

猪链球菌微滴数字 PCR 定量检测方法的建立

石磊, 温雯, 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: 根据猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) *gdh* 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, 该方法特异性良好, 与猪传染性胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、猪圆环病毒 2 型和伪狂犬病毒无交叉反应; 灵敏度优于 qPCR, 线性相关系数 (R^2) 为 0.991, 呈良好线性关系, 最低可检测到 2.692 copies/ μ L 的阳性质粒; 稳定性好, 变异系数为 1.66%。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, 能对 qPCR 检测的可疑样品进行精确定量。本研究建立的 ddPCR 能够准确定量检测 SS, 将为 SS 相关研究提供有益参考。

关键词: 猪链球菌; 微滴数字 PCR; 检测方法

文章编号: 1673-9078(2019)01-233-238

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.033

Development of Droplet Digital PCR for the Detection of *Streptococcus suis*

SHI Lei, WEN Wen, CHEN Xun, YE Lei, CHANG Yan-lei, LI Li-li

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

Abstract: A droplet digital polymerase chain (ddPCR) detection method, based on *gdh* gene of *Streptococcus suis* was developed to improve the detection and quantification of *S. suis*. *S. suis* is an important pathogen, resulting in significant economic losses in pig farming. Prompt detection of *S. suis* in the field samples is important for effective control. ddPCR is a novel PCR technology, which offers good precision and direct quantification without using calibration curves. In this work, a ddPCR method for the sensitive and accurate quantification of *S. suis* was established. Under the optimized reaction conditions, results showed that ddPCR was specific to detect *S. suis* with detection limit of 2.692 copies/ μ L, and no cross-reactions with *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Porcine circovirus type2 and Pseudorabies virus. The correlation coefficient (R^2) obtained from linear regression analysis showed a good linearity of amplification for ddPCR ($R^2=0.991$), and the repeatability test indicated that the coefficient of variation were 1.66%. The clinical application of ddPCR assay indicated that the sensitive and specific detection method could be useful to standardize quantitative detection of *S. suis*.

Key words: *Streptococcus suis* (SS); droplet digital PCR (ddPCR); detection

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 是猪群中一种常见的条件致病菌, 其通常在猪的上呼吸道 (尤其是扁桃体和鼻腔)、生殖道或消化道内定居, 严重时感染猪会出现脑膜炎、败血症、肺炎及关节炎等病症^[1], 可导致青年猪猝死^[2]。根据链球菌菌体荚膜抗原特性的不同, 猪链球菌可以分为 35 个血清型 (1~34 型和

1/2 型), 其中以 2 型 (SS2) 分布范围最广、毒力最强、对猪的致死率也最高。并且还能引起人类感染, 出现脑膜炎、败血症、肺炎、关节炎、心内膜炎、腹膜炎及眼内炎等严重病症, 甚至会引起死亡, 严重威胁人类健康和公共卫生^[3,4]。因此, 快速准确地检测猪链球菌对于感染的早期诊断和治疗非常重要。加强对猪链球菌检测技术的研究, 开展猪链球菌的检测, 防止猪链球菌的传入传出, 对进出口贸易的技术保障具有重要意义。

血清学分型是猪链球菌感染诊断的最重要特征之一^[5,6]。然而, 血清学检测耗时且需高技术要求来完成复杂的操作^[7]。近年来, 聚合酶链式反应 (PCR) 和

收稿日期: 2018-09-26

基金项目: 国家重点研发计划项目 (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

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

实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 检测技术已成功用于猪链球菌检测^[8,9]。然而, PCR 需通过凝胶分析检测结果, 灵敏度低; qPCR 在定量时需依赖标准曲线, 而标准曲线的质量易受到引物和探针浓度、DNA 纯度以及标准品等因素的影响, 导致其准确度达不到绝对定量的要求^[10]。此外, qPCR 也容易受到反应抑制因子的影响而导致假阴性的出现, 从而干扰实验结果的判断^[11], 使其适用性受到限制。

