

# 副猪嗜血杆菌微滴数字 PCR 定量检测方法的建立

石磊, 温雯, 李丽丽

(暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

**摘要:** 根据副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) OMP P2 基因的保守序列设计特异性引物和 TaqMan 探针, 通过反应条件优化和特异性、敏感性、重复性试验以及临床样品的检测, 建立可对其准确定量的微滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 检测方法, 并与实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 检测方法进行比较分析。结果表明, 该方法与猪传染性胸膜肺炎放线杆菌、猪链球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及猪圆环病毒 2 型、猪瘟病毒无交叉反应; 其灵敏性优于 qPCR, 线性相关系数 ( $R^2$ ) 为 0.996, 呈良好线性关系, 最低可检测到 2.647 copies/ $\mu\text{L}$  的阳性质粒, 变异系数为 3.29%。临床样品定量检测结果表明, ddPCR 具有敏感性高、特异性好等优点, 其检出率稍高于 qPCR。本研究建立的 ddPCR 能够准确定量检测 HPS, 将为 HPS 相关研究提供有益参考。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; 微滴数字 PCR; 检测方法

文章编号: 1673-9078(2018)12-216-220

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.032

## Development of a Droplet Digital PCR for the Detection of *Haemophilus parasuis*

SHI Lei, WEN Wen, LI Li-li

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

**Abstract:** Specific primers and one TaqMan probes were designed according to the conserved sequence of the OMP P2 gene of *Haemophilus parasuis* (HPS) in this study. An accurate quantitative droplet digital PCR (ddPCR) method was developed through the optimization of reaction conditions, specificity, sensitivity and reproducibility tests, analysis of clinical samples, and comparison with the real-time quantitative PCR (qPCR). Under the optimized reaction conditions, the results showed that ddPCR exhibited no cross-reactions with *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Porcine circovirus 2, and swine fever virus. The developed method had a higher sensitivity than qPCR with a correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.996, a good linearity, detection limit of positive plasmid as 2.647 copies/ $\mu\text{L}$ , and coefficient of variation as 3.29%. The quantitative analysis results of clinical samples showed that ddPCR possessed advantages of high sensitivity and good specificity with a detection rate slightly higher than that for qPCR. The ddPCR developed in this study can accurately and quantitatively detect HPS, which will provide a useful reference for HPS related research.

**Key words:** *Haemophilus parasuis* (HPS); droplet digital PCR (ddPCR); detection

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)是猪上呼吸道的一种常在菌。在一定条件下可引起严重的全身性疾病, 以纤维素性多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎为主要特征, 该病原引起的疾病又称为格氏病<sup>[1,2]</sup>。副猪嗜血杆菌有 15 个以上血清型<sup>[3]</sup>, 血清 1、5、10、12、13 和 14 型是引发猪发病和死亡的强毒血清型; 血清型 2、4 和 15 是可引起多发性浆膜炎的中等独立

收稿日期: 2018-08-02

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项目 (2017MS104; 21618309); 广东省科技计划项目 (2017B020207004)

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

型; 血清型 8 属于弱毒力型, 血清型 3、6、7、9 和 11 为不引起临床症状的无毒力型, 我国以血清 4 和 5 型流行最多<sup>[4,5]</sup>。副猪嗜血杆菌病死亡率较高, 病发后不易治愈, 病死率高达 50%<sup>[6]</sup>。该病传染性强, 且多与其他病原如猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒等混合感染, 严重危害仔猪和青年猪的健康<sup>[7]</sup>。该病在我国已呈现出流行趋势, 给养猪业带来了巨大的经济损失<sup>[8,9]</sup>。为此, 建立早期快速检测方法对副猪嗜血杆菌感染的预防和控制具有十分重要的意义。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 提出至今已有 20 年时间, 在此期间, PCR 也已发展成为分子生物学领域的一项常规且关键的技术, 并且极大地推动着生命科学各领域的发展<sup>[10]</sup>。

