

基于分子生物学的新型生物安全因子诊断技术

吴斌¹, 吕莹¹, 张琼², 张思濛², 肇慧君²

¹中国检验认证集团辽宁有限公司, 辽宁 大连

²大连海关, 辽宁 大连

Email: wubin69@163.com

收稿日期: 2020年12月28日; 录用日期: 2021年1月21日; 发布日期: 2021年1月28日

摘要

随着人们生活水平、工业水平和科学技术的发展, 以及不断暴露出的如外来生物入侵、禽流感、非洲猪瘟等生物安全问题, 使得生物安全成为影响社会发展的重要因子, 特别是新冠疫情的爆发, 使生物安全上升到全球政治问题和社会问题的高度。人们在呼吁加强生物安全管理的同时对生物安全因子的诊断提出了更高的要求。本文综述了近期新型生物安全因子诊断技术, 分析各类技术的特点、研究成果及发展空间, 并对生物安全检测技术进行了展望。

关键词

生物安全因子, 分子生物学, 诊断

The New Diagnostic Techniques of Biosafety Factors Based on Molecular Biology

Bin Wu¹, Ying Lv¹, Qiong Zhang², Simeng Zhang², Huijun Zhao²

¹China Certification and Inspection Group Liaoning Co., Ltd., Dalian Liaoning

²Dalian Customs, Dalian Liaoning

Email: wubin69@163.com

Received: Dec. 28th, 2020; accepted: Jan. 21st, 2021; published: Jan. 28th, 2021

Abstract

With the continuous improvement of people's living standards, industry level and technology, as

well as the constant exposure of biosafety problems such as alien biological invasion, avian flu, African swine fever, they make the biosafety have become an important factor that could affect social development. The outbreak of Covid-19 has carried biosecurity forward up to a height of global political and social issues. Higher requirements about diagnosis of biosafety factors are presented while people call for the strengthening of biosafety management. In this paper, the characteristics of each new biosafety factor diagnosis technology, research achievements and development space are reviewed. At the same time, the prospect of biosafety detection technologies is discussed.

Keywords

Biosafety Factors, Molecular Biology, Diagnosis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

生物安全因子检测包括临床检测和实验室检测, 通常根据临床症状和死后剖检病变可对疾病做出初步检测。但许多生物危害因子的临床症状极其相似, 且不具有示病性, 因此确诊需进行实验室检测。实验室检测通过直接或间接检测致病原来完成, 直接法是检测致病原的颗粒和/或其成分, 如核酸、结构或非结构蛋白、酶等, 常用方法是(病原)分离或体外培养; 间接法是检测感染诱发的抗体等, 常用方法为血清学方法, 如中和, ELISA 和血凝抑制试验。实验室通常同步使用两种方法进行检测, 近年来分子生物学诊断技术中对病原体特异性 DNA 体外扩增技术正在取代培养艰难或不可培养的病原体分离或细菌培养技术。主要的分子生物学诊断技术包括以下几种。

2. 数字 PCR 技术

数字 PCR (digital PCR, dPCR)是继实时定量 PCR 之后新发展起来的一种绝对定量分析技术。通过将单个 DNA 分子转移入独立的反应室, PCR 扩增反应后, 对荧光信号进行检测分析, 实现单分子的绝对定量。

数字 PCR 技术摆脱了对标准曲线的依赖, 具有更高灵敏度和准确度, 在基因突变检测、拷贝数变异检测、病原检测以及下一代测序等方面均得到广泛应用[1]。数字 PCR 能够直接数出原始样品中核酸分子的个数, 是对起始样品的绝对定量。因此特别适用于依靠 Ct 值不能很好分辨的应用领域如拷贝数变异研究、突变检测研究、复杂来源样品中含量极低核酸分子的检测等。数字 PCR 技术面临耗材成本高、实验通量少的问题, 通过与高通量测序对接完成对测序文库的质量控制, 通过软件实现操作智能化, 使其将在生物安全检测领域拥有更广阔的应用前景。

3. 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 是一项基于核酸扩增原理的分子技术, 其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物, 利用一种链置换 DNA 聚合酶在等温条件保温 30 min~60 min, 即可完成核酸扩增反应。LAMP 技术虽然是一种新的核酸扩增技术, 但其在分子生物学检测领域的应用非常广泛。Ohtsuka 等[2]用 PCR 及 LAMP 分别对于被感染沙门氏菌的水样鸡蛋中进行

