

猪伪狂犬病毒环介导等温扩增技术检测方法的建立

陈珍金, 曹炜伟, 石磊, 叶蕾

(暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

摘要: 为建立通用性猪伪狂犬病毒 (PRV) 环介导等温扩增快速检测方法, 本实验根据 PRV gB 基因序列的保守区段设计四套特异性引物, 基于环介导等温扩增技术引入环引物, 筛选出特异性引物 PRV-1, 对其特异性、灵敏度进行评估, 进行临床样本和人工干扰样本检测试验, 并与实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 检测结果进行比较分析。结果表明该检测方法能够特异性的检出 PRV 的存在, 具有良好的特异性; 灵敏度检测下限为 10 fg/ μ L; 且本文建立的检测方法其结果与临床样品和人工干扰样本 qPCR 检测结果具有高度的一致性。因此, 本实验建立的 PRV 环介导等温扩增检测方法特异性强、灵敏度高, 具有较好的稳定性, 并且操作安全、简便、高效, 该方法的建立为猪伪狂犬病的快速诊断和基层检疫提供了新的选择。

关键词: 猪伪狂犬病毒; gB 基因; 环介导等温扩增技术

文章编号: 1673-9078(2019)09-277-282

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.036

Establishment of Detection Method for Loop-mediated Isothermal Amplification of Porcine Pseudorabies Virus

CHEN Zhen-jin, CAO Wei-wei, SHI Lei, YE Lei

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

Abstract: To establish a universal rapid detection method for porcine pseudorabies virus (PRV) loop-mediated isothermal amplification, four sets of specific primers were designed based on the conserved segments of the PRV gB gene sequence, and loop primers were introduced based on loop-mediated isothermal amplification. The specific primer PRV-1 was screened, and its specificity and sensitivity were evaluated. Clinical samples and artificial interference samples were tested and compared with real-time quantitative real-time PCR (qPCR). The results showed that the detection method could detect the presence of PRV specifically, and had good specificity. The limit of sensitivity detection is 10 fg/ μ L. The results of the detection method established in this work were highly correlated with the results of qPCR detection of clinical samples and artificial interference samples. Therefore, the PRV loop-mediated isothermal amplification detection method established in this work is specific, sensitive, and has good stability. The operation is safe, simple and efficient. It is potential to be a rapid diagnosis and grassroots of pseudorabies.

Key words: porcine pseudorabies virus; gB gene; loop-mediated isothermal amplification

猪伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是由猪伪狂犬病毒 (PRV) 引起的一种以妊娠母猪流产、死胎, 公猪不育, 新生仔猪大量死亡, 育肥猪呼吸困难、生长停滞等为特征的急性接触性传染病, 该病传播速度快、范围广, 给我国养猪产业造成了巨大的经济损失, 是危害我国养猪业的重大传染病之一^[1-3]。猪伪狂犬病毒隶属于疱疹病毒科, 病毒粒子为圆形, 直径 150~180 nm, 核衣壳直径为 105~110 nm, 病毒粒子的最

外层是病毒囊膜, 它是由宿主细胞衍生而来的脂质双层结构^[4,5]。PRV 基因组为线性双链 DNA, 大小约 150 kb, 有 10 个不同的糖蛋白 (gB、gC、gD、gE、gH、gI、gK、gL、gM、gN) 参与病毒复制、免疫和致病过程, 其中 gB 糖蛋白为较保守的必须糖蛋白, 可促进病毒囊与宿主细胞的融合, 并诱导中和抗体产生^[6,7]。因此, 检测 PRV gB 抗原是判定是否存在 PRV 的重要手段之一。

快速诊断是控制猪伪狂犬病的重要方法之一, 目前诊断猪伪狂犬病的传统方法主要有病毒分离和鉴定、酶联免疫吸附和免疫组化试验等, 但这些方法都存在着技术水平要求高、用时长和灵敏度低等缺点, 不适用于日常诊断分析^[8-11]。近年来, 以分子生物学为基础的检测方法包括反转录聚合酶链式反应

收稿日期: 2019-04-24

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2017A030310175); 国家重点研发计划畜禽养殖专项 (2016YFD0500600)

