

网络出版时间:2024-07-31 11:56 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2025.02.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1390.s.20240730.1237.002

猪圆环病毒 3 型 LAMP-PfAgo 检测方法的建立

祁钊,余相宇,陈魏圆,宋祥军

(安徽农业大学 兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室,安徽省动物性食品质量与生物安全工程重点实验室,安徽 合肥 230036)

【摘要】【目的】利用 PfAgo 蛋白结合环介导等温扩增技术(LAMP)建立一种新的 PCV3 检测方法 LAMP-PfAgo 法,用于 PCV3 的快速鉴别诊断。【方法】PCR 扩增 PCV3 *Rep* 基因,构建重组阳性质粒 pMD19-T-PCV3-Rep,对其进行 PCR 和测序鉴定。根据 PCV3 *Rep* 基因的保守区域设计 PCV3-T1~PCV3-T4 等 4 组引物(每组包括 1 对内引物和 1 对外引物),以 pMD19-T-PCV3-Rep 为模板进行 LAMP,筛选最佳引物组,并对 LAMP 反应的 Mg^{2+} 浓度、内外引物浓度、反应温度、反应时间进行优化。根据 PCV3 *Rep* 基因的保守序列,设计 PCV3-gs1~PCV3-gs5 等 5 组 gDNAs 和一条特异性探针,进行 LAMP-PfAgo 反应,筛选最佳的 gDNAs,并对 LAMP-PfAgo 反应体系中 PfAgo 蛋白浓度、gDNAs 浓度、 Mn^{2+} 浓度和反应时间进行优化。对该 LAMP-PfAgo 方法的特异性、敏感性进行评价;并用该方法 and 实时荧光定量 PCR 方法对疑似感染 PCV3 的 46 份临床样品进行检测,比较结果的一致性。【结果】重组阳性质粒 pMD19-T-PCV3-Rep PCR 和测序均获得了 891 bp 的序列,表明重组阳性质粒构建成功。LAMP 最佳引物为 PCV3-T1,最佳 Mg^{2+} 终浓度为 6 mmol/L,最佳内外引物终浓度分别为 1.6 和 1.2 μ mol/L,最适的反应温度 65 $^{\circ}C$,最佳反应时间 60 min。使用优化后的 LAMP 反应条件对 PCV3 *Rep* 基因保守序列进行扩增,并将其用于后续试验。LAMP-PfAgo 反应最佳的 gDNAs 为 PCV3-gs1;优化后的 PfAgo 蛋白终浓度为 40 U/ μ L, gDNAs 终浓度为 1.50 μ mol/L, Mn^{2+} 终浓度为 1.50 mmol/L,反应时间为 30 min。LAMP-PfAgo 法的灵敏度为 10 拷贝/ μ L,且与猪圆环病毒 2 型、猪细小病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪瘟病毒及猪伪狂犬病毒等常见猪源病原核酸无交叉反应。临床样本检测结果显示,LAMP-PfAgo 法与实时荧光定量 PCR 方法检测结果的符合率为 100%。【结论】基于 PfAgo 蛋白结合 LAMP 技术建立了对 PCV3 的核酸检测方法,该方法灵敏度高和特异性强,具有潜在的临床应用价值。

【关键词】 猪圆环病毒 3 型;PfAgo;环介导等温扩增;即时检验;猪

【中图分类号】 S855.3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2025)02-0001-09

Establishment of LAMP-PfAgo detection method for porcine circovirus 3

QI Zhao, YU Xiangyu, CHEN Weiyuan, SONG Xiangjun

(Anhui Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Prevention and Control, Anhui Key Laboratory of Animal Food Quality and Biosafety Engineering, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract:【Objective】A new detection method for porcine circovirus 3 (PCV3) by *Pyrococcus furiosus* Argonaute (PfAgo) protein combined with loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) was established in this study.【Method】PCV3 *Rep* gene was amplified using PCR, and the recombinant positive plasmid pMD19-T-PCV3-Rep was constructed. PCR and sequencing were conducted to confirm its identity. According to the conserved region of PCV3 *Rep* gene, four sets of primers (one pair of inner primers and one pair of outer primers), including PCV3-T1-PCV3-T4, were designed. The LAMP reaction was carried

【收稿日期】 2023-11-06

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(32202891);安徽省重点实验室开放项目(XM2201)

【作者简介】 祁钊(1990-),男,安徽淮北人,实验师,博士,主要从事生物信息与兽医病理学研究。

E-mail: qizhao1050@ahau.edu.cn

【通信作者】 宋祥军(1987-),男,山东临沂人,副教授,博士,主要从事兽医病理生物学与疫病防控研究。E-mail: sxj@ahau.edu.cn

out using pMD19-T-PCV3-Rep as a template, the optimal primer set was screened, and Mg^{2+} concentration, inner and outer primers concentrations, reaction temperature and reaction time of the LAMP reaction were optimized. Based on the conserved sequence of PCV3 *Rep* gene, a total of 5 sets of gDNAs of PCV3-gs1—PCV3-gs5 and specific probes were designed. Then, the LAMP-PfAgo reaction was performed to screen the best gDNAs and optimize the PfAgo protein concentration, gDNAs concentration, Mn^{2+} concentration and reaction time in the LAMP-PfAgo reaction system. Subsequently, the specificity and sensitivity of the LAMP-PfAgo method were evaluated. A total of 46 clinical samples suspected to be infected with PCV3 were detected with the established method, and the results were compared with qPCR results. **【Result】** The PCR and sequencing of the recombinant positive plasmid pMD19-T-PCV3-Rep consistently produced an 891 bp sequence, indicating that the construction of recombinant positive plasmid was successful. The optimal primer set for LAMP was PCV3-T1, with an optimal Mg^{2+} final concentration of 6 mmol/L, optimal inner primers and outer primers final concentrations of 1.6 and 1.2 $\mu\text{mol/L}$, an optimal reaction temperature of 65 $^{\circ}\text{C}$ and an optimal reaction time of 60 min. The conserved sequence of PCV3 *Rep* gene was amplified using optimized LAMP reaction conditions and used for subsequent experiments. The optimal gDNAs for the LAMP-PfAgo reaction were PCV3-gs1, the optimized final concentration of PfAgo protein was 40 U/ μL , the final concentration of gDNAs was 1.50 $\mu\text{mol/L}$, the final concentration of Mn^{2+} was 1.50 mmol/L, and the reaction time was 30 min. The LAMP-PfAgo method had a sensitivity of 10 copies/ μL and no cross-reactivity with pig-derived pathogens such as porcine circovirus 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), classical swine fever virus (CSFV) and porcine pseudorabies virus (PRV). The established method and qPCR were 100% in compliance for the detection of PCV3 clinical samples. **【Conclusion】** A nucleic acid detection method based on PfAgo protein combined with LAMP technology was established for PCV3, and it had high sensitivity and strong specificity with potential clinical application.