目前,实验室常用的检测副猪嗜血杆菌的方法有细菌分离、血清学诊断技术<sup>[11]</sup>和分子生物学检测技术(常规 PCR<sup>[12]</sup>,实时荧光定量 PCR<sup>[9]</sup>和环介导等温扩增技术<sup>[13]</sup>等)。传统的细菌分离和血清学检测方法,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。PCR 操作复杂,需对结果进行跑胶分析,且灵敏度较低;实时荧光 PCR 需使用昂贵的仪器设备并依赖标准曲线进行定量检测,灵敏度仍存在一定的局限性;环介导等温扩增技术由于引物间的非特异性扩增而易出现假阳性结果。

数字 PCR (digital PCR, dPCR) 是近十年来兴起的第三代 PCR 技术<sup>[14,15]</sup>,其原理是将预混的 PCR 反应体系进行微滴化处理,形成几万至几十万油包水的液化微滴中,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<sup>[16]</sup>。与实时荧光 PCR 相比,该方法采用直接计数目标分子数而不依赖任何校准物或外标,通过计数单个分子从而实现绝对定量<sup>[17]</sup>,故而具有精准、灵敏度超高和不易受 PCR 抑制物影响等优点<sup>[18]</sup>。本研究旨在建立特异、灵敏、准确的 HPS ddPCR 的定量检测方法,并与传统 qPCR 进行比较,以期 HPS 定量检测提供新方法和借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验菌株

HPS、猪传染性胸膜肺炎放射杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由本实验室保存;猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus2, PCV2) 疫苗、猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 灭活疫苗、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 主要试剂

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。

#### 1.1.3 主要设备

NanoDrop veu plus 核酸蛋白分析仪,美国 Thermo 公司; ABI 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。

## 1.2 方法

### 1.2.1 探针和引物设计

根据 HPS 的 OMP P2 基因<sup>[19]</sup>保守区,使用 Primer Premier 3.0 设计合成特异性的 real-time PCR 引物探针,扩增片段为 65 bp。所有引物、探针和质粒均由生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

引物探针名称	序列 (5'-3')	长度
HPS-OMP-F	TCGCCTTGGCCGTAATTCTA	
HPS-OMP-R	ACGTAAGCCTTTTCTGTTGTAACATC	65 bp
HPS-OMP-Probe	FAM-AAATGATGCAGGATGGG-MGB	

### 1.2.2 核酸的提取

按照 Magen 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 HPS、SS、APP、*B.subtilis*、*E.coli*、*Salmonella*、*S.aureus* 的 DNA; 按照 Magen 病毒 RNA/DNA 小量提取试剂盒说明书提取 PCV2 的 DNA, CSFV 的 RNA, 并按照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+g DNA wiper) 的说明书将 CSFV 的 RNA 反转录为 cDNA, 均保存于 -80 °C 备用。

### 1.2.3 qPCR 反应体系和条件

采用设计好的引物和探针建立实时荧光定量 PCR 方法, qPCR 总反应体系为 20  $\mu$ L, 包括: AceQ

qPCR Probe Master Mix 10  $\mu$ L; 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L; 探针 (10  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ L; 模板 1  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 34 s, 共 30 个循环。将质粒进行 10 倍梯度稀释, 检测后用于绘制 qPCR 标准曲线。

### 1.2.4 ddPCR 反应体系和条件优化

ddPCR 设置引物浓度 400~900 nmol/L、探针浓度 100~300 nmol/L、退火温度 55~65 °C, 加入 ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) 10  $\mu$ L, 用水补足至 20  $\mu$ L, 进行 ddPCR 扩增, 扩增条件为: 95 °C 10 min, 94 °C 30 s, 55~65 °C 1 min, 40 个循环; 98 °C 10

min; 4 °C 60 min, 升降温速率 2 °C/s。通过比较 ddPCR 的微滴生成数, 微滴分布状态、微滴荧光信号的强度等来确定优化的结果。

### 1.2.5 特异性试验

分别以 HPS、PCV2、APP、SS、*B.subtilis*、*E.coli*、*Salmonella*、*S.aureu* 的 DNA 以及 CSFV 的 cDNA 为模板, 按照优化后体系进行 ddPCR 检测, 验证特异性。

### 1.2.6 重复性试验

用已优化好的 ddPCR 方法进行重复性试验。在 20 μL 的反应体系中加入 1 μL 稀释好的模板, 重复 3 次 ddPCR 试验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 qPCR 方法建立

