对照样品保存于农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心 (哈尔滨) 试验温室。待测的马铃薯样品分别采自黑龙江省克山农场、讷河第四良种场和巴彦红光乡、泰康宏伟乡、哈尔滨红旗乡马铃薯商品薯田。试管苗资源材料来自黑龙江省马铃薯工程技术研究中心品种资源库。

试剂 Dig-dUTP、CDP-Star, 购自 Roche 公司; *Taq* 酶、pGM-T 载体、M-MLV 反转录酶, 购自 Tiangen 公司; T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶, 购自大连宝生物公司; 引物由北京三博公司合成; 尼龙膜, 购自北京美莱博公司; 常规试剂为进口分析纯。

根据已发表的 PSTVd 序列 (Lu et al, 2005) 设计引物。以 PSTVd 序列中 87 ~ 92 位置上的 *Bam*H 酶切位点向两侧设计两对引物 (PC0054/PC0055 和 PC0056/PC0057) (引物序列见表 1), 分别向两侧扩增。两对引物扩增产物均含有一个共同的 *Bam*H 的重叠区 (overlap), 通过此区域进行连接, 构成类病毒双体。根据插入类病毒双体的 pGM-T 载体两侧的序列设计引物 PSTVd-D (L) 和 PSTVd-D (R) (引物序列见表 1)。利用 PCR 扩增, 制备 PSTVd 双体 α DNA 探针。

1.2 载体构建

以类病毒阳性样品的总核酸样品为模板, 利用 PC0054、PH0055 两对引物, 通过 RT-PCR 反应进行扩增, 扩增产物特异性带进行回收, 连接到 pGM-T 载体中, 然后利用 *Bam*H /*Sac* 双酶切鉴定插入情况, 重组载体命名为 pGM-T-PSTVd-M₁。以 PC0056、PH0057 两对引物进行 RT-PCR 扩增, 产物回收后连接到 pGM-T 载体中, 进行 *Xba* /*Bam*H 双酶切鉴定, 筛选反向插入的阳性克隆并命名为: pGM-T-PSTVd-M₂。用 *Bam*H /*Sac* 双酶切 pGM-T-PSTVd-M₂ 重组质粒, 将特异的酶切片段连接到 *Bam*H /*Sac* 双酶切的 pGM-T-PSTVd-M₁ 载体上, 构建 PSTVd 双体载体。通过 *Xba* /*Sac* 双酶切

鉴定筛选 PSTV d双载体。重组载体命名为 pGM-T-PSTV dM_d。

表 1 构建 PSTVd双载体及制备探针 PCR引物
Table 1 The PCR primers for dimeric dDNA recombinant vector and probe

引物名称 Primer	引物序列 Sequence	极性 Polarity	碱基数 /bp Number of bases	扩增产物 /bp Fragment	引物位置 Position in genome/vector
PC0054	5' <u>GGA TCC</u> CTGAA GCGCTCCTCCGAGCCG 3' (<i>Bam</i> H)	Antisense	27	359	PSTV d (92 ~ 66 nt)
PH0055	5' <u>gagc</u> CCCCGGGAAACCTGGAG CGA ACT GG 3' (<i>Sac</i>)	Sense	31		PSTV d (93 ~ 116 nt)
PC0056	5' <u>ctc</u> taGATCCCTGAA GCGCTCCTCCGAGCCG 3' (<i>Xba</i>)	Antisense	29	364	PSTV d (91 ~ 66 nt)
PH0057	5' <u>GGA TCC</u> CCCCGGGAAACCTGGA GCGAAC 3' (<i>Bam</i> H)	Sense	27		PSTV d (87 ~ 113 nt)
PSTV d-D (L)	5' GCCGCGGGAA TTCAT 3'	Sense	16	757	pGM-T
PSTV d-D (R)	5' TCCAACGCGTTGGGAGC 3'	Antisense	17		pGM-T