Key words: porcine circovirus 3 (PCV3); PfAgo; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); point-of-care testing (POCT); pig

猪圆环病毒 3 型 (porcine circovirus 3, PCV3) 是一种单链环状 DNA 病毒, 其基因组长度约 2 000 bp, 具有 2 个反向排列的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 分别编码复制酶 (296 个氨基酸) 和衣壳蛋白 (214 个氨基酸)^[1]。编码衣壳蛋白的 ORF 序列是保守的, 常被用作分子生物学诊断的靶标^[2-3]。PCV3 最早于 2016 年在美国被发现, 其感染可导致猪生殖障碍、皮肤病、多系统炎症^[1] 和病毒血症^[4]。从那时起, PCV3 在全球范围内广泛传播, 包括南美洲^[5]、欧洲^[6] 以及亚洲, 特别是在中国^[7] 和韩国^[8] 流行较严重。目前, 国内有关 PCV3 的流行传播和遗传变异已有不少研究报道^[9-13], 在部分母猪更新率较高、后备猪较多的猪场, PCV3 引发了较为典型的临床症状, 造成了巨大的经济损失^[14]。现如今, 已经有多种 PCV3 的检测方法, 其中包括免疫学方法、基于 PCR 的方法、等温扩增、原位杂交、宏基因组测序技术等^[15-20], 为监测和控制 PCV3 的传播提供了有效的技术手段。免疫学方法虽然简便、

迅速且可检测抗体, 但在灵敏度和特异性方面仍有待提高; 基于 PCR 的方法虽然灵敏度高、特异性强, 但其操作需要专业技术人员, 且需昂贵的设备, 在实际应用中存在一定的局限性; 原位杂交、宏基因组测序无法满足 PCV3 现场快速检测需求。等温扩增技术作为 PCR 的替代方法, 具有所需设备简单、反应迅速等优势, 尽管在引物设计上可能面临一些挑战, 但高效、便捷的特性使其成为备受青睐的病原体检测技术^[21]。环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一种门槛低、反应迅速的核酸扩增技术。大量的 LAMP 技术在即时检验 (point-of-care testing, POCT) 中的应用研究表明, LAMP 在临床上具有巨大的应用潜力^[22]。原核 Argonaute (pAgo) 蛋白可识别具有互补序列的靶 RNA 或 DNA。与目前流行的基于聚类规则间隔短回文重复序列及其相关蛋白系统的 POCT 相比, pAgo 蛋白因具有不需要 PAM 序列、使用的向导 DNA (gDNA) 较短、蛋白质体积较小等优势, 已成为

病毒 POCT 领域的新兴工具^[23]。激烈火球菌 *Argonaute* 蛋白(*Pyrococcus furiosus argonaute*, PfAgo)属于 pAgo 家族,其核酸裂解系统具有很好的设计灵活性和可操控性,能够精确识别 DNA 的特定区域,已成功应用于双链 DNA 的定向酶切,实现病原微生物的快速检测^[24]。XUN 等^[25]已经成功地利用反转录酶环介导等温扩增(RT-LAMP)和 PfAgo 蛋白建立了快速、准确的 2019 冠状病毒病诊断测试系统。GUO 等^[26]使用 PfAgo 蛋白结合等温扩增技术,建立了速度快、灵敏度高的对虾急性肝胰腺坏死病的诊断方法。这些研究为将 PfAgo 与 LAMP 等温扩增相结合进行病原的分子诊断提供了良好的实践范例。

迄今为止,尚未见将 PfAgo 蛋白与等温扩增相结合用于检测 PCV 的报道。为此,本研究建立了一种基于 LAMP-PfAgo 技术的 PCV3 检测方法,旨在加强对 PCV3 的鉴别诊断,为更有效地控制该病原体的传播提供有效的诊断手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原 临床病料(心脏、肾脏、脾脏、肝脏、肺脏等,共 46 份),采集自安徽地区某感染 PCV3 养猪场。猪细小病毒(*porcine parvovirus*, PPV)病料(淋巴结,1 份)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)病料(淋巴结,1 份)、猪传染性胃肠炎病毒(*transmissible gastroenteritis virus*, TGEV)病料(肠道,1 份),均由安徽省兽医病理生物学与疫病防控重点实验室鉴定并保存。猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(*porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV)弱毒苗毒株 R98、猪伪狂犬病毒(*porcine pseudorabies virus*, PRV)弱毒苗毒株 HB-98、猪瘟病毒(*classical swine fever virus*, CSFV)弱毒苗毒株 AV1412,均来自中牧实业股份有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 $2\times$ *Taq* Master Mix, 购于翊圣生物科技(上海)有限公司。pMD19-T 载体,由安徽省兽医病理生物学与疫病防控重点实验室保存。质粒提取试剂盒,购于天根生化科技(北京)有限公司。DNA 胶回收试剂盒,购于生工生物工程(上海)有限公司。大肠杆菌 DH-5 α 感受态细胞,购于擎科生物科技(南京)有限公司。PfAgo Endonuclease, 购于交弘生物科技(上海)有限公司。Bst DNA Polymerase Large Fragment、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、病毒基因组 DNA/

RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒,均购于诺唯赞生物科技(南京)有限公司。T4 多聚核苷酸激酶,购于 NEB(北京)有限公司。BIO-Pro 200 M 凝胶成像系统、MyCycler PCR 扩增仪,均为美国伯乐有限公司产品。Micro220R 离心机,为德国 RHeitich 科学仪器公司产品。StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪,为赛默飞世尔科技有限公司产品。

1.2 核酸提取及反转录

称取各病料组织样品 1 g 放入研磨钵中,加入 1 mL PBS 后研磨成匀浆,移至无菌 EP 管中,将 EP 管放入离心机中,8 000 r/min 离心 3 min,取上清液。采用 DNA/RNA 提取试剂盒提取病料和弱毒苗中的病毒核酸,再利用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录为 cDNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 标准阳性重组质粒的制备

参考 GenBank 公布的 PCV3 *Rep* 基因序列(GenBank 登录号:KY 075988.1),使用 PrimePremier 5.0 软件设计全长扩增引物,用于扩增 *Rep* 基因序列。引物的序列为:PCV3-Rep-F: 5'-GTCCG-GAGGGAAAGCC-3', PCV3-Rep-R: 5'-TCAATA-GTTTATTGGATACTGTC-3', 预期扩增片段长度为 891 bp。以 1.2 节提取的 PCV3 DNA 为模板,PCR 扩增目的基因 *Rep*, PCR 反应体系为: $2\times$ Phanta Max Buffer 25 μL , Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, dNTP Mix (10 mmol/L)、cDNA 模板各 1 μL , 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , 补加 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。将得到的 *Rep* 片段连接至 pMD19-T 载体,转化到 DH-5 α 感受态细胞,构建标准阳性重组质粒。对构建的标准阳性重组质粒进行 PCR 鉴定(PCR 的反应体系和条件同上),同时送至通用生物(安徽)有限公司测序。将 PCR 鉴定结果为阳性且测序结果与基因序列比对正确的质粒命名为 pMD19-T-PCV3-Rep, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 LAMP 引物设计与筛选

