

猪圆环病毒3型PCR检测方法的建立与Cap基因序列分析

朱小甫, 吴旭锦, 熊忙利, 张文娟, 尹宝英

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 咸阳市动物疫病分子生物学诊断技术研究重点实验室, 陕西咸阳 712000)

摘要: 建立一种检测PCV3流行毒株感染的PCR方法, 并分析Cap基因序列变异情况, 为PCV3流行病学调查提供技术支持。根据GenBank中公开的PCV3全基因序列, 分别设计了质粒构建引物和检测引物, 通过构建阳性质粒、灵敏度试验、特异性试验、临床样品检测试验以及测序分析, 建立PCR检测方法。结果显示, 建立的PCR方法检测的极限为50拷贝/ μL , 以PRRSV、CSFV、PEDV、PRV、PPV、PCV-2的cDNA/DNA作为模板, 用该方法扩增结果均为阴性, 表明建立的方法特异性良好。应用该方法检测了285份样品, 阳性39份, 阳性率为13.7%。Cap基因序列分析显示, 20株比对序列核苷酸同源性为87.1%~100%, SXSL1702与SXXA1812同源性为87.1%, 在基因进化树中SXSL1702单独构成一个分支, 提示SXSL1702株Cap基因与其他毒株有较大差异。成功建立了检测PCV3感染的PCR方法, 发现一株Cap基因变异较大的PCV3流行毒株, 为进一步流行病学调查和生物学特性研究奠定了基础。

关键词: 猪圆环病毒; 猪圆环病毒3型; 流行病学; 检测; 序列分析

中图分类号: S852

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2020)01-026-05

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)分为3型, 猪圆环病毒1型(Porcine circovirus type 1, PCV1)是细胞培养的污染物, 无致病性^[1]。猪圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2, PCV2)可引起断奶仔猪多系统衰竭综合征、猪皮炎肾炎综合征、怀孕母猪繁殖障碍和新生仔猪先天性震颤, 致病性强, 对养猪业危害较大^[2,3]。2016年首次发现了猪圆环病毒3型(Porcine circovirus type 3, PCV3), 其来源于患病母猪及流产胎儿, 基因测序证实PCV3基因组长2.0kb, 基因组结构和遗传相似性与圆环病毒科病毒相近^[4]。

为了解我国猪场中PCV3的流行情况, 贺会利等^[5]检测了广西某猪场腹泻死亡仔猪的病料, 证实存在PCV3阳性样品, 测定了Cap基因序列并进行了比较分析, 发现国内PCV3毒株和美国毒株的同源性很高。刘晓东等^[6]对10个省区猪场进行PCV3 PCR检测, 结果表明在山东、安徽、江西、河南、福建与广西等省区均存在阳性猪场。徐国等^[7]对贵州92个规模化养殖场2016-2017年所送检的308份样品采用进行PCV3筛查, 发现了15份PCV3阳性病

料, 其中有13份存在与其他病原共同感染现象。湛洋等^[8]对江苏、湖南与湖北疑似猪皮炎肾病综合征的病猪组织样品进行检测, 发现存在PCV3感染情况, 且PCV2和PCV3混合感染比较突出。咸阳职业技术学院动物疫病分子生物学诊断实验室对陕西96个猪场进行PCV3检测, 检出阳性样品8份, 其中7份样品与其他6种常见猪群病毒存在不同程度的混合感染^[9]。这些研究表明, 在我国猪场中不但存在PCV3感染, 而且感染地域分布很广。由于PCV3至今未分离成功, 以上研究在进行分子流行病学调查时设计的引物未进行严格的灵敏度测定和特异性验证, 在盲检获得阳性样品的基础上, 设计PCV3 PCR检测方法, 为临床提供灵敏度高、特异性好的诊断试剂具有积极的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料与血清 PCV3阳性病料^[9], 待检组织病料175份、猪血清110份均由咸阳职业技术学院动物疫病分子生物学诊断实验室收集保存。

收稿日期: 2019-12-18

基金项目: 咸阳市科学技术研究与发展计划项目(2019k02-63); 咸阳职业技术学院重大科研项目(2018KYA01)

作者简介: 朱小甫(1977—), 男, 陕西眉县人, 硕士, 副教授, 执业兽医师, 主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究工作。

1.1.2 参考病毒 蓝耳经典毒株CH-1R、蓝耳变异毒株HuN4-F112、猪瘟病毒疫苗C株、伪狂犬Bartha-K毒株均为市售疫苗毒株, 细小病毒(PPV)、圆环病毒2型(PCV-2)、流行性腹泻病毒(PEDV)、传染性胃肠炎病毒(TGEV)为本实验室分离保存。