抽样检测,结果显示,PCR漏检了10%,LAMP及分离培养的检出率为100%。LAMP虽然对引物设计要求比较高,需要设计多条引物链,不适所有基因,但是LAMP检测技术用于布病临床诊断具有快速、高效、便捷等特点,对于基层布病的病原学诊断具有实用价值。

4. 重组酶聚合酶扩增技术

重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术是一项由多种酶和蛋白参与,在恒定温度条件下实现核酸指数扩增的新技术。RPA结合了血清学和分子技术的优点,能够实现实验室外的现场精确检测。RPA常和其他技术结合,例如Rohrman等[3]采用RPA结合侧流层析技术,检测了HIV病毒DNA,并和Crannell等进行了HIV-1的实时RPA检测,并对产物进行荧光定量;Kersting等[4]通过微阵列技术与多重扩增RPA结合,实现同时检测奈瑟氏菌、沙门氏菌和葡萄球菌。Amer等[5]研发出一种可以在10~20 min检测到牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCOV)和在4~10 min检测到口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)的实时反转录RPA,此技术成功应用于当年埃及的口蹄疫大爆发时期,有效抑制疫情的蔓延,实时RT-RPA检测FMDV灵敏度高达98%。

5. 重组酶介导等温核酸扩增技术

体外核酸快速扩增技术是一种可使微量核酸在体外高效快速扩增的技术。重组酶介导的扩增(recombinase-aid amplification, RAA)技术是在现有体外核酸扩增原理的基础上发展起来的恒温体外快速扩增核酸技术。RAA技术不依赖于PCR仪器的便捷性能,能充分扩大核酸扩增技术的应用领域。此外,RAA技术还能完成多重引物扩增,配合荧光仪,可形成一套RAA多重荧光实时检测系统,即利用不同颜色的荧光标记,在同一个反应里检测到不同的目的基因,这是其他恒温核酸扩增技术或巢式PCR技术无法相比的特点。在生物安全监测领域张小平等[6]建立了沙门氏菌RAA监测技术,该技术可在39℃下进行,检测时间在20 min以内,检测下限为 10^2 拷贝/ μL ,与大肠杆菌、志贺菌无交叉反应,特异性良好。

6. 实时荧光核酸恒温扩增监测技术

实时荧光核酸恒温扩增监测技术(Simultaneous Amplification and Testing, 简称SAT)是将新一代的核酸恒温扩增技术和实时荧光监测技术相结合的一种新型核酸监测技术,该技术具有高灵敏度、高特异性、低污染、反应稳定等优点。SAT技术直接以致病微生物特异性活菌RNA为扩增靶,以扩增产物RNA为检测靶标,从而实现食品致病菌活菌检测,减少甚至杜绝DNA碎片带来假阳性结果的机会。肖剑等[7]对致病菌沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和单增李斯特氏菌同相应国标方法进行比对试验,4种致病菌SAT试剂盒的灵敏度均为100%,得到良好的结果。

7. 高分辨率溶解曲线技术

高分辨率溶解曲线(High Resolution Melting, HRM)是一种基于单核苷酸溶解温度不同而形成不同形态溶解曲线的基因分析技术,用于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和突变检测。通常与实时荧光PCR相结合,可以实时监测温度上升时双链DNA的解链过程。HRM技术从2003年问世以来得到了迅速发展,在突变扫描、单核苷酸多态性分析、甲基化研究、基因分型、序列匹配等方面HRM分析技术发挥着重要作用。Wittwer等[8]首次利用HRM技术鉴别已知位点单碱基杂合及纯合变异,随后HRM被广泛应用于已知或未知单碱基变异的筛查、基因分型、小片段插入缺失变异等检测。

8. 分子信标

分子信标(molecular beacon)是一种在5'和3'末端自身形成8个碱基左右的发夹结构的茎环双标记的

寡核苷酸链，两端的核酸序列互补配对，标记在一端的淬灭基团与标记在另一端的荧光基团紧紧靠近，并且不会产生荧光。分子信标的特点是灵敏度高，操作简单，检测成本低，被广泛应用于生物学和生物分析领域。童春义等[9]根据猪圆环病毒基因组为单链这一特点，设计出两条能够特异性识别 PCV2 基因序列的分子信标，构建出双分子信标检测体系。分子信标的不足之处就是杂交时探针不能肯定完全与模板结合，所以稳定性差。