1.3 探针标记

利用 PCR 方法，以 pGM-T-PSTV dM_d载体为模板，标记制备探针。标记体系为 10 ×PCR 缓冲液 2 μL，PSTV d-D (L) 和 PSTV d-D (R) 引物各 1 μL，Dig-dUTP 混合物 1 μL，Taq DNA 聚合酶 1 μL，含 PSTV d双载体 DNA 模板 1 μL，ddH₂O 13 μL。扩增程序为：94 2 min；94 30 s，55 30 s，72 30 s，30 个循环后 72 延伸 10 min。

1.4 核酸提取

为了研究不同样品提取方法对检测结果的影响，采取 3 种不同核酸提取方法。所有离心步骤均在 1.5 mL Eppendorf 管中进行。

(1) 试剂盒提取：使用市售的 RNAV_{zol} 进行提取，按照产品说明书进行。

(2) 酚 氯仿提取：取 0.5 g 样品，放于灭菌冷冻的小研钵中，分别加入 1 mL 样品提取缓冲液 (含有 1% 巯基乙醇，0.1 mol · L⁻¹ NaAc，pH 9.0，0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl，pH 8.0)、1 mL 水饱和酚和 1 mL 三氯甲烷，充分研磨，倒入 1.5 mL Eppendorf 管中。10 000 r · min⁻¹，4 离心 15 min。用移液器小心将上层含 RNA 的水相移入新管中。加入 3 倍体积的无水冷乙醇，1/10 体积的 3 mol · L⁻¹ 醋酸酸钠溶液 (pH 4.0)，混匀。-20 沉淀 1.5 h 以上。然后，10 000 r · min⁻¹，4 离心 15 min，弃掉上清液，用 1 mL 70% 乙醇洗沉淀，离心后再用吸头彻底吸弃遗留在管中的上清液，在自然条件下干燥沉淀。最后，溶于 50 μL DEPC 处理的水中。-20 贮存，备用。

(3) 核酸粗提取：将提取缓冲液 (含有 1% 巯基乙醇，0.1 mol · L⁻¹ NaAc，pH 9.0，0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl，pH 8.0) 与植物样品加入到 Eppendorf 管或取样袋中，两者比例为 10 : 1。利用研磨棒研磨，10 000 r · min⁻¹ 离心 1 min，取上清液用于杂交反应。

1.5 杂交反应

将样品点在预湿的尼龙膜上。将膜在 UVP 1000 紫外交联仪中交联 1 min。然后，将膜放入 10 mL 含有预杂交液 (50% 去离子甲酰胺，5 ×SSC，50 mmol · L⁻¹ 磷酸钠，pH 6.5，5 mmol · L⁻¹ EDTA，0.2% SDS，0.2 mg · mL⁻¹ 牛血清白蛋白、Ficoll 400 和 PVP，0.25 mg · mL⁻¹ 变性硅鱼精 DNA) 的可热封的杂交袋中，在 65 下，预杂交 3 ~ 6 h。倒出预杂交液，再加入 10 mL 杂交液 (含有 0.1 μg · mL⁻¹ dDNA 探针的杂交液)，65 杂交过夜。

在杂交洗涤后，在洗涤缓冲液 (2 ×SSC/0.1% SDS) 中浸润 1 ~ 5 min；在 20 ~ 30 mL 阻断液 (1 mol · L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5，0.15 mol · L⁻¹ NaCl) 中孵育 30 min；在 10 mL 抗体液 (抗 Dig-AP) 中孵育 30 min；在 20 ~ 30 mL 洗涤液中洗涤 2 次，每次 15 min。沿尼龙膜的左边加入 0.5 ~ 1.0 mL 新鲜配制的发光底物液。在暗室中用 X 光片压片并进行曝光、显影、定影。一般压 15 ~ 30 min。