微滴数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 是近年发展起来的新一代 PCR 技术^[12,13]。具有快速、准确且可实现绝对定量的优势, 与传统 qPCR 方法不同的是, 它不依赖于标准曲线, 因而定量结果更为精确, 同时也使体系受反应抑制因子的影响大大降低^[14]。其原理是基于将样品进行系列稀释到一定浓度后, 使样品分子随机分布于约 20000 个微滴中, 从而使大部分微滴中的模板数为 1 或 0。每个微滴为一个独立单元进行 PCR 扩增, 随后对每个微滴中的荧光信号进行读取。根据泊松概率分布函数(Poisson distribution)计算出样品中的 DNA 拷贝数^[15]。该方法特异性强、灵敏度高、稳定性强且快速。猪链球菌在 qPCR 检测等分子生物学方法的相关研究^[8,9]已趋于成熟, 但还未有针对猪链球菌的 ddPCR 检测方法, 因此, 建立针对猪链球菌的 ddPCR 检测方法对猪链球菌感染的早期诊断、快速鉴定和定量检测具有重要意义^[16]。本研究旨在建立特异、灵敏、准确的猪链球菌 ddPCR 定量检测方法, 并与传统 qPCR 进行比较, 以期对猪链球菌的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

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus*

pleuropneumoniae, APP)、副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 由本实验室保存; 猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 灭活疫苗、伪狂犬病毒 (*Pseudorabies virus*, PRV) 疫苗、猪圆环病毒 2 型 (*Porcine circovirus type 2*, PCV-2) 疫苗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, 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 Fisher 公司; 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 SS 的 *gdh*^[17] 基因保守区, 使用 Primer Premier3.0 设计特异性的 real-time PCR 引物探针, 引物探针序列见表 1, 扩增片段长度为 62 bp。所有引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 SS 标准品制备

本次试验所用质粒标准品由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。通过搭桥 PCR 技术, 采用具有互补末端的搭桥引物并进行扩增, 将多个扩增片段拼接起来, 从而构建出目标基因。

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
SS-gdh-F	GGCGGTCTTCGCTTCCA	62 bp
SS-gdh-R	TGTTCAAAACCGAGGAAGTTCA	
SS-gdh-Probe	FAM-CCAACTGTAAACCAATCC-MGB	

1.2.3 核酸的提取

利用 Magen 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 SS、HPS、APP、*E.coli*、*Salmonella*、*S.aureus* 的 DNA; 利用 Magen 病毒 RNA/DNA 小量提取试剂盒提取 PRV、PCV-2 的 DNA, 均保存于 -80 °C 备用。

1.2.4 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 μL, 包括: AceQ qPCR Probe Master Mix 10 μL; 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL; 探针 (10 μmol/L) 0.2 μL; 模板 1 μL; ddH₂O 8 μL。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。

1.2.5 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 200~500 nmol/L、退火温度 50~60 °C, 加入 ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) 10 μ L, 用水补足至 20 μ L, 进行 ddPCR 扩增, 扩增条件为: 95 °C 10 min; 94 °C 30 s, 50~60 °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、微滴分布状态以及微滴荧光信号的强度等来确定优化的结果。

1.2.6 特异性试验

分别以 SS、HPS、PRV、PCV-2、APP、*E.coli*、*Salmonella*、*S.aureu* 的 DNA 为模板, 按照优化后的体系进行 ddPCR 的检测, 验证其特异性。

1.2.7 重复性试验

用已优化好的 ddPCR 方法进行重复性试验。在 20 μ L 的反应体系中加入 1 μ L 稀释到浓度为 $2.692 \times 10^5 \sim 2.692 \times 10^3$ copies/ μ L 的 DNA 模板, 分别重复 3 次 ddPCR 试验。

1.2.8 数据统计

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 使用 Microsoft Excel 2013 进行 qPCR 校准曲线的线性回归分析。使用 QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 进行 qPCR 数据分析, 使用 QuantaSoft 1.7.4.0917 进行 ddPCR 数据分析。

2 结果与讨论

2.1 qPCR 方法建立

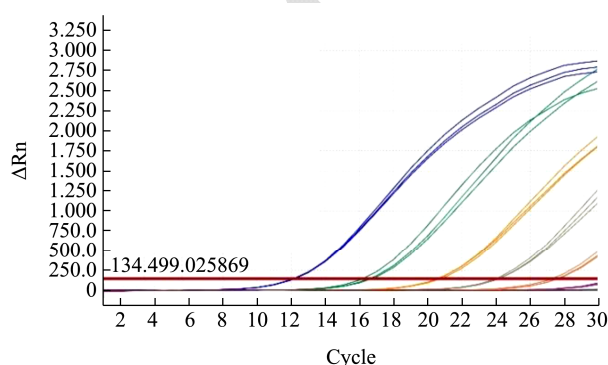


图 1 SS 的扩增曲线

Fig.1 Amplification curve for *S. suis*

注: 从左到右标准品拷贝数依次为 $2.692 \times 10^8 \sim 2.692 \times 10^3$ 。

将 2.692×10^{10} copies/ μ L 的 SS 质粒进行 10 倍倍比稀释, 以此为 qPCR 模板, 得到 qPCR 扩增曲线 (图 1)。结果表明: qPCR 线性良好, 扩增效率高, 灵敏

