

猪胸膜肺炎放线杆菌微滴数字 PCR 定量检测方法的建立

石磊, 刘雨琦, 陈洵, 叶蕾, 常彦磊, 李丽丽

(暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

摘要: 为实现对猪胸膜肺炎的致病菌猪胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 的量化研究, 本实验根据猪胸膜肺炎放线杆菌特异性基因 *ApxIV* 的保守序列, 设计引物探针, 通过优化反应条件, 建立可对其准确定量的微滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏度、稳定性以及适用性进行验证, 与实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 检测方法进行比较分析。结果表明: ddPCR 最佳退火温度为 52 °C; 线性相关系数 (R^2) 为 0.9957, 线性关系良好; 灵敏度达 153.8 copies/ μ L, 是 qPCR 的两倍; 特异性良好, 与其它常见猪病原无交叉反应。在实际样品检测中, 110 份样品的 ddPCR 与 qPCR 检测结果的 Kappa 系数为 0.9529, 说明两种检测方法结果高度一致, 并且 ddPCR 可对 qPCR 无法判断阴阳性的可疑样本进行定量分析。本实验建立的 ddPCR 方法敏感性高、特异性强、可用于猪胸膜肺炎放线杆菌的定量检测。

关键词: 猪胸膜肺炎放线杆菌; 微滴数字 PCR; 检测方法

文章编号: 1673-9078(2019)03-212-217

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.032

Development of Droplet Digital PCR for the Quantitative Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

SHI Lei, LIU Yu-qi, CHEN Xun, YE Lei, CHANG Yan-lei, LI Li-li

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

Abstract: In order to achieve the quantitative study of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), a pathogenic bacterium for porcine pleuropneumonia, a primer was designed according to the conserved sequence of the specific *ApxIV* gene of APP in this study. An accurate and quantitative droplet digital PCR (ddPCR) detection method was developed through optimizing reaction conditions, and the specificity, sensitivity, stability and applicability of this method were verified and compared with those of the quantitative real-time PCR (qPCR) detection method. The results showed that the optimal annealing temperature of the ddPCR method was 52 °C, and the linear correlation coefficient (R^2) value was 0.9957, indicating good linearity; the sensitivity was 153.8 copies/ μ L, which was twice that of qPCR; a the specificity was good, and there were no cross-reactions with other common swine pathogens. In the actual tests, the Kappa coefficient of ddPCR and qPCR detection of the 110 samples was 0.9529, indicating that the results obtained by the two methods were highly consistent, and the ddPCR method was also capable of analyzing quantitatively suspicious samples that could not be differentiated by the qPCR method. The ddPCR method established in this experiment has high sensitivity and specificity, thus can be used for quantitative detection of APP.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; droplet digital PCR; detection method

由猪胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 引起的猪胸膜肺炎是一种猪

收稿日期: 2018-09-28

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

作者简介: 石磊 (1961-), 男, 教授, 研究方向: 快速检测与细菌耐药性研究

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研究

的呼吸道传染病, 在各个猪龄的猪群中都会诱发^[1], 其病理特征有纤维索性胸膜炎和出血性、坏死性脑炎^[2]。APP 现共有 15 个血清型, 分别为 1 型~12 型、15 型为生物 I 型, 13 型和 14 型为生物 II 型^[3]。APP 对猪致病的几个毒力因子, 包括荚膜多糖、脂多糖、外膜蛋白、转铁结合蛋白、蛋白酶、渗透因子及溶血素等^[4], 在所有致病因子中最重要的是溶血外毒素 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin, Apx), 它对许多细胞, 包括巨嗜细胞都具有细胞毒性作用^[5]。其中 Apx I、Apx II 和 ApxIII 在一定程度上能引起猪

胸膜肺炎典型临床症状和肺部病变^[6], ApxIV是 2002 年才被发现的毒素因子, 它存在于所有的血清型中, 并具有特异性, 可作为检测 APP 的目标基因^[7]。猪传染性胸膜肺炎是国际上公认的危害现代养猪业的五大疾病之一^[8], 给各国养猪业造成了巨大的经济损失, 其发病率和致死率极高^[9], 但在大多数病例中呈隐性感染。所以建立 APP 快速检测方法对 APP 早期预防和控制具有十分重要的意义。

