

DOI:10.11937/bfyy.201521029

百合病毒检测芯片的杂交条件优化

贾 慧¹, 郑 洁¹, 曹志艳¹, 王进忠², 董金皋¹

(1. 河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071000; 2. 北京农学院, 北京 102206)

摘 要:分别以感染百合无症病毒、黄瓜花叶病毒和百合斑驳病毒的百合及感染烟草花叶病毒和马铃薯病毒 Y 的烟草为试材, 根据 5 种植物病毒外壳蛋白基因保守序列设计引物和寡核苷酸探针, 并制备基因芯片。用 Trizol 试剂盒提取感染病毒的植物总 RNA, 荧光 RT-PCR 产物与芯片杂交, 研究 PCR 产物是否进行变性处理、杂交时间、杂交温度、杂交液组分 SSC 和 SDS 浓度及 PCR 体系中非荧光引物和荧光引物比例对芯片杂交的影响。结果表明: 杂交适宜条件为 $6\times$ SSC、0.2% SDS 的杂交液、42℃ 杂交 60 min, PCR 体系中非荧光与荧光引物比例为 1:10, PCR 产物要进行变性处理。经过整体条件优化后的基因芯片在杂交检测上具有较高的特异性, 适于检测百合病毒病。

关键词:百合病毒; 基因芯片; 杂交条件; 优化

中图分类号:S 436.8⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0110-06

近年来, 百合作为切花和盆栽花卉跃升为国际进出口贸易中前 10 位, 有大约 294 个属 4 500 多种。同时, 病毒病是危害百合生产的最主要的问题。据报道, 我国

第一作者简介:贾慧(1977-), 女, 河北沽源人, 硕士, 讲师, 现主要从事植物分子病理学等研究工作。E-mail: hui_jiahui@126.com.

责任作者:董金皋(1963-), 男, 河北平乡人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物真菌毒素研究及植物分子病理学等研究工作。

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(5043026)。

收稿日期:2015-05-19

百合种植业受到至少 10 种以上的病毒病危害^[1-2], 其中最为严重的为百合无症病毒(Lily symptomless virus, LSV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)和百合斑驳病毒(Lily mottle virus, LMoV)^[3-5]。生产上, 百合病毒病的防控除了科学、合理的肥水等栽培管理和种植脱毒种球外, 简单、灵敏、快速的病毒检测体系往往成为防御发生、流行的先决条件^[6-7], 目前, 分子检测技术将病毒检测灵敏度由血清学的 ng 水平提高到了 pg 级^[8]。基因芯片技术, 作为一个综合性的高新技术平台, 以其高通量、高灵敏度的优势, 为植物病毒病的诊断、病原鉴

Effect of Natural Additives on Protocorm Proliferation, Differentiation and Rooting of *Dendrobium officinale*

FANG Zhongming^{1,2}, BAI Genxiang¹, ZENG Qisen¹, ZOU Min¹, ZENG Songjun³

(1. School of Life Science and Technology, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan, Hubei 430415; 2. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650)

Abstract: Taking Yunnan Ruanjiao *D. officinale* as materials, the effect of natural additives on protocorms proliferation, differentiation and rooting were studied. The results showed that high concentrations of banana juice could inhibit the proliferation of protocorm of *D. officinale* but banana juice was favorable to proliferation. The best protocorm proliferation medium of *D. officinale* was MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L+sucrose 20 g/L+agar 8 g/L+activated carbon 2 g/L+potato juice 200 g/L, with multiplication rate 6.8 after 60 days, and differentiation rate reached to 97% after 30 days. When adding banana, or potato juice in MS, it had an obvious effect on rooting. The optimal natural additives for rooting was potato juice 100 g/L.