将  $2.647 \times 10^{10}$  copies/μL 的 HPS 质粒进行 10 倍倍比稀释, 以此为模板作荧光定量 PCR, 得到荧光定量 PCR 扩增曲线, 见图 1。结果表明: qPCR 可检测到  $2.647 \times 10^2$  copies/μL 的质粒 DNA, 表明其灵敏性较好。

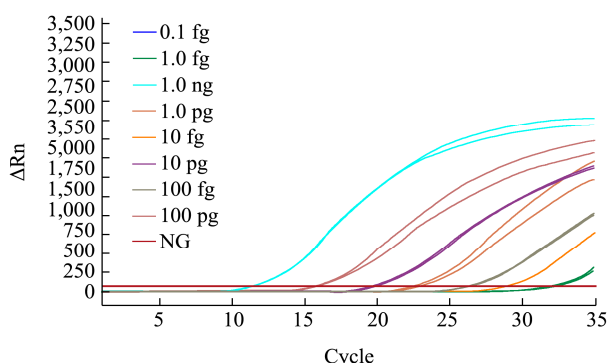


图1 qPCR 扩增 HPS 的曲线图

Fig.1 Amplification curve for *Haemophilus parasuis* by qPCR

注: 从左到右标准品拷贝数依次为  $2.647 \times 10^8 \sim 2.647 \times 10^2$ 。

### 2.2 反应条件的确定

确定最佳 ddPCR 引物探针浓度和扩增条件为: 引物的浓度为 400 nmol/L, 探针浓度为 200 nmol/L。ddPCR 扩增条件: 95 °C 10 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 40 个循环; 98 °C 10 min; 4 °C 60 min, 升降温速率 2 °C/s。

### 2.3 液滴数字 PCR 扩增

当液滴数字 PCR 扩增生成的微滴数目在 12000 以上, 表明微滴反应正常, 可以对其进行后续的定量分析。由图 2a 可知, 经过优化的 ddPCR 反应体系对 HPS 的扩增结果较好, 微滴散点图中阴阳性微滴分界明显。且由图 2b 可知, 阳性微滴和阴性微滴明显分为

两簇, 中间弥散的微滴数目很少, 表明其扩增效果良好。本实验中, HPS DNA 初始模板为  $2.647 \times 10^5$  copies/μL, 随着 DNA 模板浓度降低, 阳性微滴数量相应减少。由图 3 可知, 经过优化的反应条件适合进行 HPS ddPCR 的定量分析。

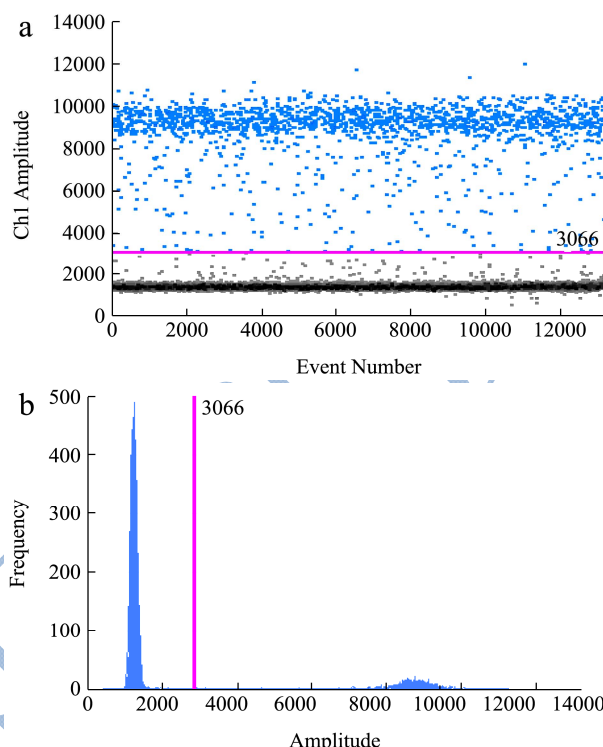


图2 ddPCR 扩增 HPS 的图

Fig.2 Amplification map of *Haemophilus parasuis* by ddPCR

注: a 为微滴散点图, 横、纵坐标分别为微滴数、荧光强度, 阴性微滴以灰色显示, 阳性液滴以蓝色显示; b 为微滴频率分布图, 横、纵坐标分别为荧光强度、微滴数, 故荧光强度较低的左边一簇对应阴性液滴, 较高的右边一簇对应阳性液滴。