根据 PCV3 *Rep* 基因的保守序列,使用 Primer Explorer V5 软件设计 PCV3-T1、PCV3-T2、PCV3-T3、PCV3-T4 等 4 组 LAMP 特异性扩增引物,每组引物包括 2 条外引物(F3、B3)和 2 条内引物(FIP、BIP),序列如表 1 所示,由通用生物系统(安徽)有限公司合成。

LAMP 扩增反应体系: $10\times$ ThermoPol Buffer 2.5 μL , MgSO₄ (终浓度 6 mmol/L) 1.5 μL , dNTP

Mix(终浓度 1.4 mmol/L)3.5 μ L, FIP 和 BIP 引物(终浓度 1.6 μ mol/L)各 4 μ L, F3 和 B3 引物(终浓度 0.2 μ mol/L)各 0.5 μ L, Bst DNA Polymerase Large Fragment(终浓度 8 U/ μ L)1 μ L, 不同浓度($10^4 \sim 10^0$ 拷贝/ μ L)模板 pMD19-T-PCV3-Rep 1 μ L, 加 Nuclease-free Water 至 25 μ L。LAMP 扩增反应条件:将混合液先 65 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1 h 进行等温

扩增,再 80 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 使酶失活,避免产生非特异性扩增。阴性对照(no template control, NTC)以 ddH₂O 代替模板进行反应。分别使用上述 4 组 LAMP 引物组进行 LAMP 扩增反应,产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析(电压 100 V, 时间 30 min),根据试验结果筛选最佳引物组。

表 1 PCV3 *Rep* 基因的 LAMP 引物信息

Table 1 LAMP primer information of PCV3 *Rep* gene

引物组别 Primer group	引物类别 Primer type	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence(5'→3')
PCV3-T1	外引物 Outer primer	T1-F3	CAGCAGCTCGGATTCTGAC
		T1-B3	GCTGAATCCGCACAAGCT
	内引物 Inner primer	T1-FIP	CACGCAAACCCCGCCCATAGGGAGACGTCGGGAAATCTGA
		T1-BIP	GGTGATGGGGTTGGGTAAACCGCGTTTTCCCGCATCCTGG
PCV3-T2	外引物 Outer primer	T2-F3	CGGATTCTGACGGAGACGT
		T2-B3	GCTGAATCCGCACAAGCT
	内引物 Inner primer	T2-FIP	CACGCAAACCCCGCCCATAGTGACTGAAGTTGCGGAGAAG
		T2-BIP	GGTGATGGGGTTGGGTAAACCGCGTTTTCCCGCATCCTGG
PCV3-T3	外引物 Outer primer	T3-F3	ACTTGCAAGGGTACGTGAAT
		T3-B3	ATCTGGTACCCGAAGAGGAA
	内引物 Inner primer	T3-FIP	TCCAGATGGGCCCGACCAAAGAACAAAAGGCGACTCAGCT
		T3-BIP	CGAGGGGGAGCCACAAAGAGTCTTCGCCAATCTCGAGGTA
PCV3-T4	外引物 Outer primer	T4-F3	AACAAAAGGCGACTCAGCT
		T4-B3	CTCCGCAACTCAGTCAGAT
	内引物 Inner primer	T4-FIP	CTGGCCTCTTGTGGCTCCCGCGCTTACCCGATTTGG
		T4-BIP	TGGCGAAGATTCTCTTCGGGCCGACGTCTCCGTCAGAA

1.5 LAMP 反应条件的优化

参考 1.4 中的 LAMP 反应体系,以 10^4 拷贝/ μ L 的 pMD19-T-PCV3-Rep 为阳性模板, NTC 以 ddH₂O 代替模板,对 1.4 中的 LAMP 反应体系和条件进行优化,保持 LAMP 反应体系中其他组分终浓度不变, Mg²⁺ 终浓度分别设 2, 4, 6, 8, 10 mmol/L;体系内外引物终浓度分别设:内引物 1.6 μ mol/L、外引物 0.2 μ mol/L,内引物 1.6 μ mol/L、外引物 0.4 μ mol/L,内引物 1.6 μ mol/L、外引物 0.8 μ mol/L,内引物 1.6 μ mol/L、外引物 1.2 μ mol/L,内引物 1.6 μ mol/L、外引物 1.6 μ mol/L;反应温度分别设 61,62,63,64,65 $^{\circ}$ C;反应时间分别设 30,45,60,75,90 min。对扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳(电压 100 V, 时间 30 min)分析,确定最佳反应条件,用于后续试验。

1.6 PCV3 LMAP-PfAgo 检测方法的建立

本研究拟建立的 PCV3 检测方法是将组织样本中提取的 PCV3 核酸或构建的重组质粒经 LAMP 等温扩增后作为模板,加入到 PfAgo 蛋白切割体系中进行反应,反应产物使用实时荧光定量 PCR 仪测定荧光值,通过荧光值大小判断是否呈阳性。

1.6.1 gDNAs 的合成及筛选 根据 PCV3 *Rep* 基因的保守序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCV3-gs1、PCV3-gs2、PCV3-gs3、PCV3-gs4、PCV3-gs5 共 5 组 gDNAs 和特异性探针(MB),gDNAs 序列如表 2 所示,由通用生物系统(安徽)有限公司合成。探针(MB)由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成,序列为:5'-6-FAM-CGCACCTTGCGTGATTTT-TGCGGGGTGAGGTGCGBHQ1-3'。将每组 gDNAs 中的 3 条序列用 T4 多聚核苷酸激酶进行 5'端磷酸化处理,等体积混合均匀,得到试验使用的 gDNAs。

PfAgo 蛋白介导的 PCV3 检测方法预反应体系为: PfAgo(终浓度 20 U/ μ L) 2 μ L, gDNAs(终浓度 1.8 μ mol/L) 6 μ L, Mn²⁺(终浓度 2 mmol/L) 1 μ L, Reaction Buffer(10 \times) 2 μ L, 特异性探针(10 μ mol/L)1 μ L, 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。

根据上述的 PfAgo 蛋白介导的核酸预反应体系,将 10^4 拷贝/ μ L 的 pMD19-T-PCV3-Rep 经等温扩增后作为阳性模板,使用不同组别的 gDNAs 引导 PfAgo 蛋白切割扩增后的双链 DNA 靶标,用实时荧光定量 PCR 仪测定反应产物荧光值,根据荧光值大小筛选出最佳 gDNAs。