Keywords: *Dendrobium officinale*; tissue culture; natural additives

定、药物筛选及基因表达分析提供了支持。

基因芯片(gene chip)又称 DNA 芯片、生物芯片,该技术是在一片片基表面固定了序列一致的靶核酸的探针,并与样品中的源核酸进行分子杂交,通过测定荧光强度对样品的序列信息进行解读和分析,大规模获取相关生物信息^[9]。芯片杂交信号强度和重复性是影响分析结果的 2 个重要因素,芯片技术发展的早期,研究者对片基选择、制作过程进行了大量的探索,基于目前商业化先进的芯片片基制作技术和程序化、高效的点样手段,合适的杂交条件是试验成功与否的关键,也是生物芯片能够发挥作用的关键。徐根明等^[10]以侵染马铃薯的 5 种病毒/类病毒的保守区寡核苷酸为研究对象,对探针浓度、杂交时间、温度及点样液等条件进行了优化;马淑华等^[11]根据 *GAPDH*、 β -*actin* 和 *Actin gamma* 3 个看家基因片段制备基因芯片并对杂交温度、杂交时间以及 DNA 片段的浓度进行了研究;DAWSON 等^[12]对点样液和杂交液做了筛选,SHI 等^[13]优化了淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体检测芯片的杂交条件;李长绿等^[14]筛选了家鸡肝脏 cDNA 芯片的制备和杂交条件;温颖等^[15]发现,HIV21B 亚型 U26942 寡核苷酸探针用 3×SSC+甜菜碱适合的点样液具有最优效果。基因芯片的类型很多,每一种芯片的杂交反应条件优化在整个技术体系中为必要步骤,而且因研究对象、试验材料各有不同,其杂交反应条件的优化各不相同。该研究就百合无症状病毒、黄瓜花叶病毒、百合斑驳病毒和分别侵染 300 多种和 60 余种植物病毒病的烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)共 5 种植物病毒检测芯片杂交反应体系中的几个主要影响因素如:PCR 反应体系荧光引物的配比,是否对 PCR 产物进行变性处理,PCR 产物与芯片杂交的时间、温度及杂交反应液主要成分 SSC 和 SDS 的配比进行试验,优化所制备芯片,达到建立可靠、高效的植物病毒检测方法的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒源及试剂 LSV、CMV、LMoV、TMV 和 PVY 分别由天津进出境检验检疫局、中国农业科学院植物保护研究所、中国农业大学等单位馈赠,由河北农业大学生命科学学院实验室扩繁保存;大鼠脑基因质粒等均为实验室保存样本;RNA 提取试剂盒,购自 GIBCO 上海公司;AMV 逆转录酶 *Taq* 聚合酶等购自 TaKaRa 大连公司;Cy3TM/Cy5TMAmidite,购自 Amersham 公司;玻璃片基、醛基化玻片购自深圳公司;PCR 反应混合液、芯片点样液、芯片杂交液、杂交洗脱液 A、B、C 等,自行配制。该试验是在中国人民解放军军事医学科学院放射研究所芯片实验室完成。

1.1.2 引物、探针的设计与合成 搜索 GenBank 数据库中的侵染百合的 3 种病毒(CMV(亚组 I)、LSV 和 LMoV)及 TMV 和 PVY 基因组,根据各病毒基因外壳蛋白(CP)基因保守序列,分别设计引物(下游引物为 Cy3 荧光标记)和寡核苷酸探针(表 1、2)。引物和探针在实验室用 DNA 自动合成仪(ABi 8909)合成,采用标准亚磷酸胺化学方法在探针 5'端加 Poly(T)分子臂及氨基修饰。

表 1 引物序列

Table 1	Sequences of primers	
引物(长度/nt) Primers (Length/nt)	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增产物大小 Amplified products size/bp
CMV-F1(22)	5'-AACCTGGGTACAGTTCACATC-3'	326
CMV-R1(22)	5'-CATCGCCGAAAGATCACAAC-3'	
LSV-F2(24)	5'-GTCGTATCTAACACATGGCAACC-3'	256
LSV-R2(21)	5'-CCGGCAGACTTTCGCACTCC-3'	
LMoV-F3(21)	5'-CATGGTACAACGCGTGAAAG-3'	486
LMoV-R3(22)	5'-CATCATCTGCTGTATGCCTCTC-3'	
TMV-F4(22)	5'-TGTTCTGTGTCATCAGCGTGGGC-3'	327
TMV-R4(21)	5'-CACCGTTGGGTGCTACTCT-3'	
PVY-F5(24)	5'-CTTTCATGAGGTACATCAGCAAC-3'	200
PVY-R5(22)	5'-TCACATGTTCTTGACTCCAAGT-3'	