作者简介: 陈珍金 (1994-), 女, 硕士生, 研究方向: 食品微生物检测技术
通讯作者: 叶蕾 (1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品微生物检测技术

(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 和实时荧光 PCR (qPCR) 因其灵敏度高、特异性强和方便快捷而广泛应用于临床诊断, 但是 RT-PCR 操作较为复杂, 需用跑胶设备进行分析; qPCR 需使用昂贵的仪器设备并依赖标准曲线进行定量检测^[12,13]。由于仪器限制, 导致该检测技术不能很好得应用于广大基层单位, 无法对猪伪狂犬病做到早期诊断, 对养猪业造成了极大的经济损失^[14,15]。因此, 亟需研究开发一种快速准确、经济简便而易于操作的分子检测方法, 以便应用于广大基层单位, 提升基层用户的诊断水平。

环介导等温核酸扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一种新型核酸扩增技术, 在恒温条件下利用 *Bst* DNA 聚合酶和根据靶序列设计的两对特殊的内、外引物, 特异性识别靶序列上的六个独立区域, 启动循环链置换反应产生哑铃状 DNA, 并以自身为模板, 进行 DNA 合成延伸, 形成茎-环 DNA 结构, 因其具有特异性强、灵敏度高、检测成本低和操作步骤简单等特点, 已广泛应用于多种病原体的快速检测^[16]。本研究将基于 LAMP 检测技术开发猪伪狂犬病毒检测试剂盒, 实现快速准确、易于操作的检测目的, 从而向广大基层用户推广使用, 做到猪伪狂犬病的早期诊断, 做好预防, 从源头上控制疫情发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料

伪狂犬活疫苗、猪瘟活疫苗和高致病性猪呼吸与繁殖综合征活疫苗 (GDr180) 购自广东永顺生物制药有限公司; 伪狂犬活疫苗、高致病性猪呼吸与繁殖综合征活疫苗 (GDr180) 和猪圆环病毒 2 型活疫苗购自哈尔滨兽医研究所; 猪瘟活疫苗购自中牧实业股份有限公司; 猪圆环病毒 2 型活疫苗购自武汉科前生物股

份有限公司; 高致病性猪呼吸与繁殖综合征活疫苗 (JXA1-R) 购自广东大华农动物保健品股份有限公司; 猪胸膜炎放线杆菌、大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌由华南理工大学惠赠。猪伪狂犬病毒实时荧光 PCR 检测试剂盒购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司; 127 个临床样品由广东永顺生物制药有限公司惠赠。

1.1.2 主要试剂盒耗材

Bst DNA polymerase large fragment, 购自 New England Biolabs 公司; SYTO-9 荧光染料, 购自 Life Technologies Corporation; 引物(正向外引物 F3、正向内引物 FIP、反向内引物 BIP、反向外引物 B3、正向环引物 LoopF、反向环引物 LoopB), 订自生工生物工程 (上海) 有限公司; 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 (R4410-03) 购自 Magen 公司。

1.2 仪器与设备

-80 °C 冻存柜, DAYA-024, Thermo Fisher Scientific; 高速台式离心机, PICO17, Thermo Fisher Scientific; 漩涡混合器, MS2, 德国 IKA 公司; 微量移液器, 1000 μL、200 μL、100 μL、10 μL、2.5 μL, Thermo Fisher Scientific; QuantStudio™ 6 Flex, 美国 Life Technologies; Nano Drop vue plus 超微量分光光度计, 美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计

针对 PRV 编码 gB 蛋白的特异保守区域, 按照 LAMP 引物设计原则, 应用在线引物设计软件 Primer Explorer version4 (<http://primerexplorer.jp/e>) 进行 LAMP 引物设计, 其中包括两条外引物 F3、B3, 两条内引物 FIB、BIP 和两条环引物 LF、LB, 具体引物信息如表一所示。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 LAMP 引物序列