目前, 实验室和临床常用的检测 APP 的方法包括免疫组织化学检测、酶联免疫吸附试验和 PCR 检测等, 这些方法存在耗时长、特异性和灵敏度差、易造成污染等缺点^[10]。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, 利用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^[11]。与实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 技术相比, 数字 PCR 技术不依赖 Ct 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, 精确性更高; 可对 DNA 或 RNA 分子采用绝对定量的方式进行分析, 具有超高的精确性, 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^[12,13]。

目前, 微滴数字 PCR 主要应用在突变位点检测、基因表达分析、高通量测序结果的验证和深入病原学研究, 以及无创产前诊断等^[14]。同样也在食品安全检测方面得到成熟的应用, 不仅在肉制品中可对羊肉猪肉进行定量分析^[15], 还建立了伪狂犬病毒^[16]、猪圆环病毒 2 型^[17]、猪瘟病毒^[18]、猪繁殖与呼吸综合征病毒^[19]等多种猪病的微滴数字 PCR 检测方法。本试验旨在建立 APP 的 ddPCR 检测方法, 为猪胸膜肺炎的早预防、早发现 and 早治疗, 提供有效分析手段。

1 材料与方法

1.2 方法

1.2.1 引物和探针的设计

1.1 材料

1.1.1 细菌与病毒

APP、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*)、副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 由本实验室保存; 猪肺炎支原体 (*Mycoplasmal pneumonia of swine*, MPS)、猪呼吸道和生殖综合征病毒 (*Porcine respiratory and reproductive syndrome virus*, PRRSV)、猪瘟病毒 (*Classical swine fever virus*, CSFV), 购自广东永顺生物制药有限公司。

1.1.2 仪器

QuantStudio™ 6 Flex 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; 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 微量分光光度计, 美国 ThermoFisher 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, 购自广州美基 (Magen) 生物科技有限公司; AceQ qPCR Probe Master Mix, HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+g DNA wiper), 购自南京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

样品采自广州 5 个猪场的 110 份疑似患猪胸膜肺炎病料, 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	10~12 周龄的疑似病变猪 淋巴组织	26 份
猪场二	12 周龄的疑似病变猪 肺部组织	24 份
猪场三	8~14 周龄的疑似病变猪 血清	20 份
猪场四	10~17 周龄的疑似病变猪 扁桃体	19 份
猪场五	6~24 周龄的疑似病变猪 血清	21 份

表 2 引物和探针序列

Table 2 Primer and probe sequences

引物探针名称	序列 (5'-3')	碱基数
FP	GCTGACCGCAGTATAACTGTATGG	24 bp
RP	CGTCCCCAGTCGTTGATATTATC	23 bp
Probe	5'-FAM-ATTATTTGGCACTGACGGTG-MGB-3'	20 bp

根据 ApxIV 基因中的核苷酸保守序列 (GenBank: CP030753.1), 使用 Primer Premier 3.0 软件设计引物组, 引物探针序列如表 2, 扩增片段长度为 232 bp,

设计好的引物组利用 NCBI 网站进行引物序列特异性对比。引物探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 核酸的提取

利用 Magen 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 HPS、APP 和 *E.coli* 的 DNA; 利用 Magen 病毒 RNA/DNA 小量提取试剂盒提取 MPS 的 DNA, 以及 CSFV 和 PRRSV 的 RNA, 并利用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+g DNA wiper) 将 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, 保存于 -80°C 备用。

1.2.3 APP 标准品的制备

将 ApxIV 基因目标序列 232 bp, 与载体 pUC59 合成质粒 pUC59-APP, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.4 APP 实时荧光 PCR 体系的建立

采用本实验设计的引物 FP、RP 和探针 Probe 建立实时荧光 PCR 方法, qPCR 反应体系为: AceQ qPCR Probe Master Mix 10 μL ; 上下游引物 FP、RP (10 mmol/L) 各 0.4 μL ; 探针 (10 mmol/L) 0.2 μL ; ddH₂O 8 μL ; 模板 1 μL 。扩增条件为: 95°C 5 min; 95°C 10 s, 60°C 35 s, 共 35 个循环。将 APP 质粒进行 10 倍梯度稀释用于灵敏度检测, 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 3.075×10^5 copies/ μL 的 pUC59-APP 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、50 $^{\circ}\text{C}$ 。反应体系为: 2 $\times$ 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