表 2 寡核苷酸探针序列

Table 2	Sequences of oligonucleotide probes	
探针 Probe	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	长度 Length/nt
CMV-P1	NH ₂ TTTT TTTT ACCTGATTCAGTCACGGAATTCGATAAGAAGCTTGTTTCG	40
CMV-P2	NH ₂ TTTT TTTT CTCTGCTATGTTTGCGGACGGAGCCTCACCGGTACTGGTTATCA	45
LSV-P3	NH ₂ TTTT TTTT GCAGTTCCGCGTTCCTTGACCCCTGAGGGCAGCATTGAGTATGAGA	45
LSV-P4	NH ₂ TTTT TTTT GCGGTGCCGTCGACTCCATCGCTGCGATCATGAAGAAGCACGC	44
LMoV-P5	NH ₂ TTTT TTTT CGTGGTTCATGATGACGAGATCAGCAAGTTGAATTTCCATTAC	45
LMoV-P6	NH ₂ TTTT TTTT CGGGGAAAACAATCAAAGCTATGTGGGTAGATGGAAGGTGACC	45
TMV-P7	NH ₂ TTTT TTTT ATAGAAGTTGAAAATCAGGCGAACCACGACTGCGGAAAC	41
TMV-P8	NH ₂ TTTT TTTT GTACAGGTACAATGCGGTATTAGACCCGCTAGTCACAGCACTGTTAGG	48
PVY-P9	NH ₂ TTTT TTTT GTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGAGCAT	43
PVY-P10	NH ₂ TTTT TTTT CAACCTCGACTTTTCGGGTGGACGGTGGCATCAGTACAC	40

1.1.3 探针阵列排布 参照作者已发表文章^[16]。稀释探针至 50 $\mu\text{mol/L}$,在温度为 23℃、相对湿度为 90%条件下,使用 Cartisan 芯片点样仪将设计合成探针点至醛基化玻片上,并设置点样液为空白对照(CK1)、大鼠脑基因为阴性对照(CK2)(图 1)。

P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
CK1	CK1	CK1	CK1	CK1	CK2	CK2	CK2	CK2	CK2

图 1 芯片探针阵列排布示意图

Fig. 1 Distribution of the probes on chips

1.2 试验方法

1.2.1 Cy3 标记的 PCR 产物变性与非变性处理 PCR 反应:以 1 μL CMV、LSV、LMoV 和 TMV、PVY 的质粒 DNA 为模板,引物 0.6 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* 酶 1 U, 13 \times PCRmix 至 15 μL ; 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 16℃ 保存。芯片杂交与洗脱:分别取 5 种病毒的 PCR 扩增产物 1 μL 与杂交液混合均匀,再将混合液混合在一起后均匀涂布于芯片杂交区,置于杂交盒中 42℃,水浴杂交 1 h;取出芯片并分别依次用洗脱液 A、B、C 洗涤 1 min,晾干。芯片扫描:用 GenePix 4000 扫描仪,设置 Cy3 扫描,条件为 540 nm 激发波长、570 nm 发射波长、650 的 PMT Voltage、33 的 Power(%),从而产生分析精度为 10 μm 的 16 位 TIFF 图象。数据分析:读取的信号值要在扣除背景值后,计算每条探针重复点的信号均值。最终信号强度绝对值大于 400,且信号强度与背景强度比值大于 4 为有效信号值,小于视为阴性或无效信号,在 4 和 2.5 之间,需重复验证。Cy3 标记的 PCR 产物变性与非变性处理:在上述情况下将 PCR 产物直接与杂交液混合杂交或将 PCR 产物煮沸 5 min,冰上冷却 5 min,再与杂交液混合杂交,读取芯片扫描数据。