1.6 探针灵敏性测试

利用 Nano drop 核酸测定仪, 对提取的 PSTVd 阳性样品总核酸浓度进行测定。利用 DEPC 水, 将提取的核酸样品浓度调整到 $2.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 然后, 采取 10 倍稀释法, 进行稀释。核酸浓度分别调整为 $2.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $250 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $25 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.25 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.025 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $0.0025 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。取 $2 \mu\text{L}$ 核酸样品点在膜上, 点在膜上样品核酸量分别为 5 ng 、 500 pg 、 50 pg 、 5 pg 、 0.5 pg 、 0.05 pg 和 0.005 pg 。利用所制备的探针进行杂交, 通过化学发光反应, 进行结果判读。观察双体探针检测 PSTVd 灵敏度。

1.7 探针专化性测试

利用酚-氯仿提取方法, 分别对阴阳性样品的薯块、叶片和芽组织提取核酸。取 $2 \mu\text{L}$ 提取的核酸, 点在膜上利用该 PSTVd 双体探针进行杂交反应, 比较不同组织部位样品在杂交结果及杂交特异性上是否有差异。

1.8 对接种 PSTVd 番茄植株的检测

取温室内接种 2 周后的番茄植株叶片样品, 利用提取缓冲液进行粗提的方法提取叶片中的汁液, 取 $2 \mu\text{L}$ 点在尼龙膜上, 利用 PSTVd 双体探针进行杂交检测。以没接种的健康番茄叶片样品做为阴性对照, 以已知的马铃薯阳性样品为阳性对照, 对接种番茄植株进行 PSTVd 检测。

1.9 对马铃薯田间样品和保存品种资源试管苗材料的检测

对采自田间, 类似 PSTVd 症状的植株或薯块样品及我单位保存的马铃薯资源材料, 共计 67 份, 分别进行 NASH、RT-PCR 和 R-PAGE 检测。RT-PCR 和 R-PAGE 检测技术分别按照 Ryoji 等 (2006) 和 Singh 等 (1988) 的方法进行。其中, 在 NASH 检测方法中, 样品核酸提取, 分别采用酚-氯仿抽提和对组织样品粗提的方法进行。比较不同检测方法的阳性样品检出率。

2 结果与分析

2.1 探针灵敏性

对提取核酸样品 10 倍稀释后, 点在尼龙膜上。当核酸样品稀释到 0.05 pg 时, Kodark 胶片上显示有黑色曝光斑点, 当核酸样品稀释到 0.005 pg 时, 没有产生黑色斑点 (图 1)。说明利用 PSTVd 双体探针检测 PSTVd 灵敏度达到 0.05 pg 。

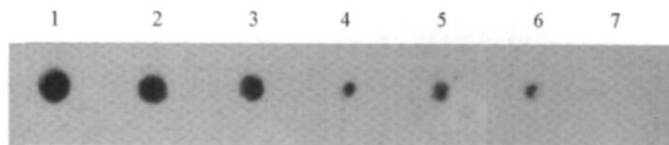


图 1 PSTVd dDNA 双体探针灵敏度测试

1~7: 点取核酸量分别为 5 ng 、 500 pg 、 50 pg 、 5 pg 、 0.5 pg 、 0.05 pg 和 0.005 pg 。

Fig. 1 Sensitivity of dimeric PSTVd dDNA probe

1 - 7: Total RNA 5 ng , 500 pg , 50 pg , 5 pg , 0.5 pg , 0.05 pg and 0.005 pg , respectively.