表 2 用于检测 PCV3 *Rep* 基因的 gDNAs
Table 2 gDNAs for detecting PCV3 *Rep* gene

gDNAs 组别 gDNAs group	gDNAs 名称 gDNAs name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	gDNAs 组别 gDNAs group	gDNAs 名称 gDNAs name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
PCV3-gs1	PCV3-gf 1	ATTTTTGCGGGGTGAT	PCV3-gs4	PCV3-gf 4	TTTGCGGGGTGATGGG
	PCV3-gt 1	GGGCGGGGTTTGCGTG		PCV3-gt 4	CGGGGTTTGCGTGATT
	PCV3-gr 1	CCCCATCACCCGCAA		PCV3-gr 4	CAACCCCATCACCCG
PCV3-gs2	PCV3-gf 2	TTTTTGCGGGGTGATG	PCV3-gs5	PCV3-gf 5	TTTGCGGGGTGATGGGG
	PCV3-gt 2	GGCGGGGTTTGCGTGA		PCV3-gt 5	GGGGTTTGCGTGATTT
	PCV3-gr 2	ACCCCATCACCCGCA		PCV3-gr 5	CCAACCCCATCACCC
PCV3-gs3	PCV3-gf 3	TTTTTGCGGGGTGATGG			
	PCV3-gt 3	GCGGGGTTTGCGTGAT			
	PCV3-gr 3	AACCCCATCACCCGC			

1.6.2 PfAgo 蛋白介导的 PCV3 检测条件的优化
将 10^4 拷贝/ μL 的 pMD19-T-PCV3-Rep 经等温扩增后作为阳性模板,对上述预反应体系中的 PfAgo 蛋白浓度、gDNAs 浓度、 Mn^{2+} 浓度及反应时间进行优化。在 gDNAs 终浓度为 $1.8 \mu\text{mol/L}$ 、 Mn^{2+} 终浓度为 2 mmol/L 、反应时间为 30 min 的条件下, PfAgo 蛋白终浓度分别设 $0, 10, 20, 30, 40, 50$ 和 $60 \text{ U}/\mu\text{L}$; 在 PfAgo 蛋白终浓度为 $20 \text{ U}/\mu\text{L}$ 、 Mn^{2+} 终浓度为 2 mmol/L 、反应时间为 30 min 的条件下, gDNAs 浓度分别设 $0, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50$ 和 $3.00 \mu\text{mol/L}$; 在 PfAgo 蛋白终浓度为 $20 \text{ U}/\mu\text{L}$ 、gDNAs 终浓度为 $1.8 \mu\text{mol/L}$ 、反应时间为 30 min 的条件下, Mn^{2+} 浓度分别设 $0, 0.50, 1.00, 1.50$ 和 2.00 mmol/L 。在最佳蛋白终浓度、gDNAs 终浓度、 Mn^{2+} 终浓度条件下,反应时间分别设置为 $5, 10, 15, 20, 25, 30$ 和 35 min 。反应设置温度为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$,测定反应产物荧光值,筛选出最优的反应条件。

1.7 敏感性试验

将 10^4 拷贝/ μL 的 pMD19-T-PCV3-Rep 作为阳性模板, ddH₂O 代替模板为 NTC, 进行敏感性试验,确定适用于检测 PCV3 阳性样品检测结果的判读标准。将 6 个不同浓度($10^5 \sim 10^0$ 拷贝/ μL)的重组质粒作为模板,使用优化后的条件进行 LMAP-PfAgo 试验,用荧光定量 PCR 仪测定反应产物的荧光值,确定所建立检测方法的敏感性。

同时用 6 个不同浓度($10^5 \sim 10^0$ 拷贝/ μL)的重组质粒为模板,参考 ZHAO 等^[27]的方法进行实时荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR 方法的引物序列为: PCV3-F: $5'-\text{TGTGGTGCTACGAATGTCC}-3'$, PCV3-R: $5'-\text{GGTATCTCG CTATACTGCCTC}-3'$ 。反应体系: SYBR Green Mix $10 \mu\text{L}$, 上游引物和下游引物($10 \mu\text{mol/L}$)各 $0.5 \mu\text{L}$, 模板 $1 \mu\text{L}$, ddH₂O $8 \mu\text{L}$ 。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 25 s , $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 25 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , 40 个循环。根据结果,确定实时荧光定量 PCR 法的敏

感性,并与本研究建立的方法的敏感性进行比较。

1.8 特异性试验

将 PCV2、PPV、PRV、CSFV、PRRSV、TGEV 核酸等温扩增后的产物作为模板,将重组质粒等温扩增后的产物作为阳性模板,以优化后的反应体系进行试验,测定反应产物的荧光信号,评估所建立方法的特异性。

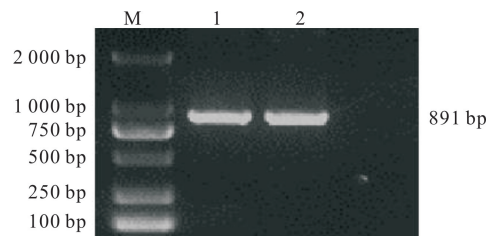
1.9 临床样本检测

使用所建立的 PCV3 检测方法对 46 份疑似感染 PCV3 的样本进行检测,同时用 1.7 节的实时荧光定量 PCR 方法对样本进行平行检测,比较两者检出率的一致性。

2 结果与分析

2.1 重组阳性质粒 pMD19-T-PCV3-Rep 的构建

使用引物 PCV3-Rep-F 和 PCV3-Rep-R 对构建的质粒 pMD19-T-PCV3-Rep 进行 PCR 鉴定,结果扩增出约 891 bp 的条带(图 1),符合预期结果。测序结果显示,扩增的片段长度为 891 bp 。结果表明,标准质粒构建成功,可作为阳性模板用于后续试验。



M. Spark 2000 DNA Marker; 1~2. PCV3 *Rep* 基因。

M. Spark 2000 DNA Marker; 1~2. PCV3 *Rep* gene.

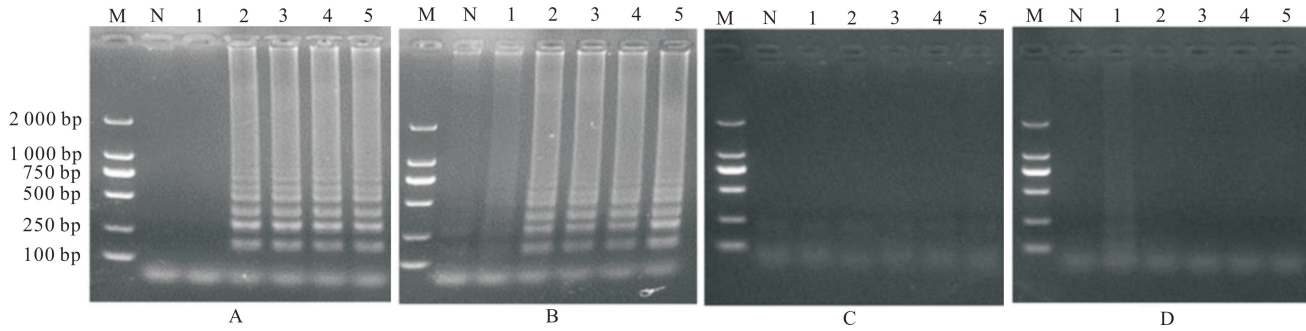
图 1 重组质粒 pMD19-T-PCV3-Rep PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of recombinant plasmid pMD19-T-PCV3-Rep

2.2 LAMP 引物筛选

PCV3-T1、PCV3-T2、PCV3-T3、PCV3-T4 等 4 组 LAMP 引物扩增结果(图 2)显示,引物组 PCV3-T1 扩增条带最清晰,且对不同拷贝数的模板具有良

好的扩增效果。因此,选择 PCV3-T1 作为 PCV3 的 LAMP 最佳扩增引物用于后续试验。



A. PCV3-T1; B. PCV3-T2; C. PCV3-T3; D. PCV3-T4; M. Spark 2000 DNA Marker; N. 阴性对照; 1~5 分别为 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 拷贝/ μ L 模板扩增结果。

A. PCV3-T1; B. PCV3-T2; C. PCV3-T3; D. PCV3-T4; M. Spark 2000 DNA Marker; N. No template control (NTC); 1-5. Amplification results of 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , and 10^4 copies/ μ L template, respectively.

