猪圆环病毒 3 型微滴数字 PCR 定量检测方法的建立

石磊，刘雨琦，李丽丽

（暨南大学食品安全与营养研究院，广东广州 510632）

摘要：猪圆环病毒 3 型是一种新型猪圆环病毒，可引起猪感染相关疾病。本实验根据猪圆环病毒 3 型的 OPF2 基因序列，设计引物探针，建立了可对其准确定量检测的微滴数字 PCR(droplet digital PCR，ddPCR)方法。通过对 ddPCR 反应体系中的引物探针浓度和退火温度进行优化，得到 ddPCR 反应的最佳引物探针浓度比为 800 nM: 800 nM: 400 nM；最佳退火温度为 60 ℃。该 ddPCR 方法的标准曲线相关系数(R^2)为 0.999，呈良好的线性关系；灵敏度高，可达 4.4 copies/μL；特异性良好，与常见猪病原无交叉反应。通过对临床样品的检测结果证明，本研究建立的猪圆环病毒 3 型 ddPCR 检测方法比实时荧光 PCR 检测方法的灵敏度高 1 个数量级，检测结果与荧光 PCR 定性结果一致，并且可对可疑样本进行定量分析。结果表明：新建立的 ddPCR 方法灵敏度高、特异性强，可用于猪圆环病毒 3 型的定量检测。

关键词：猪圆环病毒 3 型；微滴数字 PCR；检测方法

文章篇号：1673-9078(2019)02-232-237 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.032

Development of Droplet Digital PCR for Quantitative Detection of Porcine Circovirus Type 3

SHI Lei, LIU Yu-qi, LI Li-li

(Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Porcine circovirus type 3 is a novel porcine circovirus that can cause diseases associated with porcine infection. In this experiment, primer probes were designed based on the OPF2 gene sequence of porcine circovirus type 3, and a droplet digital PCR (ddPCR) method for accurate and quantitative detection was established. After optimization of the primer probe concentration and annealing temperature for the ddPCR reaction system, the optimal primer probe concentration ratio was 800 nM: 800 nM: 400 nM; and the optimal annealing temperature was 60 ℃. The correlation coefficient R^2 of the ddPCR standard curve was 0.999, showing a good linear relationship. The sensitivity was high with the limit of detection being 4.4 copies/μL and good specificity (no cross-reaction with the common pig pathogens). The detection results of the clinical samples revealed that the ddPCR method established in this study was more sensitive than the real-time fluorescent PCR method by one order of magnitude, and could generate results consistent with those obtained by the fluorescent PCR and analyze quantitatively suspicious samples. The results showed that the newly established ddPCR method in this study had high sensitivity and specificity, thus could be used for quantitative detection of porcine circovirus type 3.

Key words: porcine circovirus type 3; microdroplet digital PCR; detection

猪圆环病毒(Porcine circovirus，PCV)是一种小型、无包膜、单链环状 DNA 病毒，属于圆环病毒科属。猪圆环病毒主要有三个基因型，即 PCV1，PCV2 和 PCV3。其中，PCV1 不具有致病性，PCV2 有致病性，与猪的多种疾病有关联，如断奶仔猪多系统衰竭综合征、皮炎、肾病综合征及先天性震颤等[1]。2016 年美国科学家首次发现 PCV3 病毒，该病毒能导致猪生殖失败，新生仔猪严重流失[2]。目前，PCV3 已遍及世界各养猪国家和地区[3]，我国辽宁、江西、重庆等养殖场都已检测到病原体[4]，给养猪业造成了巨大损失。

猪圆环病毒 3 型作为一种新型猪圆环病毒，目前在我国的地理分布、流行情况、组织向性、致病机理和来源尚不十分清楚。为此，建立早期快速检测方法对猪圆环病毒 3 型的研究、预防和控制具有十分重要的意义[5]。

目前，实验室常用的检测猪圆环病毒的方法有病毒分离技术、免疫学诊断技术（免疫组织化学检测、

收稿日期：2018-08-23

基金项目：国家重点研发计划重点专项（2016YFD0500600）；中央高校基本科研业务费项目（2017MS104；21618309）；广东省科技计划项目（2017B020207004）