9. 分子马达

分子马达，又名分子发动机，其本质是一类三磷酸腺苷(ATP)酶，利用化学能进行机械做功的纳米系统。这种微型马达以三磷酸腺苷酶为基础，依靠为细胞内化学反应提供能量的高能分子 ATP 为能源。分子马达独特的做功方式吸引了众多物理学家、化学家、生物学家对它进行研究，是生物物理的一个重要研究方向。张捷等[10]构建的针对副溶血性弧菌进行分子分型的 F₀F₁-ATPase 分子马达分子分型装置是基于 F₀F₁-ATPase 的质子转运和旋转特性，根据标记 F-DHPE 的荧光变化可以实时反映 F₀F₁-ATPase 的旋转情况，从而反映 F₀F₁-ATPase 的负载情况，达到检测抗原抗体的目的。

10. 纳米酶

纳米酶是一类既有纳米材料的独特性能，又有催化功能的模拟酶。纳米酶的出现改变了我们对无机纳米材料的认知，它将纳米材料内在的生物效应和新特性充分展现出来，丰富了模拟酶的研究，使其不仅仅局限于有机复合物，而可以将研究范围拓展到纳米材料。研究发现，4-巯基苯硼酸修饰的金@铂(Au@Pt)纳米颗粒可以通过静电作用吸附在大肠杆菌 O157:H7 (*E. coli* O157:H7)表面，利用 Au@Pt 纳米颗粒的过氧化物酶活性催化 TMB 氧化生成带有颜色的底物，通过溶液在 652 nm 处的吸光度与 *E. coli* O157:H7 的浓度在 $6\sim 7 \times 10^6$ cfu/mL 范围内成正比来检测 *E. coli* O157:H7。

11. 纳米 PCR 技术

纳米 PCR 技术是一些纳米材料如纳米金、量子点(Quantum dots, QDs)、碳纳米管等粒径为 1~100 nm 的固体纳米颗粒悬浮在液体中形成纳米流体，被应用到 PCR 扩增中，形成了纳米基因扩增技术(NanoPCR)。由于纳米材料具有良好的导热性，与普通 PCR 相比，这一方法停留时间更短，灵敏度更高，检测率也更高。纳米 PCR 已经应用到狂犬病毒、脑炎病毒、博卡病毒等检测领域，袁万哲等[11]根据新城疫病毒(NDV) M 基因核苷酸序列设计引物，首次建立 NDV 纳米 PCR 检测方法，该方法对 NDV 的最低核酸检出量为 27 pg，比传统 PCR 敏感 10 倍，而对禽流感病毒、传染性法式囊病毒与传染性支气管炎病毒的检测结果均为阴性。可见纳米 PCR 技术是未来生物安全因子的临床快速检测与流行病学调查的一个重要手段。

12. 多重链接探针扩增技术

多重链接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)由荷兰 Schouten 博士于 2002 年发明，是一种高通量、针对待测核酸中靶序列进行检测和分析技术。该技术仅需 20 ng/ μ L 模板 DNA 或 RNA，即可通过简单的探针杂交、连接及 PCR 扩增和电泳步骤，在同一反应管中对多达 50 个不同的靶基因进行检测和分析。MLPA 被报道以来逐渐发展到传染病高通量检测。史喜菊等[12]建立了蓝舌病病毒(BTV)、牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛地方流行性白血病病毒(EBLV)和口蹄疫病毒(FMDV)五种牛病 MLPA 同步监测技术。多重链接探针扩增技术虽然用途广泛但也存在问题，如不能探测染色体结构异常、不能检测未知的点突变、探针设计耗时且困难等。