1.1.3 试剂与设备 RNAiso plus、rTaq酶、dNTP等为宝生物工程(大连)有限公司产品; pGEM-T easy载体克隆试剂盒, Promega公司产品; Ezup柱式病毒DNA抽提试剂盒、UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒均为生工生物工程(上海)有限公司产品;

DH5 α 大肠埃希菌由动物疫病分子生物学诊断实验室保存。PCR仪, 美国ABI ProFlex; 高速冷冻离心机, 德国艾本德5424R; 超微量紫外-可见分光光度计, 美国Thermo NanoDrop one。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据GenBank中公开的PCV3全基因序列MF405272/KY075987/KY075988, 设计了2对引物, PCV3-F/PCV3-R引物用于构建阳性质粒, PCV3-JF/PCV3-JR引物设计在PCV3 Cap基因区域, 用于PCV3核酸检测, 引物信息见表1。

表1 引物基本信息

Table1 The Basic Information of the primers

引物名称 Primer name	核苷酸序列(5' → 3') Nucleotide sequence (5' → 3')	相对 MF405272 位置 Relative AF241168 position	长度 Length
PCV3-F	GATGAATTGCTGAGAATTGG	874-893	1127bp
PCV3-R	GCCCGGCACCAAAATGAGAC	1981-2000	
PCV3-JF	AACTTCTTTGGTGCCGTAG	1370-1388	419 bp
PCV3-JR	CCCGCCTAAACGAATGGG	1771-1788	

1.2.2 组织病料中DNA的提取 用Ezup柱式病毒DNA抽提试剂盒提取PCV3阳性病料处理液DNA。吸取处理好的组织病料上清液或血清200 μ L置于1.5 mL无菌无酶离心管, 加600 μ L裂解液, 振荡混匀后静置10 min, 室温12000 g离心1 min, 将500 μ L溶液转移至吸附柱中, 室温静置2 min, 12000 g离心1 min, 弃去穿透液, 将吸附柱放回收集管, 剩余上清液全部转入吸附柱, 室温静置2 min, 12000 g离心1 min, 弃去穿透液, 将吸附柱放回收集管, 加入700 μ L洗柱液, 12000 g离心1 min, 弃去穿透液, 将吸附柱放回收集管, 12000 g再次空离心1 min, 弃去离心管, 将吸附柱套入新的1.5 mL无菌无酶离心管, 在吸附柱滤膜中央加入40 μ L DNA洗脱液, 室温静置2 min, 12000 g离心1 min, 管底溶液即为DNA溶液。

1.2.3 PCV3基因克隆 PCR反应体系中超纯水17.0 μ L, DNA溶液2.0 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, PCV3-F/PCV3-R引物各0.5 μ L, rTaq DNA聚合酶0.5 μ L。反应条件, 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 进入循环94 $^{\circ}$ C变性50 s, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。反应完毕电泳成像观察。

1.2.4 PCV3阳性质粒的构建 PCR产物电泳后在紫外分析仪中切下目的条带, 将胶块放入1.5 mL EP管

中, 每管加入Binding Buffer 700 μ L, 55 $^{\circ}$ C水浴10 min至胶块充分融化, 将融化的胶溶液转移到吸附柱中, 室温放置2 min, 8000g离心1 min, 弃去收集管中废液, 在吸附柱中加入500 μ L洗液, 8000g离心30 s, 弃去废液, 重复洗涤一次, 弃去废液后将吸附柱10000g空离心15 s, 在吸附柱膜中央加入20 μ L 55 $^{\circ}$ C水浴预热的Elution Buffer, 将吸附柱放入洁净1.5 mL EP管中, 室温放置2 min, 10000g离心2 min, 离心管中液体即为回收的VP1基因DNA片段。将回收的DNA片段与pGEM-T Easy载体连接, 4 $^{\circ}$ C水浴过夜, 转化DH5 α 感受态细胞, 经氨苄阳性LB培养基筛选, 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}$ C、200r/min摇动培养至饱和, 菌液PCR鉴定为阳性, 碱裂解法提取质粒, EcoR I酶切鉴定, 阳性质粒由生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.2.5 PCV3检测方法的建立 在微量紫外-可见分光光度计测定质粒浓度, 以阳性质粒做为模板, 改变扩增体系和反应条件, 确定最佳PCR方案。PCR反应体系, 质粒1.0 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, PCV3-JF/PCV3-JR引物各0.5 μ L, 梯度增加rTaq DNA聚合酶用量(0.25~1.0 μ L), 用超纯水补足25.0 μ L。反应条件, 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火温度由52 $^{\circ}$ C~58 $^{\circ}$ C按1 $^{\circ}$ C递增, 时间30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 s, 共进行35个循环;