将提取到的 *E.coli*、APP、HPS、PRRSV、MPV 和 CSFV 的核酸稀释至 10^3 copies/ μL , 分别取 1 μL 作为模板, 加入到优化好的 ddPCR 体系中进行反应, 验证其特异性。

1.2.7 灵敏度和重复性实验

将 pUC59-APP 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 3.075×10^5 、 3.075×10^4 、 6.13×10^3 、 1.23×10^3 、 6.15×10^2 、 3.075×10^2 、 1.538×10^2 copies/ μL 。每个浓度

取 1 μL 加入到已优化好的 ddPCR 反应体系中, 检测后绘制标准曲线。每个浓度重复 3 次, 验证其稳定性。

1.2.8 实际样本检测

利用上述已建立的 APP 实时荧光 PCR 体系和 APP 微滴数字 PCR 体系, 检测 110 份采自猪场疑似患有猪胸膜肺炎的病料。

2 结果与讨论

2.1 qPCR 方法的建立

pUC59-APP 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-APP 的浓度为 3.075×10^7 copies/ μL 时, Ct 值为 15.36。该方法的最低检测限可达 307.5 copies/ μL , 结果表明 qPCR 扩增效率和稳定性好, 灵敏度高。

2.2 ddPCR 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滴荧光信号值差异情况确定 52°C 为最佳退火温度。得到 ddPCR 最佳反应程序为 95°C 10 min; 94°C 30 s, 52°C 1 min, 35 个循环; 98°C 10 min; 4°C 保存。

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, 其标准差和变异系数小, 重复试验结果稳定, 说明该检测方法稳定性好。

2.3 重复性和灵敏度试验结果

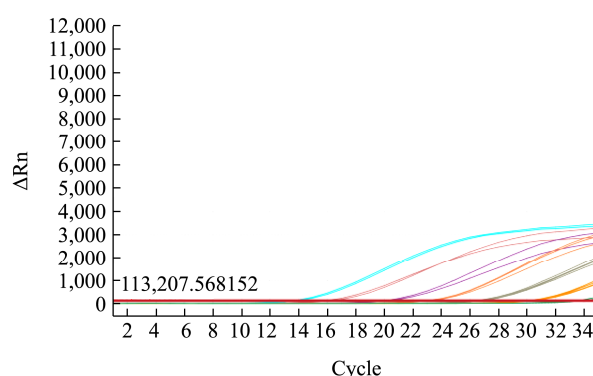


图1 qPCR 扩增 APP 曲线图

Fig.1 Amplification curve of APP by qPCR

注: 从左至右 7 个模板拷贝数为 3.075×10^7 copies/ μL ~307.5 copies/ μL , NTC。

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, 其变异系数均小于 5%, 标准差均小于 10, 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。

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)	重复 1/(copies/μL)	重复 2/(copies/μL)	重复 3/(copies/μL)	平均值 Avg.	标准差 SD	变异系数 CV%
307500	14446.00	14466.00	14452.00	14454.67	8.38	0.06
30750	1480.00	1476.00	1473.00	1476.33	2.87	0.19
6150	147.00	146.80	146.20	146.67	0.34	0.23
1230	13.98	14.22	14.03	14.08	0.10	0.73
615	6.74	6.56	6.71	6.67	0.08	1.18
307.5	3.44	3.39	3.41	3.41	0.02	0.60
153.8	1.80	1.90	2.00	1.90	0.08	4.30