2.2 探针专化性

阳性样品的薯块、叶片和芽 (A1、A2 和 A3) 的杂交结果在 Kodark 胶片上均产生黑色斑点, 而阴性样品的薯块、叶片和芽 (B1、B2 和 B3) 的杂交结果在 Kodark 胶片上均没有产生黑色斑点 (图 2), 说明所制备的 dDNA 双体探针特异性较好, 且对样品的不同部位均可以得到一致的检测结果。

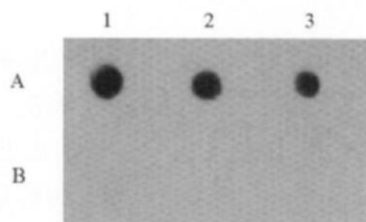


图 2 PSTVd cDNA 双体探针专化性测试

A. 阳性样品; B. 阴性样品; 1. 薯块; 2. 叶片; 3. 芽。

Fig. 2 Specificity of dimeric PSTVd cDNA probe

A. Positive sample; B. Negative sample; 1. Tuber; 2. Leaf; 3. Sprout

2.3 对接种 PSTVd 番茄植株的检测

如图 3 所示, 所接种的 19 株番茄中有 18 株有阳性斑点反应, 有 1 株 (B3) 没有产生斑点。其中, A2、A3、A4、A5 和 B5 样品阳性斑点反应较明显。对于 B2 和 B3 产生阳性斑点较弱的反应和没有产生斑点反应的样品, 又利用酚 氯仿抽提的方法重新提取 RNA, 以 A6 为阳性对照样品, A7 为阴性对照样品, 再进行杂交反应。结果 (图 4) 显示, B2、A6 产生阳性斑点, 而 B3 仍然没有产生阳性斑点。说明 B3 番茄植株 没有接种上 PSTVd。

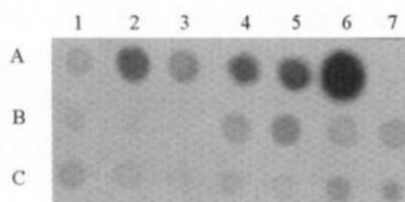


图 3 PSTVd cDNA 双体探针对接种番茄样品的检测 (核酸粗提)

A1 ~ A5、B1 ~ B7、C1 ~ C7. 接种 PSTVd 的番茄样品;

A6. 含有 PSTVd 的马铃薯阳性对照样品; A7. 没有接种的番茄健康样品。

Fig. 3 Detection results of PSTVd cDNA for tomato samples inoculated by PSTVd (crude sap)

A1 ~ A5, B1 ~ B7, C1 ~ C7. Tomato samples inoculated by PSTVd;

A6. Positive control of PSTVd; A7. Healthy tomato non-inoculated.

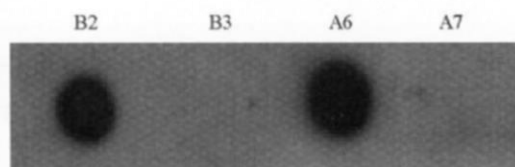


图 4 PSTVd cDNA 双体探针对接种番茄样品的检测 (酚:氯仿抽提)

B2、B3. 接种 PSTVd 的待测番茄样品; A6. 含有 PSTVd 的马铃薯阳性对照样品;

A7. 没有接种的番茄健康样品。

Fig. 4 Detection results of PSTVd cDNA for tomato samples inoculated by PSTVd (phenol:chloroform extraction)

B2, B3. Tomato samples inoculated by PSTVd; A6. Positive control of PSTVd;

A7. Healthy tomato non-inoculated.

2.4 对马铃薯田间样品和保存品种资源试管苗材料的检测

结果显示, 在 67 份被测样品中, NASH 技术 PSTVd 阳性检出率分别为 61.2% (粗提) 和 65.7% (酚 氯仿抽提)。利用酚 氯仿抽提的核酸样品, 通过 NASH 技术检测结果与 RT-PCR 检测结果相一

致，而 R-PAGE 的阳性样品检测率仅为 53.7%，低于 NASH 和 RT-PCR 检测方法（表 2）。

表 2 来自黑龙江省不同地区田间侵染 PSTVd 样品和品种资源材料的 NASH、RT-PCR 和 R-PAGE 检测结果

Table 2 NASH, RT-PCR and R-PAGE assay of PSTVd-infected field samples and potato resources from various regions of Heilongjiang