Table 1 LAMP primer sequences

名称	引物探针名称	引物序列 5'-3'
PRV-1	PRV-1B-F3	TGTACTACGAGGACTACAAC
	PRV-1B-B3	CCAGCACCAGCAGCC
	PRV-1B-FIB	TCTCGCTGTAGTCCAGGAGACGATCAGCACGC
	PRV-1B-BIP	GCATCGCCAACCTTCTCCAGGACAGGAAGGACACCA
	PRV-1B-LF	CAGCAGCGTCAGGTTCA
	PRV-1B-LB	GTCGGCAAGGTGGTCC

转下页

接上页

PRV-2	PRV-2B-F3	TCGCCGTGCTCTTCA
	PRV-2B-B3	GCGTAGCCGATGTGC
	PRV-2B-FIB	GGCGGTACCTTGTGGTTGAACCGCTTCACAGACC
	PRV-2B-BIP	GCGGCTGGCACACCAGCCTCCACCTCCTCG
	PRV-2B-LF	CGTCCGTGATCTCCTGC
	PRV-2B-LB	CAACGACACCTACACCAAGA
PRV-3	PRV-3B-F3	CAAGTGCCTTCCAAGG
	PRV-3B-B3	GTGAAGCGGAAGGAGC
	PRV-3B-FIB	CGCCGATCTTGGTGTAGGTGAGGTGACCGCCTTCG
	PRV-3B-BIP	CCAGCAGGTGGAGCACTACGCCACCGTGAAGTGC
	PRV-3B-LF	TCGTTGGTGGTGTGCC
	PRV-3B-LB	GCCTCCGAGAGCGTG
PRV-4	PRV-4B-F3	GCGACGACAACGAGC
	PRV-4B-B3	GGACAGGAAGGACACCA
	PRV-4B-FIB	GTCCTCCAGCAGCGTCAGTGTACTACGAGGACTACAAC
	PRV-4B-BIP	GACTACAGCGAGATCCAGCGTGAAGAAGTTGGCGATG
	PRV-4B-LF	CGTGCTGATCGTCTCGG
	PRV-4B-LB	GCGTGGTCAAGGTGGA
	PRV-5B-B3	CCGCTGTTCTTCTTG
	PRV-5B-FIB	CTGGAAGAAGTTGGCGATGCTACAGCGAGATCCAGCG
	PRV-5B-BIP	GTCACGACGAAGACGCTCAACCGACACGATGGACATG
	PRV-5B-LF	TCCACCTTGACCACGC
PRV-5B-LB	TCGACGAAGGCGACG	

1.3.2 病毒 DNA 的提取

PRV DNA 提取参照 Magen 公司的病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 (R4410-03) 说明书进行操作, 将提取的 DNA 用无 DNA 酶水溶解, 于 -80 °C 保存。

1.3.3 含伪狂犬病毒靶基因的阳性质粒的构建

以伪狂犬病毒 DNA 为模板, 用特异性引物 FP: *tggccatcgccccga*, BP: *gtgctacagcccccgtgtcacctt* 进行 PCR 反应, 将目的片段回收后与 pMD18-T 载体进行连接, 转化 DH-5 α 感受态细胞后挑菌培养, PCR 及 LAMP 方法验证克隆。

1.3.4 PRV LAMP 检测方法反应体系的建立

参照广州双螺旋生物公司的实时荧光 LAMP 扩增试剂盒说明书, 25 μ L 反应体系成分如下: 12.5 μ L 反应液 RM, 8.0 μ L 超纯水 DW, 0.5 μ L 10 \times SYTO-9, 1 μ L 引物 PM, 1 μ L Bst 酶以及 2 μ L 模板。

1.3.5 PRV LAMP 特异性实验

以猪瘟病毒、猪圆环病毒 2 型、高致病性猪呼吸与繁殖综合征病毒、猪胸膜炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌等 8 种病原的 DNA 为检测模板, 分别加入到 1.3.4 建立的恒温扩增反应体系中进行检测, 验证该检测方法的特异性。

1.3.6 PRV LAMP 灵敏度实验

将 PRV 质粒 DNA 进行 10 倍比稀释, 稀释度从 1 ng/ μ L 到 0.01 fg/ μ L, 每个稀释度取 2 μ L 作为模板加入到 1.3.4 建立的反应体系中进行恒温扩增, 测试本研究建立的 PRV LAMP 检测方法的灵敏度。