1.2.2 上下游引物浓度比例对杂交的影响 设置 PCR 扩增反应体系中上游引物终浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.2、0.25 $\mu\text{mol/L}$,下游 Cy3 标记引物为 0.5 $\mu\text{mol/L}$,使得体系中上下游引物比例 5 个浓度梯度(1:10、2:10、3:10、4:10、5:10)进行不对称 PCR 扩增。反应产物经变性处理后与芯片进行杂交反应。其余同上。

1.2.3 杂交反应时间对杂交的影响 设置杂交时间分别为 0.25、0.50、1.00、1.50 h,并将 PCR 产物进行变性处

理,其余同上。

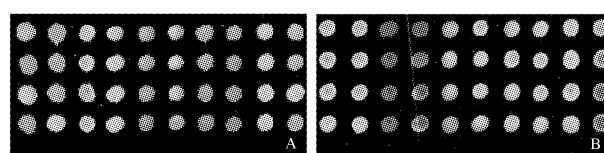
1.2.4 杂交温度对杂交信号的影响 设置杂交温度梯度为 37、42、50、55、60℃,并将 PCR 产物进行变性处理,使用 1 h 的杂交时间,其余同上。

1.2.5 杂交液成分对杂交信号的影响 试验通常使用主要成分为 SSC、SDS 和甲酰胺的芯片杂交液,其中,甲酰胺浓度基本固定为 2.5%,将杂交时间设为 60 min,杂交温度为 42℃,甲酰胺浓度为 2.5%,分别设置 SSC 浓度为 4、6、8、10、12 倍,SDS 浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%,进行杂交液体条件优化。其余同上。

2 结果与分析

2.1 Cy3 标记的 PCR 产物变性处理对杂交效率的影响

为了使带荧光引物标记的产物以单链形式存在,分别取 PCR 产物和经过沸水浴 5 min 变性处理的 PCR 产物与杂交液混合后进行杂交,芯片扫描结果显示,5 种病毒(CMV、LSV、LMoV 和 TMV、PVY)变性处理的 PCR 产物杂交信号明显优于未变性处理(图 2),统计信号值发现,变性处理组杂交信号强度大大优于未变性处理组(图 3)。因而杂交前应采用变性处理。



注:A,变性处理;B,非变性处理。

Note: A. Denatured treatment; B. Underdenatured treatment.

图 2 变性处理对杂交信号影响

Fig. 2 Effect of denaturation on hybridization signal intensity

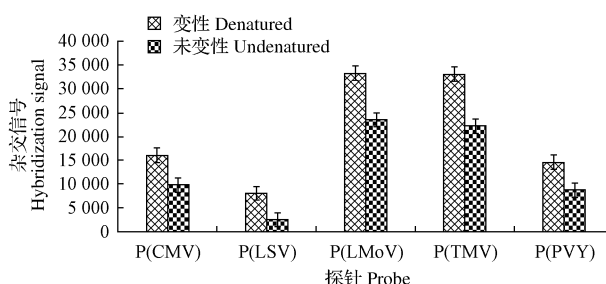
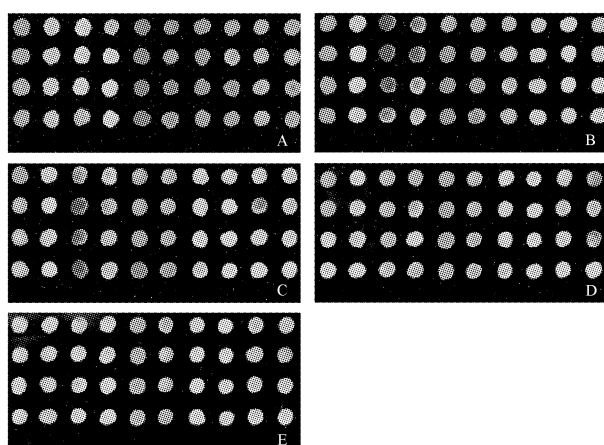