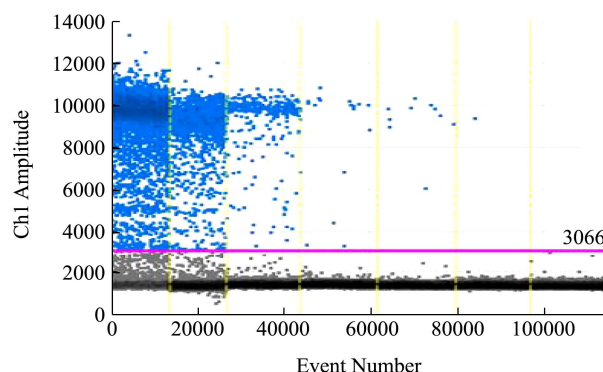


图3 HPS ddPCR 扩增不同浓度模板的微滴散点图

Fig.3 ddPCR amplification of droplet scatter plots of different concentration templates

注: 从左到右标准品拷贝数依次为  $2.647 \times 10^5 \sim 2.647 \times 10^0$ 、NTC。

### 2.4 标准曲线和最低检测限

ddPCR 和 qPCR 的标准曲线分别见图 4 和图 5。由图可知, ddPCR 的  $R^2$  值为 0.9955, 斜率为 -0.886, 最低检测限为 2.647 copies/ $\mu$ L。qPCR 的  $R^2$  值为 0.9917, 斜率为 -1.406, 最低检测限为 26.47 copies/ $\mu$ L。结果表明: ddPCR 和 qPCR 的线性关系均较好, ddPCR 最低检测限低于 qPCR。

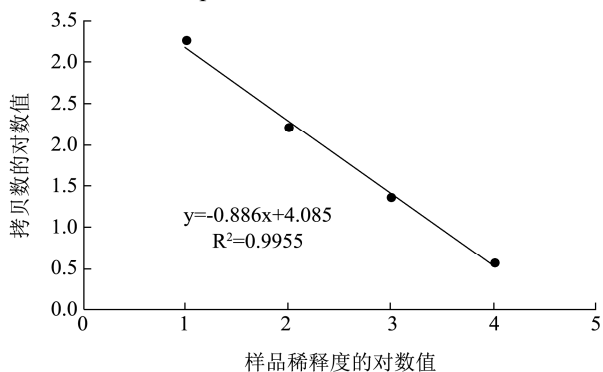


图 4 ddPCR 标准曲线

Fig.4 ddPCR standard curve

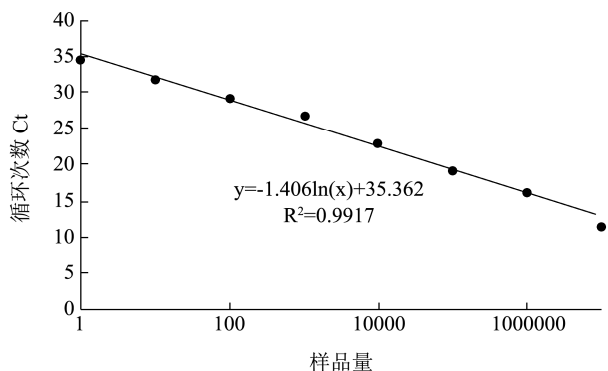


图 5 qPCR 标准曲线

Fig.5 qPCR standard curve

### 2.5 特异性分析

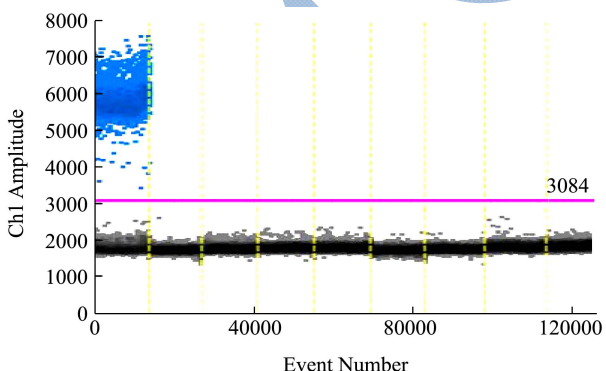


图 6 ddPCR 的特异性实验

Fig.6 Specificity test of ddPCR

注: 从左到右依次为副猪嗜血杆菌、猪胸膜肺炎、猪链球菌、猪圆环病毒 2 型、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、猪瘟病毒、阴性对照。