13. 高通量测序技术

高通量测序技术(high-throughput sequencing, HTS)是指以一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子的序列测定和一般读长较短等为标志的技术, 主要包括以 Illumina/Solexa, Roche/454, ABI/SOLID 为代表的第 2 代测序技术。由于 HTS 能够对 1 个物种的基因组和转录组进行深入细致的研究, 因此又被称为深度测序技术(deep sequencing)。HTS 一直应用于新病毒的发现, 许多病毒和菌株用这种方法被鉴别出来, 包括 2013 年 Bialasiewicz 等[13]新发现的副流感病毒。针对基因组序列未知的物种, 科学家主要利用高通量测序技术中无参考基因组的转录组测序和基因组从头测序构建不同类型的基因组 DNA 文库, 并进行序列测定, 然后使用生物信息学方法对测序得到的序列进行拼接、组装等。总体来看高通量测序是对传统测序一次革命性的改变, 在单个碱基层面上具有价格优势, 但是在单个反应层面仍显昂贵, 从样本的制备到数据获得一般需要 2~3 天, 一个反应所产生的大量数据还需经验丰富的生物信息学专业人员进行分析, 这也是限制高通量测序发展的障碍。

14. 宏基因组学技术

宏基因组学, 又称环境基因组学(environmental genomics), 是对特定生境中的全部可培养及未培养微生物种系直接进行的基因组研究分析, 主要分析微生物的进化、微生物种群生态分布、群体遗传特征、基因功能及相互作用的新兴学科领域。从广义上讲, 宏基因组是一定环境中所有微生物遗传物质的总和。而从狭义上讲, 则是生态环境中所有细菌以及真菌的遗传物质的总和。宏基因组学技术能寻找新基因、研究群落中微生物多样性的新途, 发现极端空间中存在的特殊生物群体或特殊基因资源, 它的兴起填补了未可培养微生物研究的空白, 成为国际微生物学研究的热点。宏基因组学对于预测新发人兽共患病的流行, 深入理解病毒在某些自然宿主或中间宿主的中病原生态学分布十分重要。例如蝙蝠作为很多人兽共患病的自然传播宿主, 具有十分广泛的地理分布, 但蝙蝠体内的病毒多样性却很少研究。通过基于 Solexa 高通量测序的病毒宏基因组学技术对从吉林、云南、湖南采集的蝙蝠组织进行病毒组学研究, 发现蝙蝠携带有 60 多种病毒, 其中许多对人有高度致病性, 这对于预测人兽共患病具有重要价值[14]。

15. 基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱技术

基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近几年发展起来的一种全新的用于微生物鉴定和分型的技术, 主要由基质辅助激光解析电离离子源(MALDI)、飞行时间质量分析其(TOF)及检测器组成, 能够完成多种成分包括脂类、糖类、蛋白质、多肽等能被离子化的分子的分析, 已越来越多地用于微生物的检测与鉴定。Barbuddhe 等[15]将同属于单增李斯特菌属的血清型分别为 4a 和 4c 的菌株区分开, 不同血清型李斯特菌的特征性峰值不同表明 MALDI-TOF-MS 可以有效鉴别李斯特菌及其亚型, 结果的可信度高, 进一步验证该技术在微生物鉴定方面的可靠性。MALDI-TOF-MS 缩短了微生物实验, 目前需要更多的菌株进行验证, 扩充数据库, 并对前处理技术标准化, 更好地应用于生物安全因子的鉴定。

16. 表面等离子体共振技术

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR), 并以其高灵敏度、无需标记等优点逐渐受到越来越多的科学家的关注。随着生物传感器的高速发展, Liedberg 于 1983 年首次将表面等离子体共振应用于气体检测, 开辟了将 SPR 应用于化学检测的新纪元。而 SPR 监测技术可以实现检测芯片表面生物分子之间的相互作用, 被广泛地用于环境监测、医疗检测、药物筛选等诸多领域。SPR 技术应用于生物传感器领域研究产生的第一个传感器就是免疫传感器-检测了人体免疫球蛋白 IgG 和抗 IgG 抗体之间相互

作用。随后, SPR 生物传感器便用于各种蛋白质或多肽与其相应抗体如转基因 Cry1Ac 蛋白与其单克隆抗体、纤维蛋白原与其抗体、多肽与其单克隆抗体等之间反应的监测。另外, SPR 生物传感器对病原性微生物的监测也有广泛应用, 例如对非典型肺炎(SARS)病毒、禽流感病毒、狂犬病病毒、伯氏疏螺旋体等的检测。SPR 免疫传感器已被用来检测多种抗病毒病原体的特异性抗体, 其中包括肝炎病毒(hHBV)抗体、EB 病毒核抗原(EBNA)抗体、疱疹病毒(HSV)抗体、呼吸道合胞病毒(RSV)抗体等。此外, Kim 等[16]利用结合有蛋白质阵列技术的光谱 SPR 实现了人体血清中抗腮腺炎病毒特异性抗体的高通量分析, 该项技术不仅简单快速、无标记, 也是首次将基于阵列的 SPR 传感器应用于病毒感染疾病的检测。SPR 技术有难以区分非特异性吸附及对温度、样品组成等干扰敏感的问题, 其发展主要围绕提高检测灵敏度、高通量检测、与质谱等高分辨仪器联用、敏感器件及测量装置微型化等方向进行。