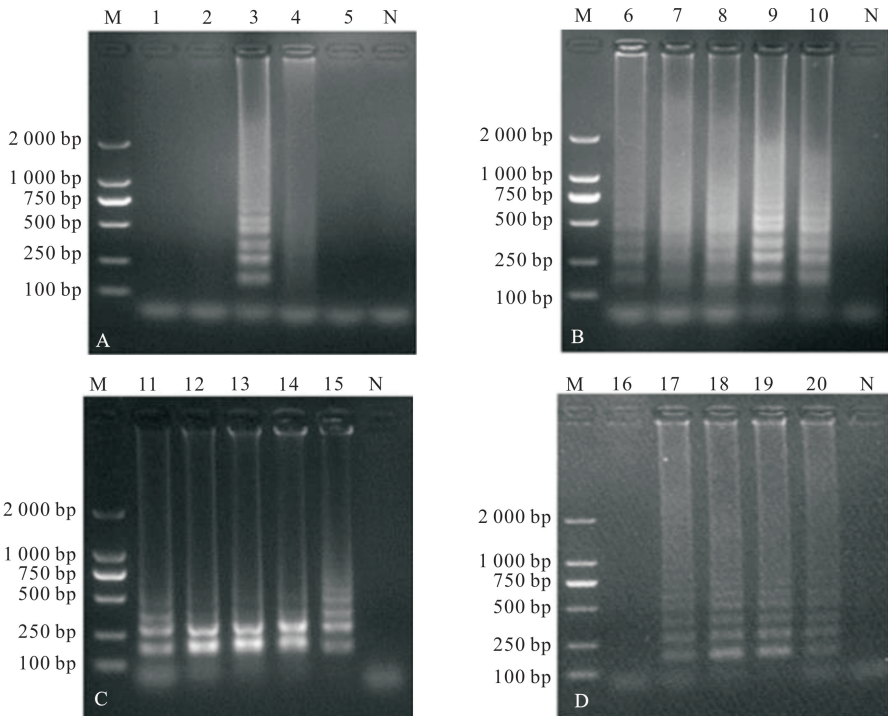
图 2 环介导等温扩增(LAMP)引物筛选

Fig. 2 Primers screening for loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

2.3 LAMP 反应体系和条件的优化

最佳内外引物浓度分别为 1.6 和 1.2 μ mol/L, 最佳反应温度为 65 $^{\circ}$ C, 最佳反应时间为 60 min。

图 3 显示,反应体系中最佳 Mg^{2+} 浓度为 6 mmol/L,



A. Mg^{2+} 浓度优化, 1~5. Mg^{2+} 浓度分别为 2, 4, 6, 8 和 10 mmol/L; B. 内外引物浓度优化, 6. 内引物 1.6 μ mol/L、外引物 0.2 μ mol/L, 7. 内引物 1.6 μ mol/L、外引物 0.4 μ mol/L, 8. 内引物 1.6 μ mol/L、外引物 0.8 μ mol/L, 9. 内引物 1.6 μ mol/L、外引物 1.2 μ mol/L, 10. 内引物 1.6 μ mol/L、外引物 1.6 μ mol/L; C. 反应温度优化, 11~15. 反应温度分别为 61, 62, 63, 64, 65 $^{\circ}$ C; D. 反应时间优化, 16~20. 反应时间分别为 30, 45, 60, 75, 90 min; M. Spark 2000 DNA Marker; N. 阴性对照。

A. Mg^{2+} concentration optimization, 1-5. Mg^{2+} concentration of 2, 4, 6, 8 and 10 mmol/L, respectively; B. Internal and external primer concentration optimization, 6. Inner primer 1.6 μ mol/L, Outer primer 0.2 μ mol/L, 7. Inner primer 1.6 μ mol/L, Outer primer 0.4 μ mol/L, 8. Inner primer 1.6 μ mol/L, Outer primer 0.8 μ mol/L, 9. Inner primer 1.6 μ mol/L, Outer primer 1.2 μ mol/L, 10. Inner primer 1.6 μ mol/L, Outer primer 1.6 μ mol/L; C. Optimization of reaction temperatures, 11-15. The reaction temperatures were 61, 62, 63, 64 and 65 $^{\circ}$ C, respectively. D. Optimization of reaction time, 16-20. The reaction times were 30, 45, 60, 75 and 90 min, respectively. M. Spark 2000 DNA Marker; N. No template control (NTC).

图 3 环介导等温扩增(LAMP)反应条件优化

Fig. 3 Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction conditions

2.4 最佳 gDNAs 的筛选

试验结果(图 4)表明,在 PCV3-gs1 引导下, PfAgo 蛋白切割反应产物的荧光值最高,这表明 PfAgo 蛋白在该 gDNAs 的引导下具有更好的切割效率。因此,选择 PCV3-gs1 组作为最佳 gDNAs。

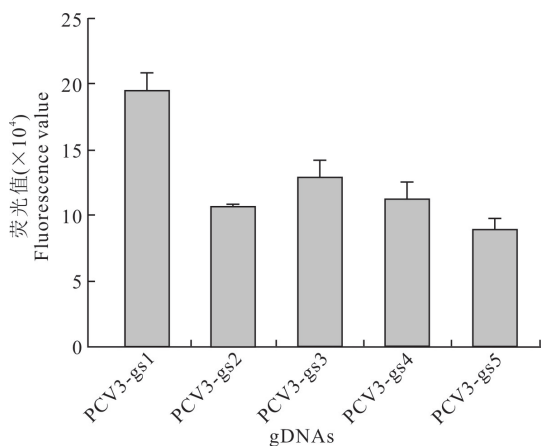
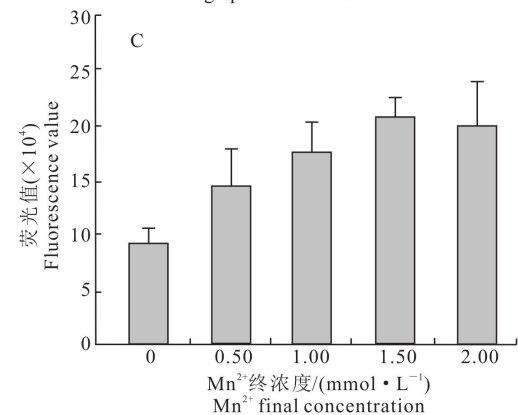
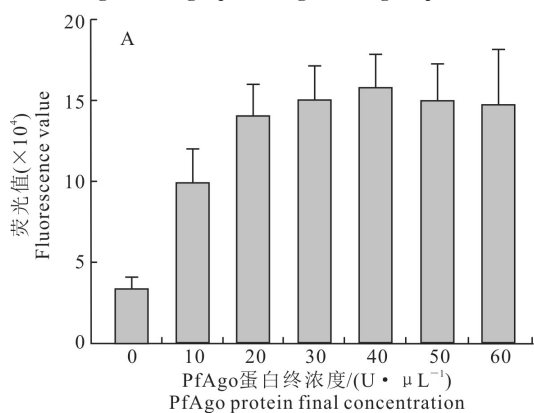