1.3.7 临床样品检测

用建立的恒温检测方法和北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的猪伪狂犬病毒实时荧光 PCR 检测试剂盒同时对 127 个临床样品进行检测, 评价并比较实际应用性。

1.3.8 人工干扰实验

利用本实验室建立的 LAMP 检测方法对 127 个临床样品中 23 个阴性临床样品进行人工干扰操作, 将 2 μ L 由 Nano Drop vue plus 超微量分光光度计测得的 1 ng/ μ L PRV 疫苗核酸分别添加到 23 份 18 μ L 的临床样品中, 震荡混匀, 制成人工污染的临床样品, 分别进行 2 个重复试验, 并对 PRV 阳性质粒 DNA 标准样品和超纯水阴性对照组进行扩增。同时用世纪元亨试剂盒和 LAMP 方法检测人工污染后的临床样品, 评价 LAMP 检测方法是否受不同的临床样品背景干扰。

2 结果与讨论

2.1 PRV 引物筛选和反应体系的建立

将设计的4套引物均配制成10 μM引物工作液，然后取1 μL进行恒温扩增反应。选择广东永顺生物制药有限公司生产的伪狂犬活疫苗和哈尔滨兽医研究所生产的伪狂犬活疫苗提取核酸作为阳性对照(Positive Control, PC)，广东永顺生物制药有限公司生产的猪瘟活疫苗和超纯水作为阴性对照(Negative Control, NC)，结果图如下：

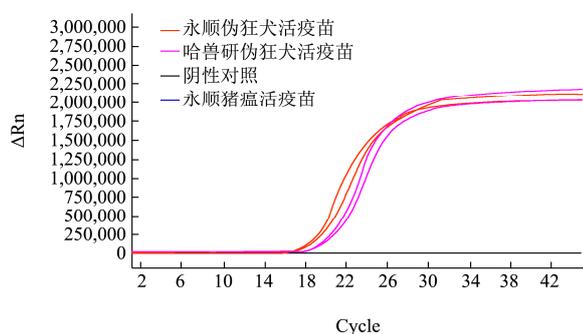


图1 PRV-1 引物筛选检测结果

Fig.1 PRV-1 primer screening test results

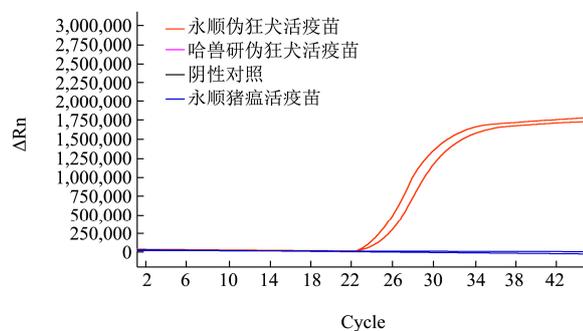


图2 PRV-2 引物筛选检测结果

Fig.2 PRV-2 primer screening test results

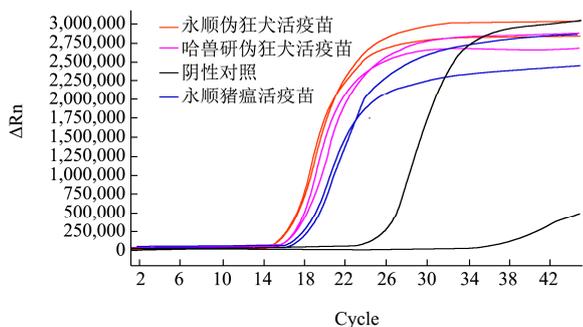


图3 PRV-3 引物筛选检测结果

Fig.3 PRV-3 primer screening test results

由四种引物筛选检测结果对比可知，四种引物均

出现S型扩增曲线，但仅有PRV-1引物未发生非特异性扩增，且永顺伪狂犬活疫苗和哈尔滨兽医研究所生产的伪狂犬活疫苗样品均特异性检出，从扩增曲线上分析，PRV-1组的扩增效果较好，分别在14、16循环左右开始出峰，重复性较稳定，特异性扩增相对准确，相比于其他三种引物出峰时间最早，故选取PRV-1引物进行后续实验。