17. 实时震动诱导蛋白扩增技术

实时震动诱导蛋白扩增(real-time quaking-induced conversion, RT-QuIC)技术目前只应用于朊蛋白检测。哺乳动物的朊病毒病, 包括人类的克雅氏病(CJD)、绵羊和山羊的羊瘙痒病、牛的疯牛病(BSE)、麋鹿的慢性消耗性疾病(CWD)。一些研究团队已经开展了应用 RT-QuIC 检测克雅氏病患者脑脊液的研究。应用 RT-QuIC 对散发型克雅氏病患者脑脊液的检测不受腰椎穿刺的时间影响, 因此不会因为在病程早期穿刺而出现假阴性。重组 PrPC 蛋白对 RT-QuIC 反应至关重要, 重组 PrPC 蛋白需要在 PrP^{Sc} 的存在下发生构象改变, 但决不能自发发生构象改变。最近出现了一种新的重组 PrPC 蛋白-仓鼠 PrP 蛋白 90-231 片段, 新的底物还能够缩短反应时间, 提高检出阈值。对这种新的重组 PrPC 蛋白还需要更多的研究结果来评价。

18. 电场诱导的释放与监测技术

电场诱导的释放与监测技术(Electric Field-induced Release and Measurement, EFIRM)创造性地采用导电高分子聚合材料超高活性分子探针固定、电场瞬间快速捕获靶标分子同时控制并加速分子杂交过程、捕获分子信号特异放大三大核心专利技术, 从而实现无需核酸提取、无需 PCR 扩增, 直接快速检测痕量基因。EFIRM 技术是一种简便、快速、高效的新一代实用性基因碎片监测技术, 该方法可在较小体积(50 μ L)的生物流体中以一种集成和高效的方式快速分析致癌基因突变。目前有关 EFIRM 技术的研究资料相对较少, 且主要是针对人体液中癌症相关基因检测。EFIRM 技术适用于 ctDNA、SNP、非编码 RNA、mRNA、蛋白等多种类型生物标记物的检测, 目前商品化的检测试剂盒有结核分枝杆菌核酸快速检测试剂盒、HIV 抗原抗体联合检测试剂盒、寨卡(Zika)病毒核酸快速检测试剂盒等。

各个新型诊断技术各有特点, 也各有待提升的空间, 等温核酸扩增技术(LAMP、RPA、SAT 等)在植物检疫领域应用较少, 发展空间较大; 分子信标灵敏度高、检测简单, 但是稳定性有待提高; 高通量测序耗时长, 专业度较高; 分子马达、纳米酶、宏基因组学、基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱技术、实时震动诱导蛋白扩增技术、电场诱导的释放与监测技术等还需要更多的关于生物安全因子检测的研究。近年来, 随着各学科技术的飞速发展, 使得学科间的相互联系更加紧密, 学科间的交叉研究领域逐渐成为科学研究的前沿地带, 在生物安全因子的检测方面分子生物学与材料学、生态学、大数据等领域的交互是国际研究的前沿和热点, 如 PCR 与纳米技术、宏基因组学技术等。未来生物安全诊断技术将向更快速、更便捷、更低价的方向发展, 为人类生命安全保驾护航。