最后72 ℃延伸10 min，反应完成后琼脂糖凝胶电泳观察。

1.2.6 PCV3检测方法灵敏性试验 按10倍梯度稀释质粒溶液，用建立的方法进行PCR反应，反应完毕后电泳观察。

1.2.7 PCV3检测方法特异性试验 用RNAiso plus试剂提取HuN4-F112、C株、PEDV核酸并反转录获得cDNA；提取伪狂犬Bartha-K毒株、PPV、PCV-2等DNA病毒DNA模板，用建立的PCR方法检测，PCR产物琼脂糖凝胶电泳，成像系统中观察照相。

1.2.8 PCV3检测方法临床应用 用建立的检测方法对收集的175份组织病料、110份猪血清进行检测，阳性样品PCR产物直接进行测序分析。

2 结果与分析

2.1 PCV3基因扩增结果

通过PCR方法，从PCV3阳性病料中成功扩增出了预期1127bp目的条带（图1）。

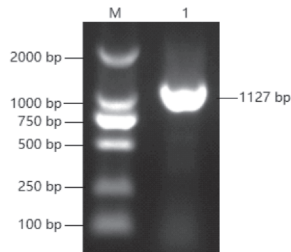


图1病料中PCV3基因扩增结果

M: DL2000 DNA分子质量标准；1: 病料中PCV3基因扩增

Fig.1 The result of clone PCV3 gene from tissue by PCR

M: DL2000 DNA Marker; 1: clone PCV3 gene from tissue

2.2 PCV3基因重组阳性质粒的构建结果

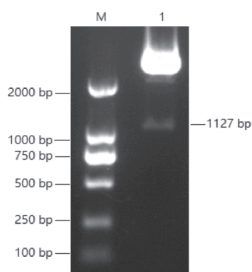


图2 重组阳性质粒酶切结果

M: DL2000 DNA分子质量标准；1: 重组阳性质粒酶切

Fig.2 The electrophoresis result of enzyme digest recombinant plasmids of PCV3 gene

M: DL2000 DNA Marker; 1: enzyme digest recombinant plasmids

回收PCR产物连接pGEM-T Easy载体，转化DH5 α 感受态细胞，培养后挑取单个菌落，菌液PCR为阳性后提取质粒，EcoR I酶切鉴定为阳性

（图2），测序比对发现与参考序列MF405272同源性为100%，提示PCV3基因重组阳性质粒构建成功，将构建好的阳性质粒命名为pGEM-T-PCV3。

2.3 PCV3 PCR检测方法的建立

以pGEM-T-PCV3质粒做为模板，通过扩增体系和反应条件的探索，确定最佳PCR方案为，PCR反应体系中，超纯水18.0 μ L，质粒1.0 μ L，10 \times Buffer 2.5 μ L，dNTP 2.0 μ L，VP1-JF、VP1-JR各0.5 μ L，rTaq DNA聚合酶0.5 μ L；反应条件，95 $^{\circ}$ C预变性5 min，进入循环94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C退火30 s，72 $^{\circ}$ C延伸40 s，共进行35个循环，最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

2.4 BFDV PCR检测方法灵敏性试验

用微量紫外-可见光分光光度计测定pGEM-T-PCV3质粒浓度为362ng/ μ L，A260/A280为2.02，提示质粒纯净度高。用质粒拷贝数计算公式换算并梯度稀释质粒，以 $5.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^{-2}$ 拷贝/ μ L共8个浓度梯度为模板进行PCR扩增，电泳结果见图3。从图3可知，建立的PCR方法检测的极限为50拷贝/ μ L，提示建立的方法有很高的灵敏度。

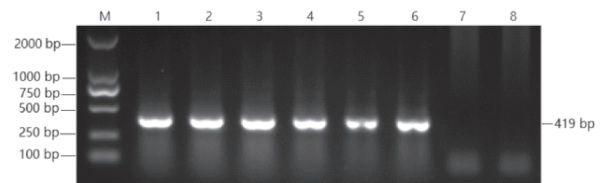


图3 PCR检测方法灵敏度试验结果

M: DL2000 DNA分子质量标准；1~8:

质粒浓度依次为 $5.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^{-2}$ 拷贝/ μ L

Fig.3 The result of sensitivity test for PCV3 by PCR

M: DL2000 DNA Marker; 1~8:

$5.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^{-2}$ copies/ μ L of pGEM-T-PCV3

2.5 PCV3 PCR检测方法特异性试验

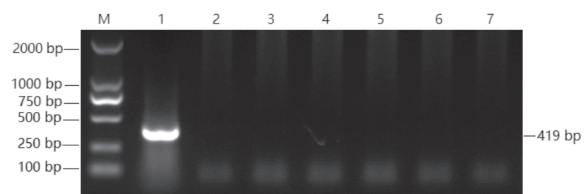


图4 PCR检测方法特异性试验结果

M: DL2000 DNA分子质量标准；1: pGEM-T-PCV3；2: HuN4-F112；

3: C株；4: PEDV；5: Bartha-K；6: PPV；7: PCV-2

Fig.4 The result of specialization test for PCV3 by PCR

M: DL2000 DNA Marker; 1: pGEM-T-PCV3; 2: HuN4-F112; 3:

: C strain; 4: PEDV; 5: Bartha-K; 6: PPV; 7: PCV-2

以HuN4-F112、C株、PEDV反转录获得的cDNA作为模板，以及伪狂犬Bartha-K毒株、PPV、

PCV-2病毒DNA作为模板, 用pGEM-T-PCV3作为参照, 用建立的PCR方法扩增。结果仅有pGEM-T-PCV3扩增出了419 bp的目的条带, 提示所建立的方法特异性良好(图4)。

2.6 PCV3 PCR检测方法临床检测与Cap基因序列分析

用建立的PCV3 PCR检测方法对175份组织病料、110份猪血清进行检测, 结果检测出阳性样品39份, 阳性率为13.7%(图5)。

对其中8份不同地区Cap基因PCR阳性产物进行测序, 获得的序列根据地区和时间分别命名为SXXY1601、SXXY1710、SXYA1805、SXBJ1905、

SXHZ1711、SXSL1702、SXWN1806和SXXA1812。用DNASTAR软件, 将获得的8株PCV3流行毒株Cap基因与12株Genbank中公开的参考序列进行比对分析, 构建基因进化树, 核苷酸同源性见表2。

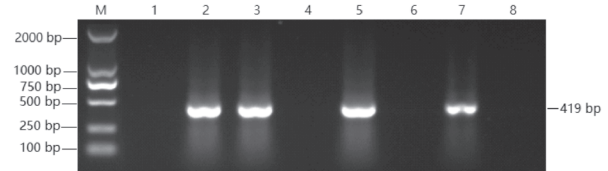


图5 部分临床样品检测结果
M: DL2000 DNA分子质量标准; 2/3/5/7为PCV3检测阳性结果; 1/4/6/8为PCV3检测阴性结果
Fig.5 Partial clinical sample test results
M: DL2000 DNA Marker; 2/3/5/7 are positive samples; 1/4/6/8 are negative samples

表2 PCV3流行毒株Cap基因序列与参考毒株核苷酸同源性
Table 2. Cap gene of PCV3 assay sequence and reference strain nucleotide homology