度较好。

2.2 ddPCR 反应条件的确定

使用 SS 的标准质粒 (2.692×10^5 copies/ μ L) 作为阳性对照, 对 ddPCR 退火温度和引物探针浓度进行条件优化。实验结果表明, ddPCR 的最佳退火温度为 52 °C, 如图 2 所示, 在这个温度下, 阳性 (蓝色) 和阴性 (灰色) 对照和最大扩增产物 (阳性液滴数量) 之间的荧光幅度差异最大。最佳引物浓度为引物浓度 900 nmol/L, 探针浓度 250 nmol/L, 如图 3 所示, 在这个浓度比之下, 反应具有最低的负荧光幅度 (灰色), 且具有相同的阳性液滴 (蓝色) 数。因此, 通过反应条件优化, 确定本实验最佳引物探针浓度和扩增条件为: 引物浓度为 900 nmol/L, 探针浓度为 250 nmol/L。ddPCR 扩增条件: 95 °C 10 min; 94 °C 30 s, 52 °C 1 min, 40 个循环; 98 °C 10 min; 4 °C 60 min, 升降温速率 2 °C/s。

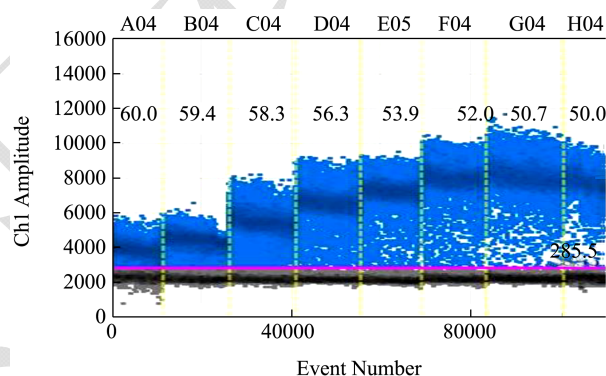


图 2 SS ddPCR 不同扩增温度的微滴散点图

Fig.2 Droplet scatter plots of ddPCR amplification for different

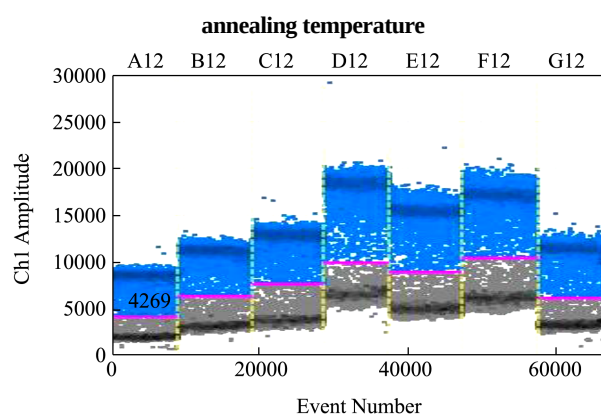


图 3 SS ddPCR 扩增不同引物浓度比的微滴散点图

Fig.3 Droplet scatter plots of ddPCR amplification for different primer and probe concentration