基金项目

辽宁省自然科学基金项目(20180551266)。

参考文献

- [1] 林佳琪, 苏国成, 苏文金, 等. 数字 PCR 技术及应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2017, 33(2): 170-177.
- [2] Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. (2005) Detection of *Salmonella enterica* in Naturally Contaminated Liquid Eggs by Loop-Mediated Isothermal Amplification and Characterization of Salmonella Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **11**, 6730-6735. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6730-6735.2005>
- [3] Rohrman, B.A. and Richards-Kortum, R.R. (2012) A Paper and Plastic Device for Performing Recombinase Polymerase Amplification of HIV DNA. *Lab Chip*, **12**, 3082-3088. <https://doi.org/10.1039/c2lc40423k>
- [4] Kersting, S., Rausch, V. and Bier, F.F. (2014) Multiplex Isothermal Solid-Phase Recombinase Polymerase Amplification for the Specific and Fast DNA-Based Detection of Three Bacterial Pathogens. *Microchimica Acta*, **181**, 1715-1723. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1198-5>
- [5] Anner, H.M., Abd Ei Wahed, A., Shalaby, M.A., Almajhdi, F.N., Hufert, F.T. and Weidmann, M. (2013) A New Approach for Diagnosis of Bovine Coronavirus Using a Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Journal of Virological Methods*, **193**, 337-340. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.027>
- [6] 张小平, 郑乐怡, 魏莹, 郭利川, 应清界, 吕沁风, 吴忠华, 郑伟. 重组酶介导扩增技术快速检测沙门菌方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2017, 40(5): 317-319.
- [7] 肖剑, 陈秀云, 梁美丹, 陈楷, 洪红, 焦红. 基于实时荧光核酸恒温扩增技术的食源性致病微生物检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 682-688.
- [8] Wittwer, C.T. (2010) Making DNA Melting Useful. *Clinical Chemistry: Journal of the American Association for Clinical Chemists*, **56**, 1500-1501. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.146175>
- [9] 童春义. 基于双分子信标对猪圆环病毒 II 型的简单快速检测[J]. 分析化学, 2014, 42(8): 1104-1109.
- [10] 张捷, 李兆杰, 王煜, 张惠媛, 陆琳, 王静, 刘岩, 顾德周, 汪琦, 张昕, 王佩荣, 乐加昌, 陈广全. 基于分子马达生物传感器技术的副溶血性弧菌分子分型方法的初步研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1279-1289.
- [11] 袁万哲, 邹云婧, 孙继国, 陈立功, 刘静, 王庚南, 刘聚祥. 检测新城疫病毒的纳米 PCR 技术建立与初步应用[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(1): 104-106.
- [12] 史喜菊, 马贵平, 柏亚铎, 郝俊虎, 乔彩霞, 刘全国, 李炎鑫, 李冰玲. 多重连接探针扩增对 5 种牛病毒同步检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(2): 224-230.
- [13] Bialasiewicz, S., Mevernon, J., Nolan, T., Lambert, S.B., Zhao, G.Y., Wang, D., Nissen, M.D. and Sloots, T.P. (2014) Detection of a Divergent Parainfluenza 4 Virus in an Adult Patient with Influenza like Illness Using Next-Generation Sequencing. *BMC Infectious Diseases*, **14**, 275. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-275>
- [14] 杨凡力, 王意银, 郑文成, 何彪, 江廷磊, 李莹莹, 夏乐乐, 冯焯, 范泉水. 中国部分地区蝙蝠携带病毒的宏基因组学分析[J]. 生物工程学报, 2013, 29(5): 586-600.
- [15] Barbuddhe, S.B., Doijad, S.P., Goesmann, A., Hilker, R., Poharkar, K.V., Rawool, D.B., Kurkure, N.V., Kalorey, D.R., Malik, S.S., Shakuntala, I., Chaudhari, S., Waskar, V., D'Costa, D., Kolhe, R., Arora, R., Roy, A., Raorane, A., Kale, S., Pathak, A., Negi, M., Kaur, S., Waghmare, R., Warke, S., Shoukat, S., Harish, B., Poojary, A., Madhavaprasad, C., Nagappa, K., Das, S., Zende, R., Garg, S., Bhosle, S., Radriguez, S., Paturkar, A., Fritzenwanker, M., Ghosh, H., Hain, T. and Chakraborty, T. (2016) Presence of a Widely Disseminated *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Clone in India. *Emerging Microbes & Infections*, **5**, e55. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.55>
- [16] Kim, H.S., Jung, S.H., Kim, S.H., Suh, I.B., Kim, W.J., Jung, J.W., Yuk, J.S., Kim, Y.M. and Ha, K.S. (2006) High-Throughput Analysis of Mumps Virus and the Virus-Specific Monoclonal Antibody on the Arrays of a Cationic Polyelectrolyte with a Spectral SPR Biosensor. *Proteomics*, **6**, 6426-6432. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600432>