作者简介：石磊（1961-），男，教授，研究方向：快速检测与细菌耐药性

通讯作者：李丽丽（1985-），女，博士，讲师，研究方向：快速检测与细菌耐药性

免疫荧光、酶联免疫吸附试验等）和分子生物学检测技术（常规 PCR 和实时荧光 PCR 等）。传统的病毒分离和免疫学检测方法，存在耗时长、对检测人员技术要求高、操作复杂以及敏感性差等诸多不足[6]；常规 PCR 操作复杂，需进行凝胶电泳分析，并且灵敏度低；实时荧光 PCR 需使用依赖标准曲线进行定量检测，灵敏度仍存在一定的局限性[7]。

微滴数字 PCR（droplet digital PCR，ddPCR）是第三代 PCR 技术，该技术通过将预混的 PCR 体系进行微滴化处理，形成几万至几十万个油包水的液化微滴，保证每个微滴中含有一个或不含有核酸模板，经过 PCR 扩增后，经过荧光检测每个微滴中的阳性微滴数和阴性微滴数，根据泊松分布原理即可计算出核酸模板的初始拷贝数[8]。与传统实时荧光 PCR 技术相比，ddPCR 技术不依赖 Cq 值或内参基因，可确定低至单拷贝的待检靶分子的绝对数目，精确度更高；可对 DNA 或 RNA 分子用绝对定量的方式分析，具有无可比拟的精确性，不再需要标准曲线，操作更简单；不易受 PCR 反应抑制物影响；可拓展性与实用性更强[9]。

目前，微滴数字 PCR 在食品安全检测方面已经得到成熟的应用，不仅在肉制品中可对羊肉猪肉进行定量分析[10]，还建立了猪伪狂犬病毒[11]、猪圆环病毒 1 型[12]、猪圆环病毒 2 型[13]、猪瘟病毒[14]、猪繁殖与呼吸综合征病毒[15]等微滴数字 PCR 检测方法。本试验旨在建立可用于定量检测圆环病毒 3 型的 ddPCR 方法，以期望为猪圆环 3 型病毒的早预防、早发现和早治疗提供有效分析手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌与病毒

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*，APP)由本实验室保存；猪圆环病毒 1 型（Porcine circovirus type 1，PCV1）、猪圆环病毒 2 型（Porcine circovirus type 2，PCV2）、猪呼吸道和生殖综合征病毒(Porcine respiratory and reproductive syndrome virus，PRRSV)、猪伪狂犬病毒(Pseudorabies virus，PRV)、猪细小病毒(Porcine parvovirus，PPV)、猪瘟病毒(Classical swine fever virus，CSFV)，购自广东永顺生物制药有限公司，均为 50 头份。

1.1.2 仪器

QuantStudio™ 6 Flex，美国 ABI 公司；Bio-Rad QX200™微滴式数字 PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司；超低温冰箱、离心机、NanoDrop veu plus 超微量分光光度计，美国 Thermo Fisher 公司；超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；微量移液器，德国 Eppendorf 公司。

1.1.3 试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、病毒 RNA/DNA 小量提取试剂盒，购自中国美基(Magen)生物科技有限公司；AceQ qPCR Probe Master Mix、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR（+g DNA wiper），购自中国诺维赞生物技术有限公司；ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)、Droplet Generation Oil for Probes，购自美国 Bio-Rad 公司；其他常规试剂均为国产分析纯。

1.1.4 样品

采自广州四个猪场的 50 份可疑样品，具体采样数据见表 1。

表 1 采样表

Table 1 Sampling table

猪场	采样位置	数量
猪场一	10 周龄的疑似病变猪 脾脏	6 份
猪场二	12 周龄的疑似病变猪 血清	19 份
猪场三	8 周龄的疑似病变猪 血清	14 份
猪场四	17 周龄的疑似病变猪 淋巴组织	11 份