注: 从左到右引物浓度比依次为 400:200、500:250、600:300、700:350、800:400、900:450 和 900:250。

2.3 ddPCR 扩增

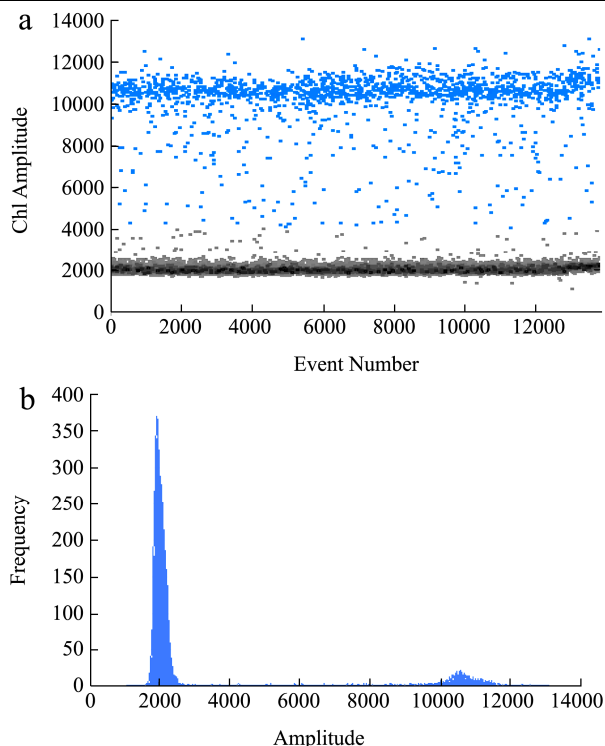


图 4SS ddPCR 扩增图

Fig.4 Amplification map of *Streptococcus suis*

注: a 图横坐标代表微滴数, 纵坐标代表荧光强度, 阴性微滴以灰色显示, 阳性液滴以蓝色显示; b 图横坐标代表荧光强度, 纵坐标代表微滴数, 故荧光强度较低的左边一簇对应阴性液滴, 荧光强度较高的右边一簇对应阳性液滴。

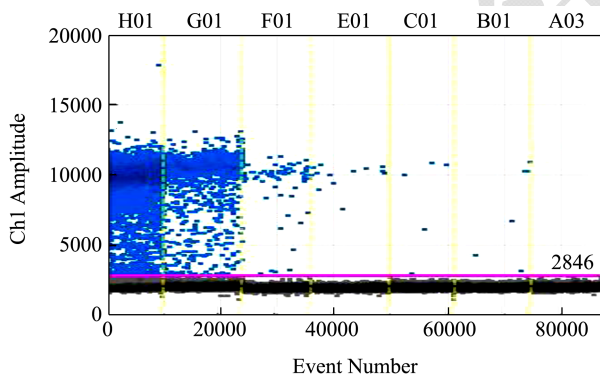


图 5 SS ddPCR 扩增不同浓度模板的微滴散点图

Fig.5 Droplet scatter plots of ddPCR amplification for different concentration templates

注: 从左到右标准品拷贝数依次为 $2.692 \times 10^5 \sim 2.692 \times 10^0$, NTC。

ddPCR 扩增的微滴生成数目在 10000 以上, 表明 ddPCR 反应正常, 可以对其进行后续的定量分析。经过优化的 ddPCR 反应体系对 SS 的扩增结果良好, 微滴散点图中阴阳性微滴分界明显 (图 4a)。微滴频率分布图中阴阳性微滴峰显著分开, 且中间无杂峰 (图 4b)。当样品 DNA 模板拷贝数高于约 20000 时, 阳性微滴数与生成微滴总数接近, 不满足泊松分布, 无法

实现 ddPCR 的准确定量。DNA 初始模板浓度为 2.692×10^5 copies/ μ L, 随着 DNA 模板浓度降低, 阳性微滴数量相应减少 (图 5)。由图可知, 经过优化的反应条件适合进行猪链球菌 ddPCR 的定量分析。

2.4 标准曲线和最低检测限

ddPCR 和 qPCR 的标准曲线分别见图 6 和图 7。由图可知, ddPCR 的 R^2 值为 0.9907, 斜率为 -0.9545, 最低检测限为 2.692 copies/ μ L。qPCR 的 R^2 值为 0.9956, 斜率为 -3.6795, 最低检测限为 269.2 copies/ μ L。结果表明: ddPCR 和 qPCR 的线性关系均较好, 且 ddPCR 灵敏度比 qPCR 高 2 个数量级。