来源 Origin	材料类型 Type of samples	样品数量 Number of samples	核酸杂交技术 * NASH		反转录聚合酶链式反应 * RT-PCR	往返电泳技术 * R-PAGE
			Crude RNA	Purified RNA		
克山 Keshan	Tubers	15	12/15	14/15	14/15	11/15
讷河 Nehe	Tubers	15	10/15	11/15	11/15	10/15
巴彦 Bayan	Plants	13	7/13	7/13	7/13	6/13
泰康 Taikang	Tubers	6	4/6	4/6	4/6	3/6
哈尔滨 Harbin	Plants	14	7/14	7/14	7/14	5/14
哈尔滨 Harbin	Plantlets <i>in vitro</i>	4	1/4	1/4	1/4	1/4
总计 Total		67	41/67	44/67	44/67	36/67
阳性检出率 / %			61.2	65.7	65.7	53.7

Positive sample detected percentage

*：检出样品数 / 待测样品总数。

*：Number of positive plants/number of analyzed plants

3 讨论

本研究利用基因克隆技术，构建了 PSTVd 双载体，并以此载体为模板，利用地高辛作为标记物，通过 PCR 技术，制备了 PSTVd 双体 α DNA 探针，并建立了 PSTVd 的 NASH 杂交体系。该体系检测 PSTVd 的灵敏度可以达到 0.05 pg（图 1），是利用生物素标记的 α DNA 单体探针检测灵敏度的 100 倍（Nakahara et al, 1998; 吕典秋等, 2005a, 2005b）。地高辛作为标记物具有信号稳定、安全、灵敏度高等特点（Podleckis et al, 1993; Maria et al, 1996）。同时，PSTVd 双体探针由于比单体探针长，因此可随机掺入的 Dig-dUTP 数量多于单体探针，检测信号增强，灵敏度也就随之增高。

在样品组织部位对检测结果差异性方面也进行了研究。对马铃薯不同部位，叶片、薯块及芽方面均可以检测到 PSTVd，而且没有出现假阳性反应（图 2）。Salazar 等（1988）报道利用切口平移技术，以 32 P 做标记物进行 PSTVd 检测，检测结果的灵敏度达到 0.33 pg。Du 等（2007）利用荧光素标记的探针检测 RNA 病毒和 PSTVd，对于病毒（TMV RNA）的检测灵敏度达到 1.71 pg。相比，我们通过 PCR 方法制备的 PSTVd 双体探针的检测灵敏度更高。

目前，一些新的类病毒及病毒检测技术已得到研究，如实时定量 RT-PCR 技术（Boonham et al, 2004）、一步 RT-PCR 技术检测 PSTVd（Ragozzino et al, 2004）、RT-PCR 探针捕获杂交技术（RT-PCR probe capture hybridization, RT-PCR-ELISA）（Shamoul & Hadidi, 1999; Shamoul et al, 2002）等新型的 PCR 技术已应用在类病毒检测上。NASH 技术与其相比，在检测结果稳定性、检测样品数量等方面更具有优势。另外，我们通过基因重组技术构建的 PSTVd 双体探针在以往 NASH 技术基础上，进一步提高了检测灵敏度。

通过对采自田间的马铃薯植株叶片、块茎及保存的试管苗资源样品 67 份，进行 RT-PCR、NASH 和 R-PAGE 检测结果比较分析，利用酚 氯仿进行核酸提取后的 NASH 技术与 RT-PCR 技术具有同样的检测结果，阳性样品检出率相同（65.7%），而对于粗提的植株组织样品的 NASH 技术的阳性检出率仅为 61.2%，低于 RT-PCR 技术的阳性样品检出率（65.7%），但高于 R-PAGE 技术（53.7%）。

NASH 技术的关键是探针的制备和高效杂交体系的建立，如果能进一步简化杂交反应程序，形成商业化的杂交检测试剂盒，降低检测成本，该技术一定会在马铃薯生产及科研工作中得到更广泛的普及和应用。