图 4 PCV3 的 PfAgo 蛋白 gDNAs 筛选

Fig. 4 Screening of PfAgo protein gDNAs group for PCV3



A. PfAgo 蛋白终浓度优化;B. gDNAs 终浓度优化;C. Mn^{2+} 终浓度优化;D. 反应时间优化。

A. PfAgo protein final concentration optimization;B. gDNAs final concentration optimization;C. Mn^{2+} final concentration optimization;D. Reaction time optimization.

图 5 PCV3 LAMP-PfAgo 检测方法条件的优化

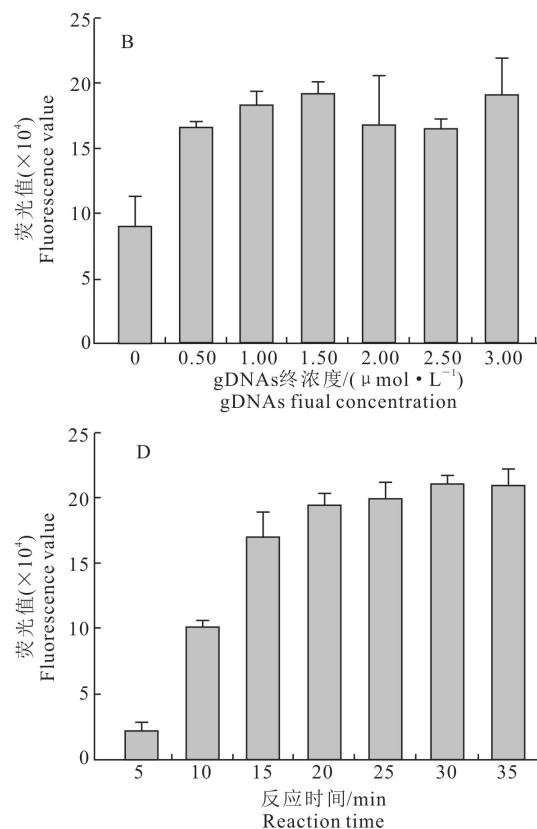
Fig. 5 Optimization of method conditions for PCV3 LAMP-PfAgo

2.6 敏感性试验和特异性试验

根据图 6-A 的结果建立适用于 PCV3 阳性样品

2.5 PfAgo 蛋白介导的 PCV3 检测方法条件优化

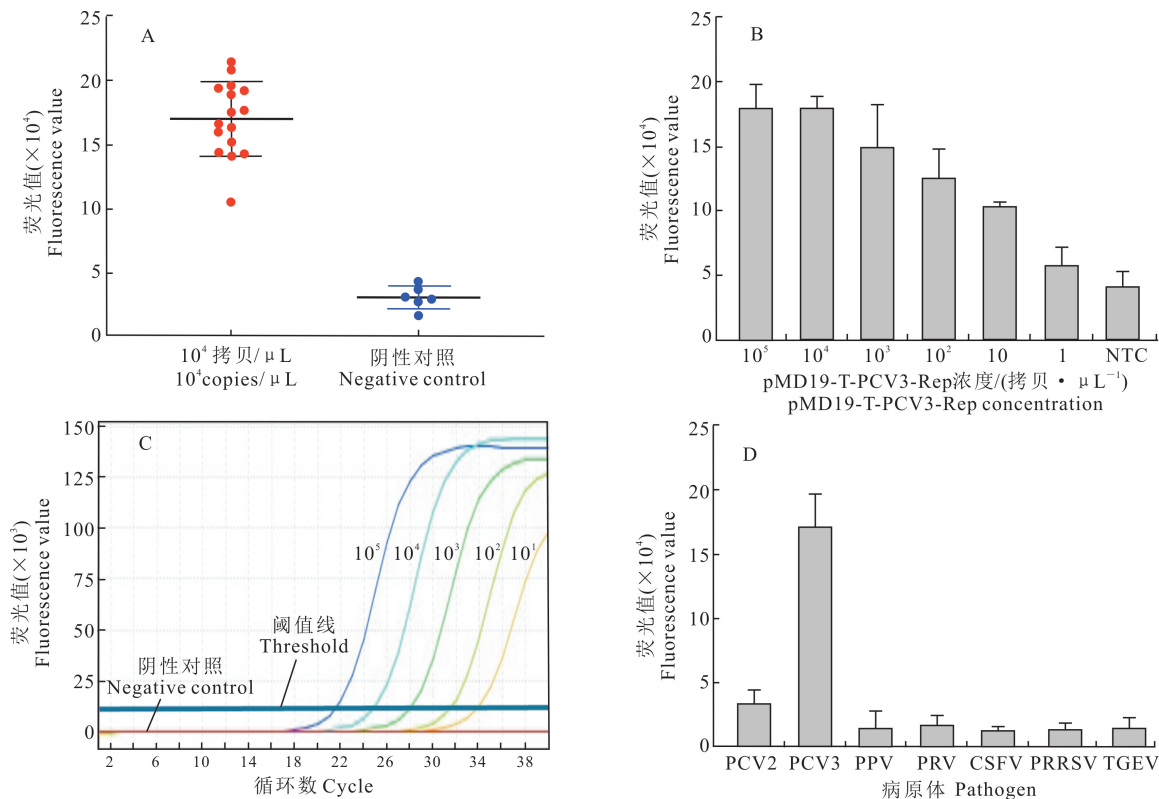
对 PfAgo 蛋白介导的 PCV3 预反应体系进行优化,试验结果(图 5-A)显示,在 gDNAs 终浓度为 $1.8 \mu mol/L$ 、 Mn^{2+} 终浓度为 $2 mmol/L$ 、反应时间为 $30 min$ 的条件下, PfAgo 蛋白终浓度为 $40 U/\mu L$ 时测得的产物荧光值最高。图 5-B 显示,在 PfAgo 蛋白终浓度为 $20 U/\mu L$ 、 Mn^{2+} 终浓度为 $2 mmol/L$ 、反应时间为 $30 min$ 的条件下, gDNAs 终浓度为 $1.50 \mu mol/L$ 时测得的产物荧光值最高。图 5-C 显示,在 gDNAs 浓度为 $1.8 \mu mol/L$ 、PfAgo 蛋白浓度为 $20 U/\mu L$ 、反应时间为 $30 min$ 的条件下, Mn^{2+} 终浓度为 $1.50 mmol/L$ 时测得的产物荧光值最高。图 5-D 显示,在最佳 PfAgo 蛋白终浓度、gDNAs 终浓度、 Mn^{2+} 终浓度条件下,反应时间为 $30 min$ 时测得的荧光值最高。因此,最佳反应条件为 PfAgo 蛋白终浓度 $40 U/\mu L$ 、gDNAs 终浓度 $1.50 \mu mol/L$ 、 Mn^{2+} 终浓度为 $1.50 mmol/L$ 、反应时间为 $30 min$ 。