1.2 方法

1.2.1 引物和探针的设计

根据 NCBI 上 PCV3 病毒的 ORF2 基因序列（登录号：MG745692.1）设计引物及探针，应用 Primer Premier 3.0 软件设计引物组，设计好引物组利用 NCBI 网站进行引物序列特异性对比。引物和探针序列如表 2，均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表 2 引物和探针序列

Table 2 Primers and probe sequences

引物探针名称	序列（5’-3’）	碱基数
FP	GGTTCCAACGGAAATGACGTT	21 bp
RP	GCCCACAGCTGGCACATAC	19 bp
Probe	FAM-ATGGTGGAGTATTTCTT-MGB	16 bp

1.2.2 病毒核酸的提取

利用 Magen 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 APP 的 DNA；利用 Magen 病毒 RNA/DNA 小量提取试剂盒提取 PCV1、PCV2、PPV 和 PRV 的 DNA，CSFV

和 PRRSV 的 RNA，并利用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR（+g DNA wiper）将 CSFV 和 PRRSV 的 RNA 反转录为 cDNA。利用超微量分光光度计测量所有核酸的浓度后保存于-80 ℃备用。

1.2.3 PCV3标准品的制备

将 ORF2 基因目标序列 645p，与载体 pUC59 合成质粒 pUC59-PCV3，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.2.4 PCV3 实时荧光 PCR（qPCR）体系的建立

采用本实验设计的引物 FP、BP 和探针 Probe 建立实时荧光 PCR 方法，qPCR 反应体系如下：AceQ qPCR Probe Master Mix10 μL；上下游引物 FP、RP（10 mmol/L)各 0.4 μL；探针（10 mmol/L) 0.2 μL；ddH_2O 8 μL；模板 1 μL。扩增条件为：95 ℃ 5 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 35 s，共 40 个循环。将 PCV3 质粒进行 10 倍梯度连续稀释用于进行灵敏度检测，每个浓度模板重复 3 次，检测后绘制标准曲线。

1.2.5 ddPCR 反应体系和条件优化

ddPCR反应体系中，退火温度作为反应体系中的一个重要参数，温度过高或者过低都会导致液滴生成数少或非特异性扩增。用 2.714×10^5 copies/μL 的 pUC59-PCV3和本实验设计的引物探针来进行退火温度优化实验，设温度梯度为：60 ℃、59.4 ℃、58.3 ℃、56.3 ℃、53.9 ℃、52 ℃、50.7 ℃和50 ℃。反应体系为：2×ddPCR supermix for probes 10 μL，模板1 μL，引物和探针终浓度为800 nM和400 nM，用无RNA酶水补足20 μL，进行ddPCR扩增。通过生成液滴数以及阴阳性液滴荧光信号值差异情况来确定最佳退火温度。

1.2.6 特异性实验

将提取的 PCV1、PCV2、PRRSV、APP、PRV、PPV 和 CSFV 的核酸稀释至 10^3 copies/μL，分别取 1 μL 作为模板，加入到优化后的 ddPCR 体系中进行反应，验证其特异性。

1.2.7 灵敏度实验

将 pUC59-PCV3 按照高浓度 10 倍稀释，中浓度 5 倍稀释，低浓度 2 倍稀释的方法，稀释成 7 个浓度梯度，分别为 2.714×10^5 copies/ μL，2.714×10^4 copies/ μL，2.714×10^3 copies/μL，5.428×10^2 copies/μL，1.0856×10^2 copies/μL，54.28 copies/ μL，27.14 copies/μL，检测后用于绘制标准曲线。

1.2.8 实际样本检测

利用上述已建立的 PCV3 qPCR 体系和 PCV3 ddPCR 体系，检测 50 份采自猪场疑似猪圆环病毒的样品。

2 结果与讨论

2.1 qPCR 方法的建立

pUC59-PCV3 进行 10 倍连续稀释，各浓度模板加 1 μL 到荧光定量 PCR 反应体系中，并设置三个重复，得到荧光定量 PCR 的扩增曲线如图 1 所示。pUC59-PCV3 的浓度为 2.714×10^8 copies/ μL 时，Ct 值为 15.36，24 min 达到平台期。该方法的最低检测限可达 27.14 copies/ μL，结果表明 qPCR 扩增效率和稳定性好，灵敏度高。