图 3 PCR 产物变性处理对杂交信号的影响

Fig. 3 Effect of denaturation on hybridization signal

2.2 上下游引物比例对杂交效率的影响

采用非对称 PCR 反应,使带有 Cy3 荧光标记的 PCR 产物扩增效率高。设置上、下游引物比例分别为 1:10、2:10、3:10、4:10、5:10,PCR 产物经变性处理后杂交。结果显示,随着上引物浓度的增加,杂交信号呈增强趋势(图 4),下、上引物比例在 10:1 时,杂交信



注:A,1:10;B,2:10;C,3:10;D,4:10;E,5:10。

Note:A,1:10;B,2:10;C,3:10;D,4:10;E,5:10。

图4 上游与下游引物比例对杂交信号的影响

Fig. 4 Effect of fluorescently labeled primer ration on hybridization signal

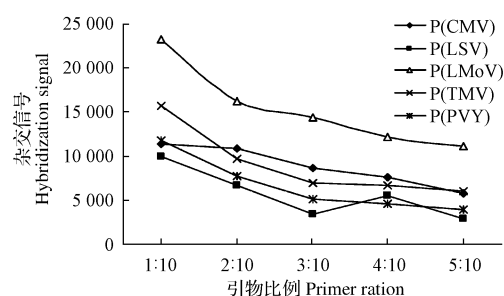


图5 引物比例的优化对杂交信号值的影响

Fig. 5 Effect of fluorescently labeled primer ration on hybridization signal

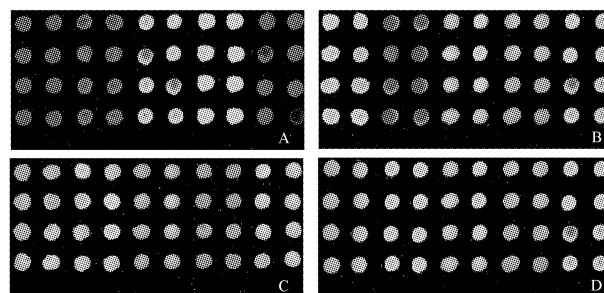
号最强(图5)。

2.3 杂交时间对杂交效率的影响

选择将上、下游引物比例为1:10,PCR产物进行变性处理,设置杂交时间分别为0.25、0.50、1.00、1.50 h。结果显示,随着杂交时间的延长,芯片杂交信号值增高,在1 h时,杂交信号值达到最高,随后开始下降(图6、7)。杂交时间过长,探针与PCR产物的非特异性结合增加,杂交背景也增高,杂交时间过短,特异结合不稳定,在洗片时被洗脱掉。

2.4 杂交温度对杂交效率的影响

变性处理PCR产物,分别设37、42、50、55、60℃为杂交温度,杂交1 h后扫描芯片。结果表明,对CMV、LSV、TMV和PVY 4种病毒的探针来说,杂交温度为42℃时信号值达到最高,而LMoV在50℃时效果为最佳(图8、9)。可以看出,温度对信号值及背景值的影响较大,随着温度的升高,杂交的背景值也升高,对于整张芯



注:A,0.25 h;B,0.50 h;C,1.00 h;D,1.50 h。

Note:A,0.25 h;B,0.50 h;C,1.00 h;D,1.50 h。

图6 杂交时间对杂交效率的影响

Fig. 6 Effect of hybridization time on hybridization signal intensity and quantity analysis

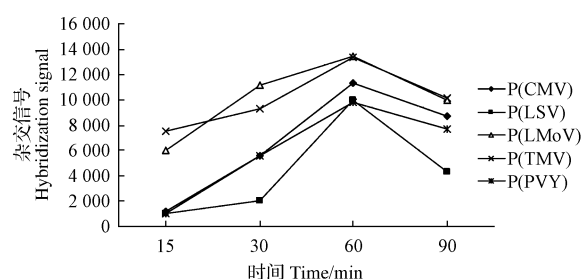
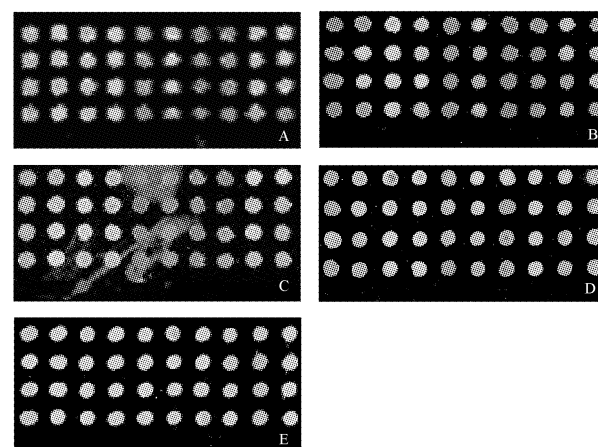