采用 HPS、APP、SS、PCV2、*B.subtilis*、*E.coli*、*Salmonella*、*S.aureu* 的 DNA 和 CSFV 的 cDNA 进行 ddPCR 特异性验证。结果表明:除了 HPS 特异性扩增, 其他检测均为阴性, 说明该方法特异性较好。

### 2.6 重复性分析

3 次重复试验得到 ddPCR 的结果分别为 1854 copies/ $\mu$ L, 1839 copies/ $\mu$ L, 1953 copies/ $\mu$ L。变异系数为 3.29%, 说明该方法的重复性好、准确度高, 检测结果稳定、可靠。

### 2.7 临床样品的检测

利用本实验建立的 ddPCR 和 qPCR 方法分别对 53 份从猪场采集的样品进行检测。结果显示: 53 份样本中, qPCR 检出 48 份阴性, 2 份为阳性样本 (Ct 值 23~28), 3 份为可疑样本 (Ct 值 33~35); ddPCR 方法检出的 48 份阴性样本, 5 份阳性样本。两者检测结果基本一致。结果表明: 本实验建立的 ddPCR 方法和 qPCR 方法都能检测相应结果, 而 ddPCR 结果更加可靠和精确。

表 2 临床样品检测结果

Table 2 Detection result of field samples		
检测结果	qPCR	ddPCR
阳性	2	5
可疑	3	0
阴性	48	48
总计	53	53

## 3 结论

3.1 传统的数字 PCR 是进行绝对核酸量化的方法, 它基于在有限稀释的条件下将各个分析物分子分配成许多重复反应的绝对核酸定量方法, 在大多数反应中产生 1 个或 0 个分子。终点 PCR 后, 模板的起始浓度通过泊松分布统计分析确定阳性 (含有扩增的靶标) 和阴性 (未扩增的靶标检测的反应)。数字 PCR 比 qPCR 具有许多潜在的优势。近来, 该技术已经商业化, 将反应分为纳米级大小的液滴。数千个液滴的快速微流体分析每个样品使 ddPCR 适用于常规使用, 并大大提高了系统的实际动态范围 (对每个液滴的多个目标分子进行泊松校正) [20]。

3.2 李富祥等 [21] 建立了基于 TaqMan 探针的副猪嗜血杆菌实时荧光定量 PCR 检测方法, 其灵敏度为 692 copies/ $\mu$ L。Wei Xiaoyuan 等 [19] 建立了副猪嗜血杆菌恒温荧光 PCR 检测技术, 灵敏度可达到 1000 copies/ $\mu$ L。

本实验建立的实时荧光定量 PCR 检测方法的最低检测限为 26.47 copies/ $\mu$ L, ddPCR 的最低检测限为 2.647 copies/ $\mu$ L。

3.3 本试验建立了一种定量检测 HPS 的 ddPCR 方法,同时,利用 ddPCR 和 qPCR 这 2 种检测方法对 HPS 进行测定,就灵敏性、重复性、特异性和临床样品检测 4 个方面进行了比较。在定量检测相同稀释度的 HPS DNA 时, ddPCR 和 qPCR 的定量值呈线性正相关,且 ddPCR 方法的灵敏性优于 qPCR。在实际运用过程中, ddPCR 方法的检出率更加可靠。

3.4 数字液滴 PCR 也存在一些不足,例如仪器设备昂贵,每份样品的检测成本较实时荧光 PCR 高;微滴读取速度慢导致检测时间是实时荧光 PCR 的 2~3 倍;荧光通道少(目前只有 FAM、HEX、VIC 通道);样品需稀释到一定浓度方可检测等<sup>[22]</sup>。但是,随着未来数字液滴 PCR 仪器成本的下降、技术的成熟,该技术具有广阔的应用前景。