		Percent Identity																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Divergence	1	98.3	98.8	98.8	99.5	99.5	98.8	99.5	98.8	99.8	99.8	98.6	99.3	99.3	88.3	98.6	98.1	99.5	98.6	99.3	98.8	1
	2	1.7	98.1	99.0	98.6	98.6	99.0	98.8	99.0	98.6	97.9	97.9	98.6	87.8	97.9	98.3	98.3	97.9	98.6	98.6	2	
	3	1.2	1.9	98.6	99.0	99.0	98.6	99.3	99.0	99.0	98.8	98.6	99.0	88.1	98.8	97.9	98.8	99.3	99.5	98.6	3	
	4	1.2	1.0	1.4	99.0	99.0	100.0	99.3	99.5	99.0	98.3	98.1	99.0	87.8	98.3	98.8	98.8	98.3	99.0	98.6	4	
	5	0.5	1.4	1.0	1.0	100.0	99.0	99.8	99.0	99.8	98.8	98.6	99.5	88.8	98.8	98.3	99.5	98.8	99.5	99.0	5	
	6	0.5	1.4	1.0	1.0	0.0	99.0	99.8	99.0	99.8	98.8	98.6	99.5	88.8	98.8	98.3	99.5	98.8	99.5	99.0	6	
	7	1.2	1.0	1.4	0.0	1.0	1.0	99.3	99.5	99.0	98.3	98.1	99.0	87.8	98.3	98.8	98.8	98.3	99.0	98.6	7	
	8	0.5	1.2	0.7	0.7	0.2	0.2	0.7	99.3	99.8	99.0	99.8	99.8	88.5	99.0	98.6	99.5	99.0	99.8	99.3	8	
	9	1.2	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	0.5	0.7	99.0	98.8	98.6	99.0	88.1	98.8	98.8	98.8	98.8	99.5	98.6	9	
	10	0.2	1.4	1.0	1.0	0.2	0.2	1.0	0.2	1.0	98.8	98.6	99.5	88.5	98.8	98.3	99.8	98.8	99.5	99.0	10	
	11	1.5	2.2	1.2	1.7	1.2	1.2	1.7	1.0	1.2	1.2	98.3	98.8	87.8	98.6	97.6	98.6	99.0	99.3	98.3	11	
	12	1.7	2.2	1.4	1.9	1.4	1.4	1.9	1.2	1.4	1.4	1.7	98.6	87.6	98.3	97.4	98.3	98.3	99.0	98.1	12	
	13	0.7	1.4	1.0	1.0	0.5	0.5	1.0	0.2	1.0	0.5	1.2	1.4	88.3	98.8	98.3	99.3	98.8	99.5	99.0	13	
	14	12.7	13.3	13.0	13.3	12.2	12.2	13.3	12.4	13.0	12.4	13.3	13.6	12.7	87.8	87.1	88.3	88.3	88.5	87.8	14	
	15	1.2	1.9	1.0	1.4	1.0	1.0	1.4	0.7	1.0	1.0	1.2	1.4	1.0	13.0	97.6	98.6	98.6	99.3	98.3	15	
	16	1.9	1.7	2.2	1.2	1.7	1.7	1.2	1.4	1.2	1.7	2.4	2.7	1.7	14.2	2.2	98.1	97.6	98.3	97.9	16	
	17	0.5	1.7	1.2	1.2	0.5	0.5	1.2	0.5	1.2	0.2	1.5	1.7	0.7	12.7	1.2	1.9	98.6	99.3	98.8	17	
	18	1.5	2.2	0.7	1.7	1.2	1.2	1.7	1.0	1.2	1.2	1.0	1.7	1.2	12.7	1.2	2.4	1.5	99.3	98.3	18	
	19	0.7	1.4	0.5	1.0	0.5	0.5	1.0	0.2	0.5	0.5	0.7	1.0	0.5	12.4	0.5	1.7	0.7	0.7	99.0	19	
	20	1.2	1.4	1.4	1.4	1.0	1.4	0.7	1.4	1.0	1.7	1.9	1.0	13.3	1.4	2.2	1.2	1.7	1.0	20		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		

由表2数据可知, 20株比对序列核苷酸同源性为87.1%~100%, SXSL1702与SXXA1812同源性最低, 为87.1%, CN Fujian-12 2016 KY075987与CN Henan-13 2016 KY075988、CN GDBL1 2017 MF405272与CN GXHJ1 2017 MF405273同源性为100%。

分支, 提示SXSL1702株Cap基因与其他毒株有较大差异。

3 讨论

猪圆环病毒3型是近年发现的新病毒, 有报道认为PCV3可能与母猪繁殖障碍有关, 但由于仍未成功分离病毒, 无法证实PCV3的致病性。为了解我国猪群中PCV3感染情况, 多位学者开发了不同的PCV3检测技术。姜辰龙等^[10]根据PCV3 ORF2基因保守序列, 设计特异性引物, 建立了环介导等温核酸扩增(LAMP)检测方法, 该方法最低检测限为1个拷贝/μL, 并与常见的5种猪群传染病病毒无交叉反应。但由于LAMP技术灵敏度很高, 难以避免产生假阳性反应, 对环境 and 操作要求极高。李畅等^[11]建立了快速检测PCV3的实时荧光定量PCR检测方法, 灵敏度可达为129拷贝/μL, 特异性、可重复性良好, 用该方法对2016年至2017年间湖北省等地