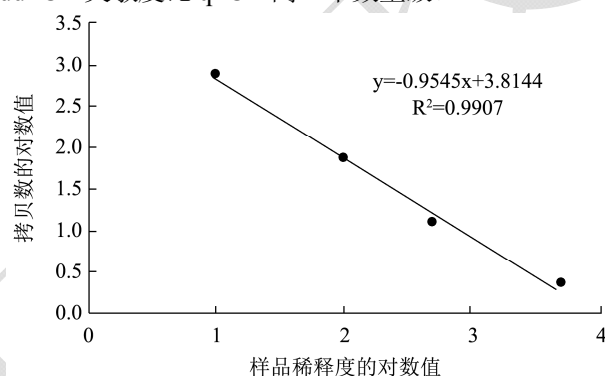


图 6 ddPCR 标准曲线

Fig.6 ddPCR standard curve

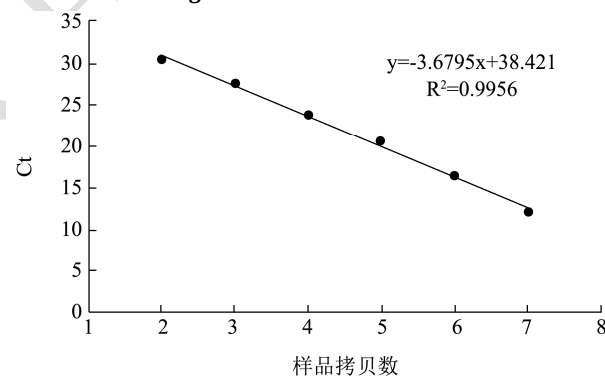


图 7 qPCR 标准曲线

Fig.7 qPCR standard curve

2.5 特异性分析

以 SS、HPS、PRV、PCV2、APP、*E.coli*、*Salmonella* 和 *S.aureu* 的 DNA 为模板进行 ddPCR 特异性验证。结果表明: 仅 SS 有特异性扩增, 其他样品均没有检测到阳性荧光信号, 说明该方法特异性较好。

2.6 重复性分析

采用三组不同拷贝数浓度的 DNA 模板来评估 ddPCR 方法的重复性, 对每组样品进行三次测试。测试结果如表 2 所示, 说明该方法的重复性好、准确度

高,检测结果稳定、可靠。

表2 ddPCR 重复试验结果

Table 2 Reproducibility of ddPCR

浓度/ (copies/ μ L)	3次测试/(copies/ μ L)			SD	CV/%
2.692×10^5	1342	1369	1387	22.65	1.66
2.692×10^4	153	160	152	4.36	2.81
2.692×10^3	6.3	5.2	5.6	0.26	4.32

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 50 份从猪场采集的样品进行检测。结果显示: 50 份样本中, qPCR 方法检出 43 份阴性样本, 7 份阳性样本; ddPCR 方法检出的 41 份阴性样本, 9 份阳性样本, 核酸拷贝数为 2.4~549 copies/ μ L, 而 qPCR 未检测出来的 2 份样品核酸拷贝数分别是 2.4 和 4.8 copies/ μ L。qPCR 能检测出的阳性样品都能被 ddPCR 中检出, 且 ddPCR 的结果更为有效和准确。结果表明: 对于高拷贝数的样品, ddPCR 和 qPCR 检测结果一致; 对于低拷贝数的样品, qPCR 无法检测, 而使用 ddPCR 可以检测到相应的核酸拷贝数, 结果更加可靠和精确。

表3 临床样本检测结果

Table 3 Detection result of clinical samples

检测结果	qPCR	ddPCR
阳性	7	9
阴性	43	41
总计	50	50

3 结论

3.1 近年来, 液滴数字 PCR 技术已经商业化, 将反应分为纳米级别大小的液滴。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)^[18]。该技术比 qPCR 相比具有许多潜在的优势, 具有较高的灵敏度和精密度, 并正以一种有效的独立 DNA 定量方法迅速取代 qPCR。

3.2 在过往的研究中, Velusamy 等^[19]建立了基于 TaqMan 探针的猪链球菌实时荧光定量 PCR 检测方法, 其灵敏度小于 10 copies/assay。林祥梅等^[20]建立了猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白 MRP 荧光 PCR 检测方法, 其敏感性为 10 CFU。本实验建立的实时荧光定量 PCR 检测方法的最低检测限为 269.2 copies/ μ L, ddPCR 的最低检测限为 2.692 copies/ μ L。

3.3 本试验建立了一种定量检测 SS 的 ddPCR 方法, 同时, 利用 ddPCR 和 qPCR 这 2 种检测方法对 SS 进

行检测, 就灵敏性、重复性、特异性和临床样本检测 4 个方面进行了比较。在定量检测相同稀释度的 SS 质粒 DNA 时, ddPCR 和 qPCR 的定量值均呈线性正相关, 且 ddPCR 方法比 qPCR 方法更为灵敏。而在实际检测过程中, ddPCR 方法的检出率更加可靠。