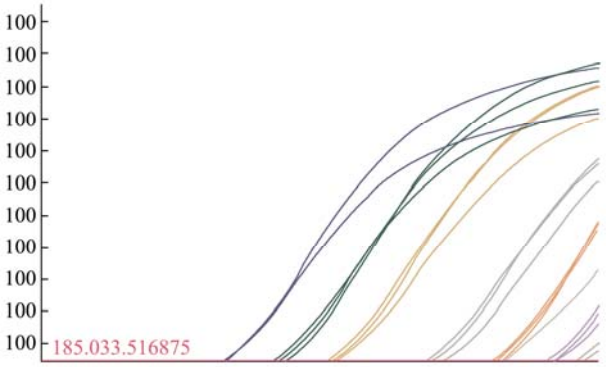


图 1 qPCR 扩增 PCV3 曲线图

Fig.1 Amplification curve of PCV3 by qPCR

注：从左至右 8 个模板拷贝数为 2.714×10^8 copies/ μL~27.14 copies/ μL。

2.2 数字 PCR 反应条件的确定

ddPCR 的退火温度优化实验结果如图 2 所示，根据液滴生产数以及阴阳性液荧光信号值差异情况确定 60 ℃为最佳退火温度。得到 ddPCR 最佳反应程序为 95 ℃ 10 min；94 ℃ 30 s，52 ℃ 1 min，40 个循环；98 ℃ 10 min；4 ℃保存。

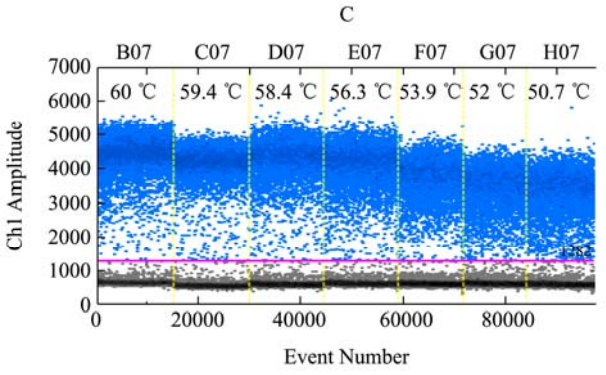


图2 不同退火温度下的液滴散点图

Fig.2 Fluorescence amplitude of different annealing temperatures

注：温度梯度为：60、59.4、58.4、56.3、53.9、52、50.7、50 ℃。

表3 不同浓度标准质粒ddPCR重复性试验

Table 3 Experimental data of standard plasmid of ddPCR with different concentration

质粒浓度 copies/μL	组间差异			组内差异		
	平均值 copies/μL	标准差 SD	变异系数 CV/%	平均值 copies/μL	标准差 SD	变异系数 CV/%
2.714×10^5	12561	11.32	0.09	12570	25.04	0.20
2.714×10^4	1261	13.14	1.04	1258	4.80	0.38
2.714×10^3	128	1.25	0.97	129	2.92	2.25
5.428×10^2	14	0.36	2.52	14	0.60	4.09
1.0856×10^2	7	0.25	3.39	7	0.34	4.49
54.2800	3	0.16	4.30	3	0.15	4.47
27.1400	1	0.08	4.80	1	0.07	4.64

2.3 重复性和灵敏度试验结果

最佳反应条件下，建立的 ddPCR 方法的稳定性检测结果如表 3 所示，组间和组内的变异系数均小于 5%，标准差均小于 14，说明测量的数据结果间离散程度小，建立的 ddPCR 方法的稳定性好。

最佳反应条件下，建立的 ddPCR 方法的灵敏度检测结果如图 3 所示，本实验的初始模板浓度为 27.14×10^5 copies/μL，随着 DNA 模板浓度降低，阳性液滴微滴数量相应减少，最低可检测到 4.4 copies/μL。由图 3 可知，经过优化的反应条件适合进行 PCV3 ddPCR 的定量分析。