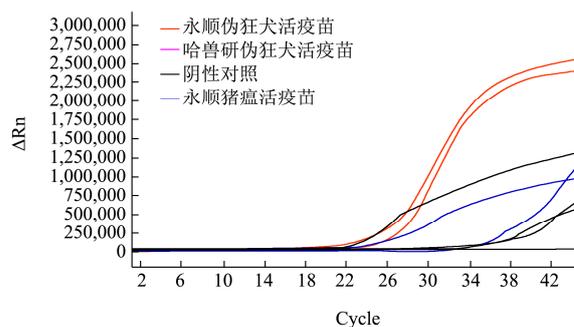


图4 PRV-4 引物筛选检测结果

Fig.4 PRV-4 primer screening test results

2.2 恒温检测 PRV 的特异性

以猪瘟病毒、猪圆环病毒2型、高致病性猪呼吸与繁殖综合征病毒、猪胸膜炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌等8种病原的DNA为对照检测模板超纯水为阴性对照，测试本研究建立的PRV实时荧光恒温检测方法的特异性。结果如图5所示，实验结果表明：PRV-1LAMP引物仅对永顺伪狂犬活疫苗和哈尔滨兽医研究所生产的伪狂犬活疫苗样品出现特异的S型扩增曲线，阴性对照和上述8种病原均未发生扩增，该结果表明所建立的LAMP检测方法具有良好的特异性。

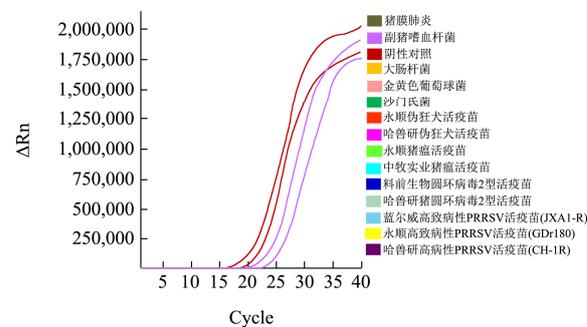


图5 特异性检测结果

Fig.5 specific test results

2.3 恒温检测 PRV 的灵敏度

将质粒DNA进行10倍梯度稀释(1 ng/μL~0.01 fg/μL)作为模板进行恒温扩增，每个样本进行3次重

复试验,以超纯水作为阴性对照。结果如图6所示,实验结果表明,随着质粒DNA浓度的依次递减,各扩增曲线的出峰时间也随之延长,0.1 fg/μL样品出现S型特异性曲线,但三次重复试验并未完全检出,且出峰循环数与10 fg/μL扩增曲线交叉,故恒温检测PRV质粒的检出限为10 fg/μL,该浓度质粒DNA出峰循环数为36左右。

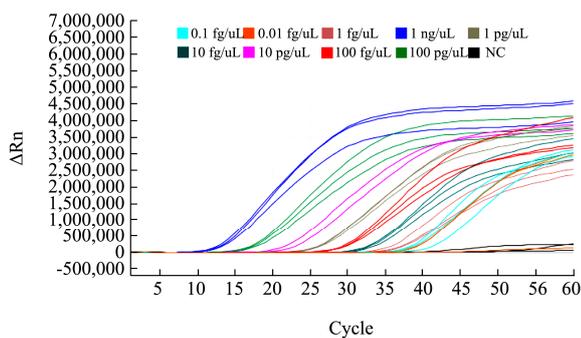


图6 灵敏度检测结果

Fig.6 Sensitivity test results

2.4 临床样品检测

用建立的恒温检测方法和北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的猪伪狂犬病毒实时荧光PCR检测试剂盒同时对127个临床样品进行检测,检测对比结果如表2。

表2 临床样本检测结果对比表

Table 2 Comparison of clinical sample test results

对比项	世纪元亨试剂盒		合计
	阳性	阴性	
本研究检测方法	阳性	0	0
	阴性	0	127
合计	0	127	127

由实验结果可知,本研究的恒温检测方法与世纪元亨的实时荧光PCR方法所测得的阴性样本结果数均为127,阳性样本数均为0,总符合率为100%。由于目前检测阳性样本数较少,需后续增加样本数判断两种方法的一致性。