3.4 然而, 液滴数字 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^[21]。但是, 随着未来液滴数字 PCR 仪器成本的下降和技术的成熟, 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、稳定性好、特异性强, 可进行 SS 低含量样品的定量检测。为 SS 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] 刘玲玲, 李文刚, 张永涛, 等. 猪链球菌 2 型分子生物学研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 5: 34-36
LIU Ling-ling, LI Wen-gang, ZHANG Yong-tao, et al. Progress in molecular biology of *Streptococcus suis* Type 2 [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2012, 5: 34-36
- [2] 薛素强, 范伟兴, 洪洁心, 等. 三重 PCR 方法检测猪链球菌 2 型[J]. 中国动物检疫, 2006, 23(4): 22-24
XUE Su-qiang, FAN Wei-xing, HONG Jie-xin, et al. Triple PCR method for detection of *Streptococcus suis* type 2 [J]. China Animal Health Inspection, 2006, 23(4): 22-24
- [3] 洪伟彬, 黄育浩, 姜艳华. 猪链球菌检测及分型方法研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2010, 35(4): 9-12
HONG Wei-bin, HUANG Yu-hao, JIANG Yan-hua. Research progress on detection and typing methods of *Streptococcus suis* [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science, 2010, 35(4): 9-12
- [4] Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: The Chinese experience and the situation in North America [J]. Anim Health Res Rev, 2007, 8(1): 29-45
- [5] Staats J J, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present [J]. Veterinary Research Communications, 1997, 21(6): 381-407
- [6] Goyettedesjardins G, Auger J P, Xu J, et al. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequencetyping [J]. Emerging Microbes & Infections, 2014,

- 3(6): e45
- [7] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22 [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc, 1991, 3(1): 60
- [8] Okwumabua O, Oconnor M, Shull E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase [J]. Fems Microbiology Letters, 2003, 218(1): 79-84
- [9] Bonifait L, Veillette M, Létourneau V, et al. Detection of *Streptococcus suis* in bioaerosols of swine confinement buildings [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(11): 3296-3304
- [10] Cankar K, Štebih D, Dreo T, et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms [J]. BMC Biotechnology, 2006, 6(4): 1-15
- [11] 赵欣, 贾鹏, 刘莹, 等. 鲤疱疹病毒 2 型微滴式数字 PCR 检测方法的建立及比较分析[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 126-133
- ZHAO Xin, JIA Peng, LIU Ying, et al. Establishment and comparative analysis of Herpes simplex virus type 2 microdroplet digital PCR detection method [J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(4): 126-133
- [12] 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
- [13] 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
- [14] 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
- [15] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, et al. Evaluation of droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(2): 1003-1011
- [16] Srinivasan V, Mcgee L, Njanpop-Lafourcade B M, et al. Species-specific real-time PCR assay for the detection of *Streptococcus suis* from clinical specimens [J]. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, 2016, 85(2): 131-132
- [17] Okwumabua O, O'Connor M, Shull E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218(1): 79-84
- [18] 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
- [19] Srinivasan V, Mc Gee L, Njanpop-Lafourade B, et al. Species-specific real-time PCR assay for the detection of *Streptococcus suis* from clinical specimens [J]. Bacteriology, 2016, 85(2), 131-132
- [20] 林祥梅, 吴绍强, 韩雪清, 等. 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白 (MRP) 荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医杂志, 2006, 10: 68-70
- LIN Xiang-mei, WU Shao-qiang, HAN Xue-qing, et al. Establishment of a fluorescent PCR assay for detection of *Streptococcus suis* type 2 lysozyme releasing protein (MRP) [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2006, 10: 68-70
- [21] 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, 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

(上接第 273 页)

- [27] Omori H, Nakahara K, Umamo K. Characterization of aroma compounds in the peel extract of Ja (*Citrus jabra* Hort ex Tanaka) [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2011, 6(6): 396-402
- [28] Choi H, Sawamura M, Kondo Y. Characterization of the key aroma compounds of *Citrus flaviculpus* Hort. ex Tanaka by aroma extraction dilution analysis [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(5): 1713-1718
- [29] 孙浩, 陈峰, 倪辉, 等. 制备工艺对柚皮精油产品香味特征及挥发性成分的影响 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(9): 117-123
- SUN Hao, CHEN Feng, NI Hui, et al. Effect of preparation technology on the odour characteristic and volatile compounds of the essential oil products from pomelo peel [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(9): 117-123

现代食品科技