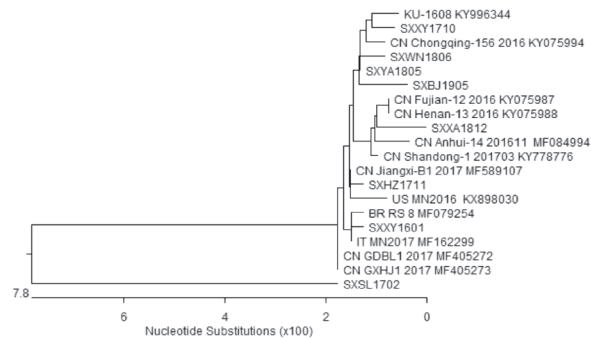


图6 PCV3 Cap基因进化树
Fig.6 Cap gene of PCV3 evolution tree

基因进化树(图6)显示, 20个PCV3流行毒株分为2个群, SXSL1702单独构成一个分支, 其他7个测定毒株与国内外参考毒株交叉分布于另一个大的

124份猪病料进行检测,结果PCV3阳性率为8.06%。石磊等^[12]建立了一种PCV3微滴数字PCR(ddPCR)检测方法,该方法灵敏度可达4.4拷贝/ μ L,特异性良好,与常见猪病原无交叉反应。但ddPCR方法对设备要求很高,普通实验室不具备检测条件。本试验在前期盲检与序列分析的基础上^[9],选取PCV3阳性病料,通过构建阳性质粒、PCR检测条件优化、特异性试验和临床检测试验,建立了PCV3 PCR检测方法。试验结果表明,建立的PCR方法灵敏度极限为50拷贝/ μ L,蓝耳病病毒、猪瘟病毒、流行性腹泻病毒、伪狂犬病毒、细小病毒和猪圆环病毒2型检测均为阴性,提示该方法灵敏度高、特异性好,可作为PCV3核酸检测方法。该方法比姜辰龙等建立的LAMP方法和石磊等建立的ddPCR方法灵敏度稍低,但比李畅等建立的实时荧光定量PCR方法稍高,由于常规PCR设备要求低,普通分子实验室均具备条件,所以该方法具有更好的适用性。

分析了8份不同地区PCV3流行毒株Cap基因片段序列,发现其中7株与参考毒株序列同源性为97.4%~100%,仅有SXSL1702与SXXA1812同源性为87.1%,提示大多数测定流行毒株与其他国家和地区PCV3高度同源,但同时存在SXSL1702这种与参考毒株同源性较低的毒株,Cap基因核苷酸点变异较多,在进化树中明显成为一个单独的进化分支,具有较高的进一步研究价值。

本研究建立了一种灵敏度高、特异性好的检测PCV3感染的PCR方法,为PCV3感染流行病学调查奠定了技术基础。通过测序分析发现了变异较大的PCV3流行毒株SXSL1702,可进一步研究该毒株的全基因序列与生物学特征,为防控PCV3感染提供理论支持。

参考文献

- [1]Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA[J].*Nature*, 1982, 295(5844): 64-66.
- [2]Allan G M, Mc Neilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pig with a wasting disease in the United states of American and Europe [J]. *J Vet Diagen Invest*, 1998, 10:3-10.
- [3]罗丽华,赵紫印,冯秀,等.陕西部分猪场PCV2抗体及病毒检测分析[J].*中国兽医学报*, 2019, 39(7): 1245-1249.
- [4]Palinski R, Pineyro P, Shang P, et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure [J]. *Virology*, 2017, 91(1): 1879-1891.
- [5]贺会利,李军,潘艳,等.广西首例猪圆环病毒3型的发现及其衣壳蛋白序列分析[J].*南方农业学报*, 2017, 48(8): 1499-1503.
- [6]刘晓东,杨旭兵,郑庆礼,等.我国部分省(区)猪圆环病毒3型的分子流行病学研究[J].*动物医学进展*, 2017, 38(11): 18-21.
- [7]徐国,梁海英,曾智勇,等.贵州省猪圆环病毒3型的分子流行病学调查[J].*中国兽医学报*, 2018, 38(11): 2033-2038.
- [8]湛洋,王东亮,王乃东,等.猪圆环病毒3型检测及其Cap结构序列和抗原性预测分析[J].*畜牧兽医学报*, 2017, 48(6): 1076-1084.
- [9]朱小甫,吴旭锦.陕甘地区猪PCV3流行毒株的检测[J].*西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2019, 46(11): 1-7.
- [10]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.
- [11]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.
- [12]石磊,刘雨琦,李丽丽.猪圆环病毒3型微滴数字PCR定量检测方法的建立[J].*现代食品科技*, 2019, 35(2): 1-6.

[责任编辑 王军利]