2.5 人工干扰样本检测

从127个临床样品中随机抽取23个阴性临床样品进行人工干扰操作,所得的人工干扰样本PRV浓度为100 pg/μL,用建立的恒温检测方法和北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的猪伪狂犬病毒实时荧光PCR检测试剂盒同时对23个人工干扰样品进行检测,检测对比结果如表3。

由表3可知,LAMP和qPCR检测方法对人工干扰

的23个阴性临床样品的检测结果都为阳性,总符合率为100%,且由人工干扰样本PRV浓度为100 pg/μL可得,本试验所设计引物组的特异性扩增反应不受影响,建立的LAMP检测方法不易受样本背景干扰,仍能保证其检测效果,具有良好的稳定性和特异性。

表3 人工干扰样本检测结果对比表

Table 3 Comparison table of artificial interference sample test results

对比项	世纪元亨试剂盒		合计
	阳性	阴性	
本研究检测方法	阳性	23	23
	阴性	0	0
合计	23	23	46

3 总结

3.1 猪伪狂犬是猪急性传染病之一,猪作为PRV唯一天然宿主,高死亡率更是给猪生产行业造成重大的经济损失。目前,接种Bartha-61疫苗是大多数国家和地区控制猪群PR的流行主要方法^[17]。但是,近年来猪伪狂犬病在我国重新流行起来,传统疫苗的作用越来越小,养猪产业受到严重冲击^[18]。传统的诊断方法如PCR等虽然精确但受制于设备、时间、操作等的限制而不能在基层广泛使用。因此,建立一种灵敏、快速、简便、高效、稳定的猪伪狂犬检测方法在PR防控中非常重要。

3.2 本研究成功建立了检测PRV的LAMP方法,在内外引物的基础上引入环引物以缩短反应时间,提高灵敏度。根据当前的PRV基因类型,针对猪伪狂犬病编码gB蛋白的特异性基因序列设计4套引物,初步筛选出相对稳定的特异性引物PRV-1,保证后续试验的准确性。本试验通过对PRV-1进行特异性、灵敏度试验,表明该方法对高致病性猪呼吸与繁殖综合征病毒、猪瘟病毒、猪圆环病毒2型、猪胸膜炎放线杆菌、大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的检测均不表现为阳性,特异性良好,且本研究所建立的LAMP方法在DNA模板浓度为10 fg/μL时仍能扩增出目的片段,表明本试验建立的LAMP方法具有较好的灵敏度。利用本试验建立的恒温检测方法与世纪元亨qPCR检测方法分别检测127个临床样品和23个人工干扰样本,实验结果总符合率为100%,且表明本试验所设计引物组的特异性扩增和建立的LAMP检测方法不易受样本背景干扰,具有良好的稳定性和特异性。在相对于普通PCR,本文所建立的LAMP检测方法能够更快地扩增产生结果,不仅操作安全方便,检测方法特异性高,对于低浓度的PRV样品检测时间更短,且

在操作方法上以及准确度上都有明显优势。

3.3 目前,随着我国猪群产业的不断发展,猪伪狂犬病病毒对猪群产业经济损失的影响越来越大,本试验建立的环介导等温扩增检测技术对PRV检测速度快、特异性好、灵敏度高、检测结果稳定,还简化了检测操作和设备要求,该方法提高了猪伪狂犬病的检测和防控能力,为猪伪狂犬病的基层检测提供一种新的选择。