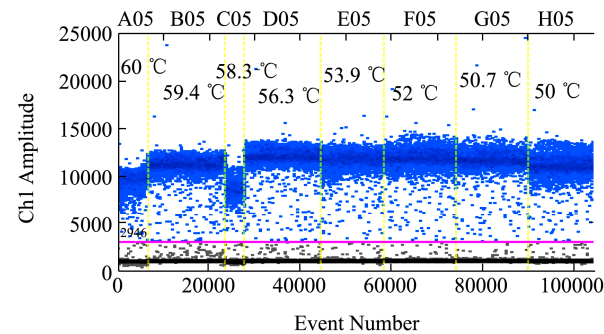


图 2 不同退火温度下的液滴散点图

Fig.2 Fluorescence amplitude of different annealing temperatures

注：温度梯度为：60，59.4，58.3，56.3，53.9，52，50.7 和 50 °C。

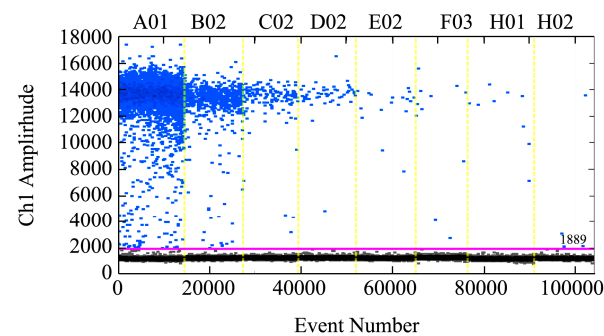


图 3 ddPCR 扩增不同浓度 APP 模板的微滴散点图

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

注：从左至右 8 个模板拷贝数为 3.075×10^5 copies/μL， 3.075×10^4 copies/μL， 6.13×10^3 copies/μL， 1.23×10^3 copies/μL， 6.15×10^2 copies/μL， 3.075×10^2 copies/μL， 1.538×10^2 copies/μL，阴性对照。

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，本实验的初始模板为 3.075×10^5 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 153.8 copies/μL。由图 3

可知，经过优化的反应条件适合进行 APP ddPCR 的定量分析。

2.4 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 0.995，斜率为 -3.391，最低检测限 3.075×10^2 copies/μL 的 pUC59-APP；ddPCR 的 R^2 值为 0.9957，斜率为 -0.8239，最低可检测 1.538×10^2 copies/μL 的 pUC59-APP，拷贝数均值约为 1.9 copies/μL。结果表明：ddPCR 与 qPCR 均有较好的线性关系，ddPCR 方法的灵敏度比 qPCR 高两个数量级。