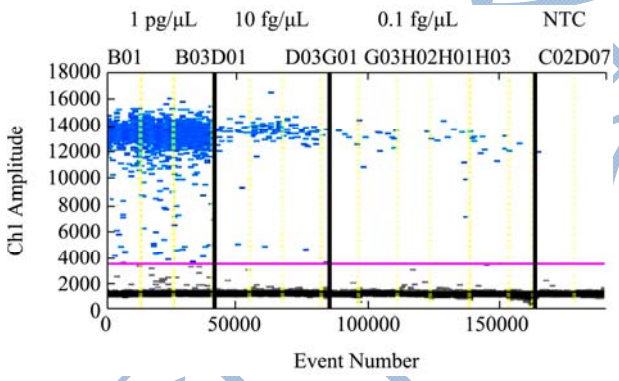


图 3 ddPCR4 种模板的微滴散点图

Fig.3 Amplification of four different concentration of template droplets scatter plots of APP by droplet digital polymerase chain

注: 从左至右 4 个模板拷贝数分别为 2.714×10^5 copies/ μL、2.714×10^3 copies/μL、27.14copies/ μL、阴性对照。

2.4 特异性分析

利用PCV1、PCV2、PCV3、PRRSV、APP、PRV、PPV和CSFV的核酸对本实验建立的ddPCR检测方法进行特异性验证。结果显示：只有PCV3呈阳性，其他均为阴性，且无交叉反应，说明该方法具有良好的特异性。

2.5 标准曲线和最低检测限

ddPCR 和 qPCR 的标准曲线见图 4。由图可知，qPCR 的 R^2 值为 0.9813，斜率为-4.984，最低检测限 27.14 copies/μL；ddPCR 的 R^2 值为 0.999，斜率为为 0.9538，最低检测限为 4.4 copies/μL。结果表明：ddPCR 与 qPCR 均呈现较好的线性关系，ddPCR 方法的灵敏度比 qPCR 高 1 个数量级。

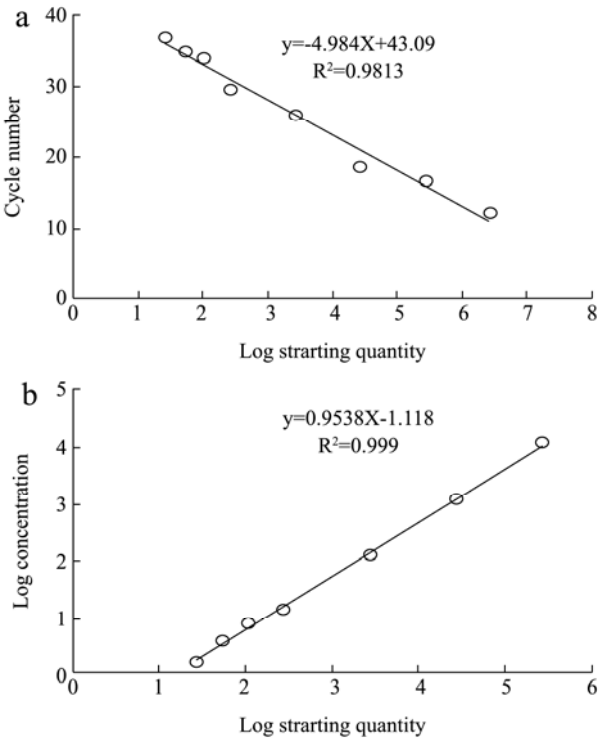


图4 qPCR（a）和ddPCR（b）标准曲线图

Fig.4 Standard curve for qPCR (a) and ddPCR (b)

2.6 临床样本检测

利用本试验建立的qPCR和ddPCR两种方法分别从猪场采集的疑似猪圆环病毒 3 型的样品进行检测。

结果显示：50 份临床样品中 qPCR 检出的 PCV3 阳性为 10 份(Ct 值小于 35)，其中第 5、7 号为可疑样

品（Ct 值 35~40）；ddPCR 方法检出的 PCV3 阳性为 12 份，其中第 5、7 号可疑样品检出的拷贝数为 20.56 copies/μL 和 16.82 copies/μL，ddPCR 结果判断为阳性。两种方法检测结果基本一致。结果表明：对于 PCV3 浓度高于 27.14 copies/μL 的样品，qPCR 和 ddPCR 检测结果一致；对于 PCV3 浓度低于 27.14 copies/μL 的样品，qPCR 无法对可疑样本进行准确判断，但是 ddPCR 可以精确定量病毒核酸的拷贝数，结果更加可靠和精确。