检测结果的判读标准,当待检样品荧光值高于阴性值的 2 倍时,即当待检样品荧光值高于 $100\ 000$ 时,

结果判读为阳性。敏感性试验结果(图 6-B,C)显示,本研究建立的 LAMP-PfAgo 方法和实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度均为 10 拷贝/ μL 。使用本研究建立的方法对 PCV3 的重组质粒以及其他病原体的

核酸进行检测,结果(图 6-D)显示,PCV3 的荧光信号明显强于其他病原体,表明本研究建立的方法具有良好的特异性。



A. 建立方法用于检测 PCV3 时的判读标准;B. LAMP-PfAgo 方法敏感性试验结果;C. 实时荧光定量 PCR 敏感性试验结果;D. 特异性试验结果。

A. Interpretation criteria for the established PCV3 detection method;B. Results of the sensitivity test of the LAMP-PfAgo method;

C. Results of the qPCR sensitivity test;D. Results of the specificity test.

图 6 PCV3 LAMP-PfAgo 检测方法的敏感性和特异性试验

Fig. 6 Sensitivity and specificity tests of PCV3 LAMP-PfAgo

2.7 临床样本检测

本研究利用建立的 LAMP-PfAgo 检测方法和实时荧光定量 PCR 方法对 46 份临床样本进行检测,结果显示,2 种方法均检测到 8 份阳性样本和 38 份阴性样本,符合率达 100%。

3 讨论

自 2016 年以来,猪圆环病毒 3 型(PCV3)已被确定作为一种新兴的猪病毒,随着我国养猪产业的快速发展,猪群异地流动加剧,动物疫病的发生与流行随之加剧。祖立闯等^[28]对 PCV3 的流行病学调查结果表明,PCV3 在我国不同地区均有一定程度的流行,不同地区阳性感染率差异较大,且 PCV3 和 PCV2、PRRSV 等致病病原的混合感染情况较严重,给养猪业带来巨大的危害,及时诊断病原和有效疫病监测预警对该病防控至关重要。LAMP 技术作

为一种核酸扩增方法,相较于其他分子生物学检测方法,具有操作简便、灵敏度高、特异性好以及耗时短等优点,已经广泛应用于微生物检测领域^[29]。基于 PfAgo 的核酸检测方法具有不依赖 PAM 序列、向导 DNA 稳定性高等特点,被认为是开发下一代核酸检测方法的前沿技术^[24]。

本研究成功构建了一种利用 PfAgo 蛋白结合 LAMP 等温扩增技术的新的 PCV3 检测方法,该方法具有特异性强、准确性高、成本低等特点,对于猪的 PCV3 防控具有重要意义。实时荧光定量 PCR 方法是一种常见的病原检测方法,具有高灵敏度和高特异性,在很多情况下被认为是病原检测的金标准。临床样本检测结果表明,本研究构建的 LAMP-PfAgo 法对临床样本的检测方法与实时荧光定量 PCR 方法一致,证明该方法在实际应用中具有可行性。本研究建立的检测方法在设备需求上具有更大

的竞争优势,其只需要常见的实验室仪器,如水浴锅、便携式离心机和便携式荧光检测仪等即可进行检测,无需复杂的设备支持,这为 PCV3 检测提供了很大的便利性。同时,与李鹏等^[30]建立的 PCR-ELISA 检测方法、WANG 等^[31]建立的基于 RPA 的方法和 WANG 等^[3]建立的基于 TaqMan 的实时 PCR 检测方法相比,LAMP-PfAgo 法灵敏性更优,与姜辰龙等^[32]建立的 LAMP 方法灵敏性相当。

本研究基于 PfAgo 蛋白结合 LAMP 开发了一种新的 PCV3 检测方法,该方法具有灵敏度高、特异性强、不需要特殊仪器等特点,为 PCV3 的快速检测提供了有力的技术支持,具有潜在的临床应用潜力。

[参考文献]

- [1] PHAN T G, GIANNITTI F, ROSSOW S, et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation [J]. *Virology journal*, 2016, 13(1): 1-8.
- [2] PALINSKI R, PIÑEYRO P, SHANG P C, et al. A novel Porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure [J]. *Journal of Virology*, 2016, 91(1): e01879-e01816.
- [3] WANG J, ZHANG Y, WANG J, et al. Development of a TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection of porcine circovirus 3 [J]. *Journal of Virological Methods*, 2017, 248: 177-180.
- [4] KLAUMANN F, CORREA-FIZ F, SIBILA M, et al. Infection dynamics of porcine circovirus type 3 in longitudinally sampled pigs from four Spanish farms [J]. *Veterinary Record*, 2019, 184(20): 619.
- [5] TOCHETTO C, LIMA D A, VARELA A P M, et al. Full-genome sequence of porcine *Circovirus type 3* recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 5-9.
- [6] FUX R, SÖCKLER C, LINK E K, et al. Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains [J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 1-9.
- [7] KU X, CHEN F, LI P, et al. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(3): 703-708.
- [8] KWON T, YOO S J, PARK C K, et al. Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 207: 178-180.
- [9] SHEN H, LIU X, ZHANG P, et al. Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 264-266.
- [10] FU X, FANG B, MA J, et al. Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in Southern China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(2): e296-e303.
- [11] XU T, ZHANG Y H, TIAN R B, et al. Prevalence and genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) and type 3 (PCV3) between 2018 and 2020 in central China [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021, 94: 105016.
- [12] FRANZO G, HE W T, CORREA-FIZ F, et al. A shift in *Porcine circovirus 3* (PCV-3) history paradigm: phylodynamic analyses reveal an ancient origin and prolonged undetected circulation in the worldwide swine population [J]. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 2019, 6(22): 1901004.
- [13] YANG Y T, XU T, WEN J H, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) and type 3 (PCV3) in the Southwest of China during 2020-2022 [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 1042792.
- [14] 李天增, 王遵宝, 孙俊平, 等. 猪圆环病毒 3 型研究进展及防控措施 [J]. *中国动物保健*, 2023, 25(1): 100-102.
- [15] LI T Z, WANG Z B, SUN J P, et al. Research progress and control measures of porcine circovirus type 3 [J]. *China Animal Health*, 2023, 25(1): 100-102.
- [16] DENG J, LI X, ZHENG D, et al. Establishment and application of an indirect ELISA for porcine circovirus 3 [J]. *Archives of Virology*, 2018, 163(2): 479-482.
- [17] 杨晓伟, 赵自亮, 付雨, 等. 川、渝、黔地区猪圆环病毒 3 型 PCR 检测及全基因组序列分析 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(5): 846-852, 861.
- [18] YANG X W, ZHAO Z L, FU Y, et al. PCR detection and whole genome sequence analysis of porcine circovirus type 3 in Sichuan, Chongqing and Guizhou [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(5): 846-852, 861.
- [19] ZHENG L L, CHAI L Y, TIAN R B, et al. Simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 3 by SYBR green I-based duplex real-time PCR [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2019, 49: 101474.
- [20] ZHANG J, LI M, OU Y, et al. Development and clinical validation of a potential penside colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay of porcine circovirus type 3 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 758064.
- [21] MORA-DÍAZ J, PIÑEYRO P, SHEN H G, et al. Isolation of PCV3 from perinatal and reproductive cases of PCV3-associated disease and in vivo characterization of PCV3 replication in CD/CD growing pigs [J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 219.
- [22] GIOVANNI F, TUIJA K, ANNA L, et al. Exploratory metagenomic analyses of periweaning failure-to-thrive syndrome-affected pigs [J]. *The Veterinary Record*, 2019, 184(1): 25.
- [23] 庄林林, 陈欣雅, 徐佳豪, 等. 猪圆环病毒 3 型快速检测方法研究进展 [J]. *中国猪业*, 2023, 18(5): 77-84.
- [24] ZHUANG L L, CHEN X Y, XU J H, et al. Progress in rapid detection of porcine circovirus type 3 [J]. *China Swine Industry*, 2023, 18(5): 77-84.