参考文献

- [1] 刘亚东.猪伪狂犬病毒双重 PCR 检测方法的建立及初步应用[D].长春:吉林农业大学,2018
LIU Ya-dong. Establishment and preliminary application of double PCR detection method for pseudorabies virus [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018
- [2] 庞旋飞,练斯南,伍建敏,等.伪狂犬病病毒 FS-2015 株 gE 和 gB 基因序列分析[J].中国畜牧兽医,2018,45(12):3524-3534
PANG Xuan-fei, LIAN Si-nan, WU Jian-min, et al. Sequence analysis of gE and gB genes of pseudorabies virus FS-2015 strain [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 45(12): 3524-3534
- [3] 于占松,李忠刚,李学德.伪狂犬病的诊断与防治[J].山东畜牧兽医,2018,39(2):81-82
YU Zhan-song, LI Zhong-gang, LI Xue-de. Diagnosis and prevention of pseudorabies [J]. Shandong Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 39 (2): 81-82
- [4] 陈如敬,周伦江,吴学敏,等.猪伪狂犬病毒 gB 基因序列分析[J].福建农业学报,2016,31(11):1139-1144
CHEN Ru-jing, ZHOU Lun-jiang, WU Xue-min, et al. Sequence analysis of gB gene of pseudorabies virus in pigs [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2016, 31(11): 1139-1144
- [5] 郑书轩,徐胜男,时建立,等.伪狂犬病病毒 LAMP 检测方法的建立与应用[J].中国兽医科学,2017,47(2):143-149
ZHENG Shu-xuan, XU Sheng-nan, SHI Jian-li, et al. Establishment and application of LAMP detection method for pseudorabies virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2017, 47(2): 143-149
- [6] 王华俊,班付国,赵雪丽,等.猪伪狂犬病毒 gB 抗原侧向层析快速检测试纸条的研制[J].中国动物检疫,2018,35(12):85-90
WANG Hua-jun, BAN Fu-guo, ZHAO Xue-li, et al. Development of a rapid detection test strip for pig pseudorabies virus gB antigen lateral chromatography [J]. Chinese Animal Quarantine, 2018, 35 (12): 85-90
- [7] 李娇阳,董虎,郭慧琛,等.伪狂犬病病毒 gB 抗原的可溶性原核表达及纯化条件的优化[J].中国兽医科学,2018,48(2):175-181
LI Jiao-yang, DONG Hu, GUO Hui-chen, et al. Soluble prokaryotic expression of pseudorabies virus gB antigen and optimization of purification conditions [J]. Chinese Journal of Veterinary Sciences, 2018, 48(2): 175-181
- [8] 庄金秋,梅建国,李峰,等.猪巨细胞病毒检测方法研究进展[J].猪业科学,2016,33(3):104-107
ZHUANG Jin-qi, MEI Jian-guo, LI Feng, et al. Research progress in detection methods of porcine cytomegalovirus [J]. Pig Science, 2016, 33(3): 104-107
- [9] 尹秀凤,王艳,姜平,等.副猪嗜血杆菌 PCR 检测方法的建立与应用[J].中国兽医学报,2007,2:180-183
YIN Xiu-feng, WANG Yan, JIANG Ping, et al. Establishment and application of PCR detection method for *Haemophilus parasuis* [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2007, 2: 180-183
- [10] 朱俊灵,叶佐东,邓洁汝,等.猪瘟疫病毒 RT-LAMP-LFD 检测方法的建立与应用[J].华南农业大学学报,2016,37(1):1-7
ZHU Jun-ling, YE Zuo-dong, DENG Jie-ru, et al. Establishment and application of RT-LAMP-LFD detection method for classical swine fever virus [J]. Journal of South China Agricultural University, 2016, 37(1): 1-7
- [11] 庄金秋,梅建国,李峰,等.猪捷申病毒检测方法研究进展[J].动物医学进展,2013,7:80-83
ZHUANG Jin-qi, MEI Jian-guo, LI Feng, et al. Research progress in detection methods of pig Jieshen virus [J]. Progress in Animal Medicine, 2013, 7: 80-83
- [12] 王静,许鑫,王雪雨,等.环介导等温扩增技术检测食品安全的研究进展[J].中国生物工程杂志,2018,38(11):84-91
WANG Jing, XU Xin, WANG Xue-yu, et al. Research progress in detection of food safety by ring-mediated isothermal amplification technique [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 38(11): 84-91
- [13] Chen, X W; Wang, Q; Yin, M, et al. Rapid and simple detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (prsv) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2018, 50(5): 1799-1805

(下转第 290 页)