3 结论

3.1 近年来，猪圆环病毒 3 型作为一种新型病毒在许多国家蔓延，对各国养猪业造成极大的威胁。感染 PCV3 能引起猪的心、肾、肺、淋巴结组织以及皮肤组织发生病变，患上皮炎肾炎综合征，母猪繁殖障碍及心脏和多系统炎症等，因此需要建立一种能准确定量检测猪圆环病毒 3 型的方法。

3.2 姜辰龙[16]等建立的猪圆环病毒 3 型 LAMP 检测方法最低检测限为 1.0×10^{1} copie/μL。徐朋丽[17]等建立的猪圆环病毒 3 型 SYBR GreenⅠ荧光定量 PCR 检测方法，最低检测限为 14.5 copies/μL。李畅[18]等建立的猪圆环病毒 3 型 TaqMan 荧光定量 PCR 方法最低检测限为 1.29×10^{2} copies/ μL。本实验所建立的实时荧光 PCR 检测方法最低检测限为 27.14 copies/ μL，ddPCR 最低检测限为 4.4 copies/ μL。由此可见，ddPCR 灵敏度高于 qPCR 及其它建立的检测 PCV3 的方法。与传统 qPCR、LAMP 技术相比，数字 PCR 技术具有极高的灵敏度、特异性和精确性。

3.3 尽管 ddPCR 存在一定局限性，如仪器和实验耗材成本相对高。但其独特的技术优势和广阔的应用前景，在未来几年内，必将发展成实验室中的标准工具。

3.4 总之，本实验建立的猪圆环病毒 3 型数字 PCR 检测方法具有高度的特异性、灵敏度和准确性，能对 PCV3 低浓度样本进行检测和定量，为 PCV3 的监测、流行病学调查、质控等提供一个切实可行的解决方案。

参考文献

[1] 王伦. II 型猪圆环病毒 ORF3 蛋白的抗原表位及核输出信号分析[D].浙江大学,2015
WANG Lun. Analysis of antigenic epitope and nuclear output signal of ORF3 protein of type II porcine circovirus [D]. Zhejiang University, 2015

[2] Shen H, Liu X, Zhang P, et al. Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China [J]. Transboundary & Emerging Diseases, 2018, 65(1)

[3] Lu B, Qin Y, Ying H, et al. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 3 strain, CH/GX/1776D/2017, isolated from guangxi, China [J]. Genome Announcements, 2018, 6(17)

[4] 李军,贺会利,潘艳,等.广西猪圆环病毒 3 型感染的初步调查[C]//中国畜牧兽医学会动物传染病学分会第九次全国会员代表大会暨第十七次全国学术研讨会论文集.2017
LI jun, HE Hui-li, PAN Yan, et al. Preliminary investigation of porcine circovirus type 3 infection in guangxi [C] // proceedings of the 9th national congress of the branch of animal infectious diseases of China animal husbandry and veterinary association and the 17th national academic symposium. 2017

[5] 冯兆民,舒跃龙.数字 PCR 技术及其应用进展[J].病毒学报,2017,1:103-107
FENG Zhao-min, SHU Yue-long. Digital PCR technology and its application progress [J]. Journal of viruses, 2017, 1: 103-107

[6] 汪惠泽.盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备及其 CiELISA 检测方法的建立[D].扬州大学,2012
WANG Hui-ze. Preparation of clenbuterol monoclonal antibody and establishment of CiELISA detection method [D]. Yangzhou university, 2012

[7] 李静芳,汤水平,张素文,等.实时荧光定量 PCR 技术在食品检测中的应用[J].实用预防医学,2008,15(6):1997-1999
LI Jing-fang, TANG Shui-ping, ZHANG Su-wen et al. Application of real-time quantitative PCR in food detection [J]. Practical preventive medicine, 2008, 15(6): 1997-1999