- cropping rotations on rice field, nutrient uptake and soil nutrient contents in yellow soil region [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2023, 54(4): 881-888.
- [24] 柯福来, 邹剑秋, 朱凯. 气象因子与不同高粱品种产量的相关分析 [J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(3): 69-77.
- KE F L, ZOU J Q, ZHU K. Correlation analysis of yield and meteorological factors in different sorghum varieties [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2020, 40(3): 69-77.
- [25] SLAVIK B. Transpiration resistance in leaves of maize grown in humid and dry air [M]. Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 1996.
- [26] HOFFMAN G J, RAWLINS S L, GARBER M J, et al. Water relations and growth of cotton as influenced by salinity and relative humidity [J]. Agronomy Journal, 1971, 63(6): 822-826.
- [27] 韩延如, 宁万光, 史洪中, 等. 土壤水分及空气相对湿度对水稻结实期基部伤流强度及产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 80-83.
- HAN Y R, NING W G, SHI H Z, et al. Effects of soil mois-
- ture and air relative humidity on base bleeding intensity and yield of rice during grain filling stage [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(10): 80-83.
- [28] 周英霞, 王全九, 何斌, 等. 气温和 CO₂ 浓度变化对陕北地区冬小麦产量影响的模拟分析 [J]. 水土保持学报, 2017, 31(5): 292-297.
- ZHOU Y X, WANG Q J, HE B, et al. Effects of temperature and CO₂ concentration on the yield of winter wheat in Northern Shaanxi [J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2017, 31(5): 292-297.
- [29] 许乃银, 张国伟, 李健, 等. 基于 GGE 双标图的棉花品种生态区划分 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(3): 771-776.
- XU N Y, ZHANG G W, LI J, et al. Ecological regionalization of cotton varieties based on GGE biplot [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(3): 771-776.
- [30] 肖继兵, 刘志, 孔凡信, 等. 基于 GGE 双标图的高粱品种农艺性状和稳产性分析 [J]. 作物杂志, 2023(2): 36-45.
- XIAO J B, LIU Z, KONG F X, et al. Analysis of agronomic traits and yield stability of sorghum varieties based on GGE biplot [J]. Crops, 2023(2): 36-45.

(责任编辑: 屈李纯)

(上接第 9 页)

- [22] MAUTNER L, BAILLIE C K, HEROLD H M, et al. Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. Virology Journal, 2020, 17(1): 1-14.
- [23] SUN K, LIU Y, ZHAO W, et al. Prokaryotic argonaute proteins: a new frontier in point-of-care viral diagnostics [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(19): 14987.
- [24] 刘妍, 孙凯, 田春雨, 等. 基于 Argonaute 的病毒核酸检测技术研究进展 [J]. 病毒学报, 2023, 39(5): 1414-1424.
- LIU Y, SUN K, TIAN C Y, et al. Advances in Argonaute-based viral nucleic acid detection technology [J]. Chinese Journal of Virology, 2023, 39(5): 1414-1424.
- [25] XUN G H, LANE S T, PETROV V A, et al. A rapid, accurate, scalable, and portable testing system for COVID-19 diagnosis [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2905.
- [26] GUO B, YANG L, WANG Y, et al. Pyrococcus furiosus Argonaute with isothermal amplification for fast and ultra-sensitive diagnosis of acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp [J]. Aquaculture, 2023, 575: 739821.
- [27] ZHAO Y, HAN H Y, FAN L, et al. Development of a TB green II-based duplex real-time fluorescence quantitative PCR assay for the simultaneous detection of porcine circovirus 2 and 3 [J]. Molecular and Cellular Probes, 2019, 45: 31-36.
- [28] 祖立闯, 李娇, 谢金文, 等. 猪圆环病毒 3 型检测方法 & 感染现状概述 [J]. 养猪, 2022(4): 125-128.
- ZU L C, LI J, XIE J W, et al. Overview of porcine circovirus type 3 detection methods and infection status [J]. Swine Production, 2022(4): 125-128.
- [29] 车勇良, 陈如敬, 王隆柏, 等. 副猪嗜血杆菌可视化 LAMP 检测方法的建立与应用 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(12): 61-66.
- CHE Y L, CHEN R J, WANG L B, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of *Haemophilus parasuis* [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2013, 41(12): 61-66.
- [30] 李鹏, 孙延举, 雷梦瑶, 等. 猪圆环病毒 3 型 PCR-ELISA 检测方法的研究与应用 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42(11): 2152-2157.
- LI P, SUN Y J, LEI M Y, et al. Research and application of PCR-ELISA detection method for porcine circovirus type 3 [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(11): 2152-2157.
- [31] WANG J, ZHANG Y, ZHANG R, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of porcine circovirus 3 [J]. Molecular and Cellular Probes, 2017, 36: 58-61.
- [32] 姜辰龙, 严秀文, 张日腾, 等. 猪圆环病毒 3 型 LAMP 检测方法的建立与应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(6): 1314-1319.
- JIANG C L, YAN X W, ZHANG R T, et al. Establishment and application of LAMP method for detection of porcine circovirus type 3 [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2018, 49(6): 1314-1319.

(责任编辑: 马秋明)