图7 杂交时间对杂交信号值的影响

Fig. 7 Effect of hybridization time on hybridization signal



注:A,37℃;B,42℃;C,50℃;D,55℃;E,60℃。

Note:A,37℃;B,42℃;C,50℃;D,55℃;E,60℃。

图8 杂交温度对杂交信号的影响

Fig. 8 Effect of hybridization temperature on hybridization signal 片,低信号强度的探针会影响芯片的整体效果,综合芯片的整体信号强度及背景强度,选择42℃为杂交温度为宜。

2.5 杂交液成分对杂交效率的影响

该试验使用的杂交液主要成分为SSC(由NaCl和柠檬酸钠配置的中性缓冲液)、SDS(十二烷基硫酸钠)和

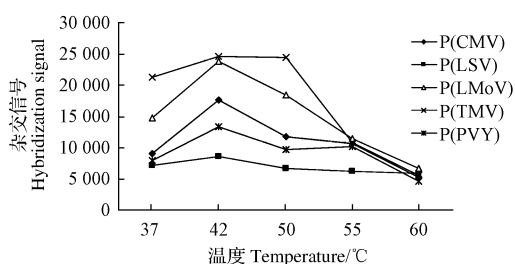


图9 杂交温度对信号值的影响

Fig. 9 Effect of hybridization temperature to hybridization signal
甲酰胺,通常甲酰胺浓度固定为2.5%,SSC和SDS在芯片杂交反应体系中能够保持一定的盐离子浓度和中性环境,降低DNA双链间磷酸基团的静电斥力,更利于复性。在42℃条件下,芯片杂交时间为1h,设置SSC浓度分别为4、6、8、10、12倍,定量分析各浓度SSC组成的杂交液,对信号值的影响(图10);将SDS浓度设为0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%,分析各浓度SDS组成的杂交液对芯片杂交信号值的影响(图11)。结果显示,使用6倍SSC的杂交液时,杂交信号强度最高;固定使用6倍SSC时5个浓度的SDS对杂交信号影响不明显,根据试验需求,使用0.2%SDS的杂交液为宜。