[8] 成媛媛.梅毒螺旋体核酸检测及基于微滴式数字 PCR 技术的梅毒螺旋体核酸绝对定量方法学研究[D].合肥:安徽医科大学,2017
CHENG Yuan-yuan. Detection of Treponema pallidum nucleic acid and absolute quantitative methodological study of Treponema pallidum based on microdroplet digital PCR technology [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2017

[9] 刘静.RPA 技术与微滴数字 PCR 在转基因玉米与大豆检测中的应用[D].上海海洋大学,2017
LIU Jing. Application of RPA technology and microdrop digital PCR in detection of transgenic corn and soybean [D]. Shanghai Ocean University, 2017

[10] 陈晨,张岩,李永波,等.微滴式数字 PCR 对肉制品中羊肉和猪肉定量分析[J].现代食品科技,2018,34(1):221-226,194
CHEN Chen, ZHANG Yan, LI Yong-bo, et al. Quantitative analysis of mutton and pork in meat products by micro-droplet digital PCR [J]. Modern food technology, 2018,

(1): 221-226, 194

[11] 陈亚娜,王静,訾占超,等.伪狂犬病病毒微滴数字 PCR 定量检测方法的建立[J].畜牧兽医学报,2017,48(9):1705-1710
CHEN Ya-na, WANG Jing, ZHAI Zhan-chao, et al. Establishment of quantitative PCR detection method for pseudorabies virus microdroplets [J]. Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 48(9): 1705-1710

[12] 原霖,訾占超,亢文华,等.猪圆环病毒 1 型微滴数字 PCR 定量检测方法的建立[J].中国兽医学报,2017,37(11):2043-2047
YUAN Lin, ZHAI Zhan-chao, KANG Wen-hua, et al. Establishment of quantitative detection method for porcine circovirus type 1 microdroplet digital PCR [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 37(11): 2043-2047

[13] 赵珊.猪圆环病毒 2 型微滴式数字 PCR 检测方法的建立与初步应用[D].四川农业大学,2016
ZHAO Shan. Establishment and preliminary application of porcine circovirus type 2 microdroplet digital PCR detection method [D]. Sichuan Agricultural University, 2016

[14] 邬旭龙,肖璐,宋勇,等.非洲猪瘟病毒微滴数字 PCR(ddPCR)方法的建立及应用[J].微生物学通报,2017,44(12):2839-2846
WU Xu-long, XIAO Lu, SONG Yong, et al. Establishment and application of African swine fever virus microdroplet digital PCR (ddPCR) method [J]. Bulletin of Microbiology, 2017, 44(12): 2839-2846

[15] 万绍贵,鲍登克,杨琪.一种用于绝对定量检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的 ddPCR 方法,引物及其应用和试剂盒,CN107267664A [P]. 2017
WAN Shao-gui, BAO Deng-ke, YANG Qi. A ddPCR method, primer, application and kit for absolute quantitative detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, CN 107267664 A [P]. 2017

[16] 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 Chen-long, YAN Xiu-wen, ZHANG Ri-teng, 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

[17] 徐朋丽,赵宇,张宇,等.猪圆环病毒 3 型 SYBRGreen Ⅰ荧光定量 PCR 检测方法的建立[C]//中国畜牧兽医学会动物传染病学分会第九次全国会员代表大会暨第十七次全国学术研讨会论文集.2017
XU Peng-li, ZHAO Yu, ZHANG Yu, et al. Establishment of CYBR Green I fluorescence quantitative PCR assay for porcine circovirus type 3 [C] // Ninth National Congress of the Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine and the Tenth National Congress Proceedings of seven national academic seminars. 2017

[18] 李畅,库旭钢,王俊伟,等.猪圆环病毒 3 型 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的建立和初步应用[J].畜牧兽医学报,2018,49(6):1320-1326
LI Chang, KU Xu-gang, WANG Jun-wei, et al. Establishment and preliminary application of porcine circovirus type 3 TaqMan fluorescent quantitative PCR method [J]. Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 49(6): 1320-1326

现代食品科技