3.5 总之,本试验建立的 ddPCR 方法灵敏度高、重复性好,特异性强,可进行 HPS 低含量样品检测和定量检测。为 HPS 的检测、流行病学调查、质控等提供了一个切实可行的解决方案。

## 参考文献

- [1] Oliveira S, Blackall P J, Pijoan C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping [J]. American Journal of Veterinary Research, 2003, 64(4): 435-442
- [2] Khaing A T, Ching T S, Abba Y, et al. An outbreak of Glasser's disease from two farms in Malaysia [J]. Journal of Veterinary Advances, 2014, 4(3): 442-448
- [3] Kielstein P, Rapp-gabrielson V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30(4): 862-865
- [4] Zhang J, Xu C, Guo L, et al. Prevalence and characterization of genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from southern China [J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2012, 76(3): 224-229
- [5] Cai X, Chen H, Blackall P J, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China [J]. Veterinary Microbiology, 2005, 111(3-4): 231-236
- [6] 郭旭龙,肖璐,王印,等.十一株副猪嗜血杆菌的分离鉴定及 PaLA 基因的序列分析[J].中国兽医科学,2016,46(4): 479-485  
WU Xu-long, XIAO Lu, WANG Yin, et al. Isolation and identification of 11 *Haemophilus parasuis* strains and sequence analysis of PaLA gene [J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(4): 479-485
- [7] Jung K, Chae C. In-situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in naturally infected pigs [J]. Journal of Comparative Pathology, 2004, 130(4): 294-298
- [8] 司振书,王桂英.副猪嗜血杆菌病研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(6):179-182  
SI Zhen-shu, WANG Gui-ying. Research progress on *Haemophilus parasuis* [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(6): 179-182
- [9] 苗立中,沈志强,韩文瑜.副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].动物医学进展,2012,33(11):85-89  
MIAO Li-zhong, SHEN Zhi-qiang, HAN Wen-yu. Establishment of fluorescence quantitative PCR assay for detection of *Haemophilus Parasuis* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2012, 33(11): 85-89
- [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 digital PCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(1): 221-226, 194
- [11] 蔡旭旺,刘正飞,陈焕春,等.副猪嗜血杆菌的分离培养和血清型鉴定[J].华中农业大学学报,2005,24(1):55-58  
CAI Xu-wang, LIU Zheng-fei, CHEN Huan-chun, et al. Isolation and serotype identification of *Haemophilus parasuis* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2005, 24(1): 55-58
- [12] Angen O, Oliveira S, Ahrens P, et al. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis* [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 119(2-4): 266-276
- [13] Wang Y, Fang Y, Liu Y, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Haemophilus parasuis* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 313(1): 54-60
- [14] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Anal Chem, 2012, 84(2): 1003-1011
- [15] Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. Anal Chem, 2011, 83(22): 8604-8610

- [16] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(2): 1003-1011
- [17] 刘二龙,李婷,高东微,等.转基因甜菜品系 H7-1 的数字 PCR 定量检测方法[J].现代食品科技,2017,33(7):261-269  
LIU Er-long, LI Ting, GAO Dong-wei, et al. Method for quantitative determination of genetically modified sugar beet line H7-1 by using digital polymerase chain reaction [J]. *Modern food science and technology*, 2017, 33(7): 261-269
- [18] Hayden R T, Gu Z, Ingersoll J, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of *cytomegalovirus* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(2): 540-546
- [19] Wei X Y, Xu R T, Wang C G, et al. Loop-mediated isothermal amplification targeting OMP P2 gene for detection of *Haemophilus parasuis* [J]. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2018, 20(2): 230-234
- [20] Hindson C M, Chevillet J R, Briggs H A, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 1003-1005
- [21] 李福祥,熊和丽,姚俊,等.副猪嗜血杆菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2013, 43(12):1268-1273  
LI Fu-xiang, XIONG He-li, YAO Jun, et al. Establishment and application of TaqMan real-time quantitative PCR detection method for *Haemophilus parasuis* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(12): 1268-1273
- [22] 陈亚娜,王静,訾占超,等.伪狂犬病毒微滴数字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, ZI Zhan-chao, et al. Establishment of quantitative PCR detection method for pseudorabies virus microdroplets [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2017, 48(9): 1705-1710