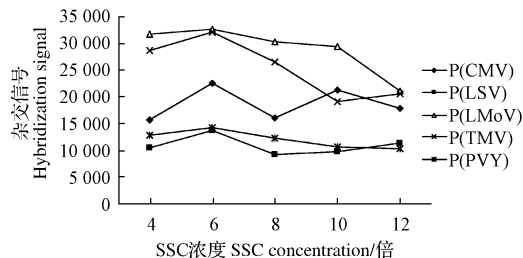


图10 SSC浓度对杂交信号值的影响

Fig. 10 Effect of SSC concentration on hybridization signal

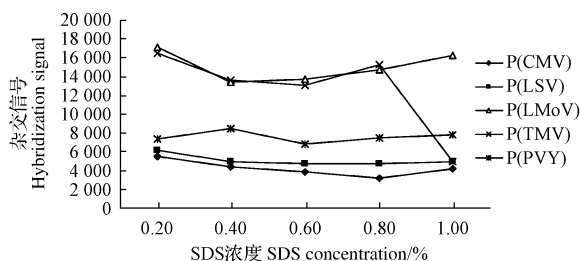


图11 SDS浓度对杂交信号值的影响

Fig. 11 Effect of SDS concentration on hybridization signal

3 讨论

杂交反应在芯片试验的整个过程中是最主要的环节,通常为了得到较高的杂交效率,出现了很多先进的方法。

首先是单链荧光样品的制备,SHENG-CE等^[17]使用不对称PCR得到更多荧光单链DNA,CHENG等^[19]在PCR扩增的样品链上设计了2条Blocking oligo(封闭寡核苷酸),这2条链均是样品链的一段,可以和样品的互补链完全结合,但不会和探针完全结合,通过控制杂交温度阻止它们和探针结合,从而大大提高杂交过程中的单链样品含量,提高杂交效率。其次为杂交温度,杂交温度对标记产物的二级结构、杂交反应体系中单链DNA与探针结合有一定影响,同时很大程度上影响DNA复性过程中分子运动速度和方向,高温有利于PCR产物打开二级结构和杂交反应的分子运动,但DNA复性反应效率低,从而影响杂交效果;温度过低,非特异性杂交几率增加。不同的核酸有不同的T_m值,导致其复性的温度有所不同,因此探针设计既要考虑特异性又要尽量让各条探针的T_m值接近。第三为杂交时间,杂交反应中能使50%的DNA分子复性所用的时间为合适的杂交时间,时间延长,未杂交的DNA分子出现聚合现象,已经杂交的DNA分子聚合体解链,信号反而会减弱,背景会增强,时间过短,结合不牢固,容易被洗脱液洗脱。最后是杂交液。杂交液的成分之一为甲酰胺,YAN等^[17]通过在杂交液中加入甲酰胺来降低DNA复性温度,并能保证核酸相互作用的严格性,并通过优化试验发现用浓度为2.5%的甲酰胺配置的杂交液效果最好。杂交液的另外2个组分SDS和SSC在杂交反应中起到缓冲作用,保证足够高的盐离子浓度和中性条件,使DNA双链间磷酸基团的静电斥力得到中和,利于复性。不同的芯片所用的SDS和SSC浓度配比也不尽相同。

该研究对影响芯片杂交反应的几个主要因素进行了优化,如:是否对PCR产物进行变性处理、荧光标记引物与非荧光标记引物的比例,杂交所用的时间、温度及杂交液成分的浓度(SSC和SDS)。有些条件对某单一探针杂交信号强度影响不一致,但从芯片整体效果,如最低信号值探针、背景值、检测灵敏度及成本等综合考虑,用于检测LSV、CMV、LMoV、TMV和PVY 5种病毒的基因芯片杂交反应的最优条件为PCR反应体系中使得Cy3标记的荧光与非荧光引物的比例为1:10,对PCR产物进行变性处理,使用6×SSC和0.2%的SDS配置的杂交液,在温度为42℃条件下杂交1h。通过对杂交条件的优化,所制备的检测危害百合生产的3种重要病毒——百合无症状病毒(LSV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、百合斑驳病毒(LMoV)和2种重要的植物病毒——烟草花叶病毒(TMV)、马铃薯病毒Y(PVY)的基因芯片有效、

方便,可以进一步在芯片整体效果方面进行完善,以期在田间实际操作中得到广泛应用推广。

参考文献

- [1] RYU K H, PARK H W, CHOI J K. Characterization and sequence analysis of lily isolate of cucumber mosaic virus from liliun tsingtauense[J]. The Plant Pathology Journal, 2002, 18(2): 85-92.
- [2] ZHENG H Y, CHEN J, ZHAO M F, et al. Occurrence and sequences of Lily mottle virus and Lily symptomless virus in plants grown from imported bulbs in Zhejiang province[J]. Archives of Virology, 2003, 148: 2419-2428.
- [3] XU P S, LI H A, LIU J W, et al. Sequence and structure prediction of RNA-dependent RNA polymerase of Lily symptomless virus isolated from L. x 'Casablanca' [J]. Archives of Virology, 2011, 156(6): 939-943.
- [4] ASJESC J, BLOM BARHOORN G J, PIRON P G M, et al. Control review of air-borne tulip breaking virus and Lily symptomless virus in Liliun in the Netherlands[J]. Acta Horticulture, 1996, 432: 290-297.
- [5] HAN L J, LIU W H. Studies on Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) occurring on lily[J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6(10): 1201-1208.
- [6] CHINESTRA S C, FACCHINETTI C, CURVETTO N R, et al. Detection and frequency of Lily viruses in Argentina[J]. Plant Disease, 2019, 94(10): 1189-1194.
- [7] BELLARDI M G, NANNI G, BERTACCINI A, et al. Old and new viruses of lily in Italy[J]. Acta Horticulturae, 2002, 568: 215-220.
- [8] 宁红, 秦蓁. 分子生物学技术在检疫性有害生物诊断中的应用[J]. 植物检疫, 2002, 16(2): 98-100.
- [9] 邹立扣, 王红宁. 基因芯片技术检测细菌耐药性的研究进展[J]. 微