References

- Bemad L, Duran-Vila N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 20 (2): 105 - 113.
- Boonham N, Pérez L G, Mendez M S, Peralta E L, Blockley A, Walsh K, Barker I, Mumford R A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116 (2): 139 - 146.
- Du Z, Jin B, Liu W, Chen L, Chen J. 2007. Highly sensitive fluorescent-labeled probes and glass slide hybridization for the detection of plant RNA viruses and a viroid. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39 (5): 326 - 334.
- L Ü Dian-qiu, Li Xue-zhan, Yang Xi-cai, He Yun-xia, Bai Yan-ju. 2005a. Sequence analysis of potato spindle tuber viroid from Northeast isolate of China. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 13 (1): 131 - 132. (in Chinese)
- 吕典秋, 李学湛, 杨希才, 何云霞, 白艳菊. 2005a. 马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 东北分离物的核苷酸序列分析. *农业生物技术学报*, 13 (1): 131 - 132.
- L Ü Dian-qiu, Li Xue-zhan, Yu De-cai, Yang Xi-cai. 2005b. Preparation and application of non-radioactive, biotin-labelled PSTVd-cDNA. *Acta Phytopathologica Sinica*, 35 (2): 104 - 108. (in Chinese)
- 吕典秋, 李学湛, 于德才, 杨希才. 2005b. 马铃薯类病毒 (PSTVd) 非放射性标记 cDNA 探针制备及其在检测上的应用. *植物病理学报*, 35 (2): 104 - 108.
- Hoppe H E, Giavedoni L, Mandel M A, Arese A, Oman B, Bravo A, Monacid F, Torres H N, Mentaberry A N. 1988. Biotinylated nucleic acid hybridization probes for potato virus detection. *Archives of Virology*, 103: 231 - 241.
- Maria Esther N F, Lucilia H M, Eugen G. 1996. A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroid in citrus medica with digoxin-labelled RNA probes. *Journal of Virological Methods*, 57 (2): 203 - 207.
- Nakahara K, Hataya T, Hayashi Y, Sugimoto T, Kimura I, Shikata E. 1998. A mixture of synthetic oligonucleotide probes labeled with biotin for the sensitive detection of *Potato spindle tuber viroid*. *Journal of Virological Methods*, 71 (2): 219 - 227.
- Owens R A, Diener T O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science*, 213: 670 - 672.
- Podleckis E V, Hammond R W, Hurtt S S, Hadidi A. 1993. Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labeled dot blot and tissue blot hybridization. *Journal of Virological Methods*, 43 (2): 147 - 158.
- Ragozzino E, Faggioli F, Barba M. 2004. Development of a one tube-one step RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: Apscaviroid, Hostuviroid, Pelamoviroid and Pospiviroid. *Journal of Virological Methods*, 121 (1): 25 - 29.
- Ryoji N, Masaaki N. 2006. Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. *Journal of Virological Methods*, 134 (1): 244 - 249.
- Salazar L F, Balbo I, Owens R A. 1988. Comparison of four radioactive probes for the diagnosis of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization. *Potato Research*, 31: 431 - 442.
- Shamoul A M, Faggioli F, Keith J M, Hadidi A. 2002. A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: Apscaviroid, Hostuviroid, Pelamoviroid. *Journal of Virological Methods*, 105 (2): 115 - 121.
- Shamoul A M, Hadidi A. 1999. Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription-polymerase chain reaction-probe capture hybridization. *Journal of Virological Methods*, 80 (2): 145 - 155.
- Singh R P, Boucher A, Seabrook J E A. 1988. Detection of the mild strains of potato spindle tuber viroid from true potato seed by return electrophoresis. *Phytopathology*, 78: 663 - 667.
- Singh R P, Dilworth A D, Singh M, Babcock K M. 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132 (2): 204 - 211.