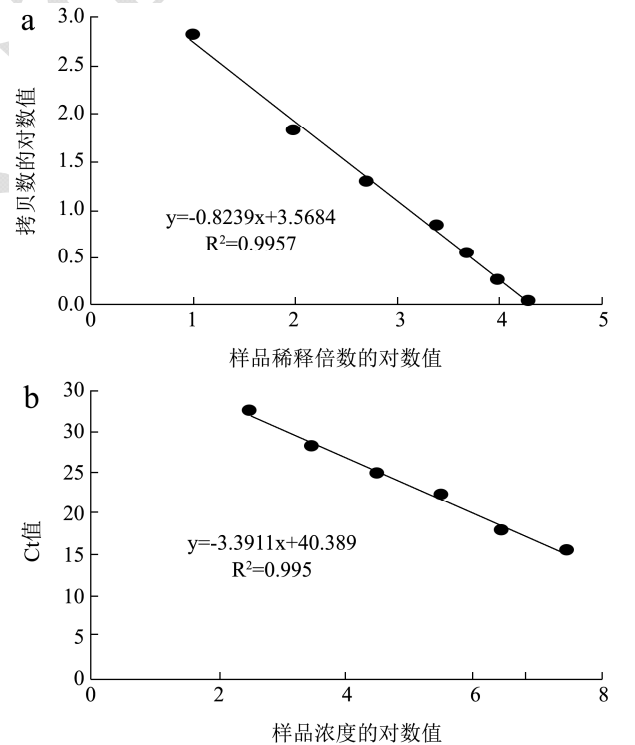


图 4 ddPCR (a) 和 qPCR (b) 标准曲线图

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

2.5 特异性分析

以 E.coli、HPS、PRRSV、MPV、CSFV 和 APP 的核酸为模板对本实验建立的 ddPCR 检测方法进行

特异性验证。结果显示:只有 APP 有明显的阳性液滴,其他核酸均为阴性液滴,且无交叉反应,说明该方法特异性良好。

2.6 临床样本检测

利用本试验建立的 qPCR 和 ddPCR 两种方法对从猪场采集的疑似猪胸膜肺炎的样品进行检测。

结果显示:110 份可疑样本中 qPCR 检出的 APP 阳性为 53 份,可疑为 2 份(Ct 值在 33~35);ddPCR 方法检出的 APP 阳性为 56 份,其中两份 qPCR 检出的可疑样本拷贝数为 16.2 copies/ μ L 和 14.22 copies/ μ L,一份 qPCR 检出的阴性样本拷贝数为 5.17 copies/ μ L,ddPCR 结果判断均为阳性。根据 Kappa 系数公式计算 ddPCR 和 qPCR 两种方法的 k 值为 0.9529,说明两种方法检测结果高度一致。同时结果表明:对于 APP 浓度高于 307.5 copies/ μ L 的样品,qPCR 和 ddPCR 检测完全一致;对于 APP 浓度低于 307.5 copies/ μ L 的样品,qPCR 无法进行准确判断,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 猪胸膜肺炎是严重威胁猪养殖业健康发展的呼吸道传染病,其致病因子 APP 是猪的一种专性病原菌,主要造成肺部组织病变甚至死亡,在猪群中通常以气溶胶为媒介或直接接触传播。猪群中一旦染病,会造成大规模的损失。因此,建立一种准确定量检测猪胸膜肺炎放线杆菌的方法,能有效的监测和控制疾病的爆发。近年来,数字 PCR 技术在分子生物学研究和医学诊断中得到广泛的应用。与传统 qPCR、LAMP 技术相比,数字 PCR 技术具有更高的灵敏度、特异性和精确性,在定量检测方面处于领先地位。

3.2 本实验建立的 APP ddPCR 检测方法,最佳退火温度为 52 $^{\circ}$ C;引物探针终浓度分别为 800 nM 和 400 nM;与 *E.coli*、HPS、PRRSV、MPV 和 CSFV 无交叉反应,特异性好;检测结果的变异系数和标准差小,拷贝数离散程度小,稳定性好。

3.3 刘亚娟^[20]等建立的猪胸膜肺炎放线杆菌 LAMP 检测方法最低检测限为 0.307 ng/L。张建新^[21]等建立的猪胸膜肺炎放线杆菌 PCR 诊断方法,最低检测限为 50/ μ L。本实验所建立的实时荧光 PCR 检测方法最低检测限为 307.5 copies/ μ L,ddPCR 最低检测限为 153.8 copies/ μ L。由此可见,本实验建立的 ddPCR 检测方法的灵敏度高于相对应建立的 qPCR 方法及其它检测 PCV3 的方法。在 110 份实际样品检测中,本实验建立的 ddPCR 与 qPCR 两种方法检测结果的 Kappa 系数

为 0.9529,说明两种方法的检测结果高度一致,并且 ddPCR 能对 qPCR 检出的可疑样本进行验证并精确定量。

3.4 尽管 ddPCR 存在一定局限性,如仪器和实验耗材成本相对较高。但其独特的技术优势和广阔的应用前景,在未来几年内,数字 PCR 有望克服现有局限发展成为实验室中的标准工具。总之,本实验建立的数字 PCR 检测猪胸膜肺炎放线杆菌具有高度的特异性、灵敏度和准确性,能对低浓度样本进行检测和准确定量,为猪胸膜肺炎的监测、流行病学调查和质控等提供了一个切实可行的解决方案。