生物学杂志, 2003, 23(1): 30-32.

- [10] 徐根明, 丁先锋, 朱聪, 等. 植物病毒检测芯片的杂交条件优化[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(10): 75-80.
- [11] 马淑华, 王升启. cDNA 芯片技术杂交效率的优化[J]. 药学报, 2002, 37(2): 153-157.
- [12] DAWSON E D, REPPERT A E, ROWLEN K L, et al. Spotting optimization for oligo microarrays on aldehyde-glass[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 341(2): 352-360.
- [13] SHI G, WEN S Y, CHEN S H, et al. Fabrication and optimization of the multiplex PCR based oligonucleotide microarray for detection of neisseria gonorrhoeae Chlamydia trachomatis and ureaplasma urealyticum[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 62(2): 245-256.
- [14] 李长绿, 王秀丽, 李宁, 等. cDNA 芯片制备条件的优化[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4): 516-523.
- [15] 温颖, 马文丽, 吴清华, 等. 60 mer 长寡核苷酸微阵列构建的优化[J]. 广东医学, 2005, 26(4): 460-462.
- [16] 贾慧, 王艳辉, 王进忠, 等. 基因芯片技术检测黄瓜花叶病毒、烟草花叶病毒和马铃薯 Y 病毒[J]. 华北农学报, 2011, 26(1): 83-86.
- [17] SHENG-CE T. Biochip-base devices and methods in microbial community ribotyping[J]. Encyclopedia Environment Microbiol, 2001(4): 443-449.
- [18] YAN L, CHENG J. Detection of known mutation in hypertrophic cardiomyopathy using oligonucleotide microarrays assisted by improved base stacking hybridization[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(6): 1613-1618.
- [19] CHENG J, WANG D. Single nucleotide polymorphism discrimination assisted by improved base stacking hybridization using oligonucleotide microarrays[J]. Bio Techniques, 2003, 35(8): 300-308.

Optimization of Hybridization Condition for Lily Virus Detection Microarray

JIA Hui¹, ZHENG Jie¹, CAO Zhiyan¹, WANG Jinzhong², DONG Jingao¹

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract: In the present study the lily infected by Lily symptomless virus (LSV), Cucumber mosaic virus (CMV), Lily mottle virus (LMoV) and tobacco infected by Tobacco mosaic virus (TMV), Potato virus Y (PVY) were chosen as test material. Based on conserved coat protein region nucleotide sequences of five kinds of viruses, primers and probes were designed and the microarray were designed and fabricated. Total RNA of infected plant was extracted by the Trizol reagent, and products that Cy3 labeled RT-PCR amplification hybridized with the microarray. The effects of whether the PCR products were denatured, hybridization time, hybridization temperature, hybridization buffer and the ratio of non-market primer to market primer with fluorescence in PCR system on microarray hybridization were evaluated. The result showed that the optimal hybridization time was 60 minutes; temperature was 42°C; SSC concentration was 6 × SSC, SDS was 0.2%; The ratio of non-market primer to market primer with fluorescence was 1 : 10 in the PCR system, and the PCR products must to be degenerated before hybridization. After the overall optimization, the gene chips had a high specificity in the hybridization, and could be used for detection of lily viruses fast and accurately.

Keywords: Lily virus; oligonucleotide microarray; hybridization conditions; optimization