参考文献

- [1] Bosse J T, Janson H, Sheehan B J, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Pathobiology and pathogenesis of infection [J]. *Microbes Infect*, 2002, 4(2): 225-235
- [2] 王亚军,段艳萍,邱翔宇.猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离与鉴定[J].*兽医导刊*,2008,2:17-18
WANG Ya-jun, DUAN Yan-ping, QIU Xiang-yu. Isolation and identification of pig infectious pleural pneumonia actinomycetes [J]. *Veterinary Guide*, 2008, 2: 17-18
- [3] Jacques M. Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Can J Vet Res*, 2004, 68(2): 81-85
- [4] 宣春玲,王贵平,李春玲,等.胸膜肺炎放线杆菌溶血外毒素研究进展[J].*动物医学进展*,2009,30(6):82-85
XUAN Chun-ling, WANG Gui-ping, LI Chun-ling, et al. Progress in the study of extra-hemolytic toxins in *Actinomyobacteria* of pleural pneumonia [J]. *Animal Medicine Progress*, 2009, 30(6): 82-85
- [5] Kamp E M, Stockhofe-zurwieden N, van Leengoed L A, et al. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs [J]. *Infection & Immunity*, 1997, 65(10): 4350-4354
- [6] Jansen R. The RTX Toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 1994, 169
- [7] 陈华美,肖国生,文心田.猪胸膜肺炎放线杆菌的血清型分型及毒力因子研究进展[J].*中国兽药杂志*,2006,4:35-40
CHEN Hua-mei, XIAO Guo-sheng, WEN Xin-tian. Advances in the study of serum typing and virulence factors of *Actinobacteria* pig pleural pneumonia [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2006, 4: 35-40
- [8] 李自朋,朱江林.猪传染性胸膜肺炎的综合防治措施[J].*广东畜牧兽医科技*,2005,30(2):48-49
LI Zi-peng, ZHU Jiang-lin. Integrated control measures for

- pig infectious pleural pneumonia [J]. Guangdong Animal Husbandry and Veterinary Technology, 2005, 30(2): 48-49
- [9] 王妮.猪胸膜肺炎放线杆菌尿素酶的提取及特性研究[D].泰安:山东农业大学,2007
- WANG Ni. Study on the extraction and characteristics of urease from *Actinobacteria* pig pleural pneumonia [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2007
- [10] 李逢慧.复合环媒恒温基因扩增技术的研究[D].长沙:湖南农业大学,2009
- LI Feng-hui. Study on the amplification technique of combined cyclo-mediated constant temperature gene [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2009
- [11] 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 Virology, 2017, 1: 103-107
- [12] 李春勇.数字 PCR 技术原理及应用[J].生物技术世界,2014, 11:10-13
- LI Chun-yong. Principle and application of digital PCR technology [J]. World of Biotechnology, 2014, 11: 10-13
- [13] 夏清燕.柑橘溃疡病微滴数字PCR与定量PCR检测方法的比较研究[D].重庆:重庆大学,2016
- XIA Qing-yan. Comparative study on the detection methods of micro droplet PCR and quantitative PCR for citrus ulcer disease [D]. Chongqing: Chongqing University, 2016
- [14] 王琦,范颖.微滴式数字 PCR 技术进展[J].中国医学前沿杂志(电子版),2016,8(11):15-19
- WANG Qi, FAN Ying. Advances in microdroplet digital PCR technology [J]. Chinese Journal of Medical Frontier (Electronic Edition), 2016, 8(11): 15-19
- [15] 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
- 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 Science and Technology, 2018, 34(1): 221-226
- [16] 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
- [17] 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].雅安:四川农业大学,2016
- ZHAO Shan. Establishment and preliminary application of a method for detection of porcine circovirus type 2 microdroplet digital PCR [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2016
- [18] 郭旭龙,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 microdroplet PCR (ddPCR) for African swine fever virus [J]. Bulletin of Microbiology, 2017, 44(12): 2839-2846
- [19] 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,CN 107267664 A[P]. 2017
- WAN Shao-gui, BAO Den-ke, YANG Qi. DdPCR method, primer and its application and kit for absolute quantitative detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, CN 107267664 A [P]. 2017
- [20] 刘亚娟,聂福平,杨俊,等.猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 LAMP 方法的建立[J].中国兽医学报,2016,36(2):200-205
- LIU Ya-juan, NIE Fu-ping, YANG Jun, et al. Establishment of the method of LAMP for pig infectious pleural pneumonia [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 36(2): 200-205
- [21] 张建新,朱岩昆,马金友,等.猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 PCR 诊断方法的建立与应用[J].中国畜牧兽医,2013,40(4): 69-72
- ZHANG Jian-xin, ZHU Yan-kun, MA Jin-you, et al. Establishment and application of PCR diagnosis method for pig infectious pleural pneumonia [J]. Chinese Animal Husbandry Veterinarian, 2013, 40(4): 69-72