

猪圆环病毒 2 型实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

于 静, 劳秀杰, 陈彦永, 何小江, 代 兵, 赵阿勇, 王晓杜, 宋厚辉

(浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV2), 是感染猪 *Sus scrofa domestica* 的一种单链 DNA 病毒。建立一种快速、灵敏的检测方法, 对于 PCV2 感染猪的筛选和疾病预防非常重要。根据 PCV2 *ORF2* 基因保守区, 设计了荧光定量聚合酶链式反应(PCR)引物, 利用 SYBR Green 作为荧光染料建立了一种定量检测 PCV2 的 PCR 方法。结果表明: 该方法具有灵敏度高、特异性强和重复性好的优点, 每微升的最低检测限低至 10^1 拷贝 DNA。利用该方法对 34 份 PCV2 阳性临床样本进行检测, 检测符合率为 100%, 明显高于普通 PCR 方法的 50.0%。因此, 本研究建立的 PCV2 实时荧光定量 PCR 检测方法为该疾病的预防和控制提供一种有效的检测工具。图 4 表 4 参 26

关键词: 动物学; 猪; 猪圆环病毒 2 型; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S852.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2016)02-0357-07

A real-time PCR method for detection of porcine circovirus 2

YU Jing, LAO Xiujie, CHEN Yanyong, HE Xiaojiang, DAI Bing, ZHAO Ayong, WANG Xiaodu, SONG Houhui

(School of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To develop an accurate and rapid detection method for disease screening and prevention with porcine circovirus type 2 (PCV2), a single-strand DNA virus that infects pigs, primers targeted to the *ORF2* fragment of the PCV2 conserved region were designed. A real time polymerase chain reaction (PCR) method was developed using SYBR Green as a fluorescent dye and serial dilutions of *ORF2* recombinant plasmid to construct a standard curve for an absolute quantification. Results showed that the detection limit was obtained with 10^1 copy DNA per microliter. This method exhibited 1 000 times higher sensitivity than conventional PCR, only specific identification of PCV2, and better repeatability with the less than 2% variation coefficient of intra- or inter-assay experiments. A total of 34 PCV2 positive clinical samples were confirmed using this real time PCR method, demonstrating 100% agreement in comparison with the conventional PCR having only 50% agreement. This real time PCR method could provide a valuable tool for PCV2 prevention and control. [Ch, 4 fig. 4 tab. 26 ref.]

Key words: zoology; porcine; porcine circovirus 2; real-time PCR

猪圆环病毒2(porcine circovirus 2, PCV2), 是最小的 DNA 病毒, 断奶仔猪 *Sus scrofa domestica* 多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原, 成为严重阻碍养猪业发展的主要病原之一^[1-3]。国内外针对 PCV2 致病机制、诊断方法以及疫苗研制等方面开展了大量的研究^[1, 4]。然而, PCV2 依然阻碍着养猪业的发展, 主要原因可能是其临床发病与亚临床感染猪群中病毒量的不同, 检测过程容易造成漏检, 导致错误诊断。因此, 发展一种高灵敏度、快速检测 PCV2 的方法尤为重要。

收稿日期: 2015-04-19; 修回日期: 2015-06-22

基金项目: 浙江省科学技术公益项目(2014C32061); 浙江农林大学人才启动项目(2011FR025, 2013FR077); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ14C010007); 浙江农林大学大学生科技创新训练计划项目(201301017); 浙江农林大学面上基金项目(2013FK001)

作者简介: 于静, 讲师, 博士, 从事畜禽遗传与疾病控制研究。E-mail: yujing_2009@163.com。通信作者: 宋厚辉, 研究员, 博士, 从事动物疫病防控和公共卫生研究。E-mail: songhh@zafu.edu.cn

猪圆环病毒(PCV)分为PCV1和PCV2等2种基因型,它们基因组结构相似,均含有ORF1和ORF2等2个主要的开放阅读框。ORF1是引起PCV1和PCV2抗原交叉反应的主要原因,其变异很小,同源性高达85%;而ORF2基因是PCV2的重要抗原基因,编码病毒衣壳蛋白(Cap蛋白)^[5],其变异较大,在两型PCV之间不存在抗原交叉反应,被视为PCV1和PCV2的特异性鉴别抗原^[6-8],并在临床检测中取得了良好的效果。基于ORF2的较大变异,可以设计特异性引物对PCV的2个基因型进行鉴定,已成为PCR方法鉴定PCV2的重要靶基因^[9]。基于ORF2的这些优势,本研究也选择ORF2作为鉴定引物设计的首选基因。聚合酶链式反应(PCR)方法简单、方便、快速、敏感,在疾病检测中广泛应用,但其高假阳性和易污染的缺点依然存在。PCV2的抗体检测,敏感性和特异性都比较好,但是价格昂贵,技术要求较高。像多重PCR、巢式PCR等技术,虽然也可以达到很高的灵敏度,但是却不能定量。实时荧光定量PCR方法,不仅操作简便、敏感性高、重复性好、省时和可定量分析等优点,是病毒检测的重要方法。因此,本试验利用实时荧光定量PCR技术构建快速、灵敏检测PCV2的方法,以适应实验室和临床中对PCV2的实时定量检测。

1 材料与方法

1.1 材料和临床病料

PCV2,猪蓝耳病毒(PRRSV, leylstad virus),猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)和猪瘟病毒(CSFV, hogcholera virus)等菌株由浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室保存。19份病灶样品采自杭州国茂生态农业科技开发有限公司(简称:国茂),11份阳性病料和4份阴性对照由杭州检疫中心(杭州国正检测技术有限公司,简称:国正)惠赠。

1.2 引物设计与合成

ORF2是PCV2的主要免疫原基因,也是主要用于PCR鉴别的基因^[9]。根据GenBank公布的PCV2 ORF2基因序列,应用Primer 5.0软件设计ORF2基因全长克隆、普通PCR以及实时荧光定量PCR引物,并通过BLAST对其特异性进行分析。引物由上海生工生物工程公司合成,引物序列详见表1。

表1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物类型	引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
ORF2 克隆引物	ORF2-F	ATGACGTATCCAAGGAGGCCGTAC	702
	ORF2-R	TTAAGGGTTAAGTGGGGGTCTTAAG	
实时荧光定量引物	qP1	GAGCAGGGCCAGAATTCAACC	149
	qP2	AACASCCGCCTCTCCCCCAC	

1.3 阳性质粒的制备与稀释

将扩增的ORF2片段与pZERO-blunt载体连接,转化大肠埃希菌*Escherichia coli* DH5 α ,提取重组质粒,并进行测序。用紫外分光光度计测定重组质粒的吸光度 $D(260)$ 和 $D(280)$,计算出重组质粒的拷贝数,用EASY Dilution试剂将阳性重组质粒稀释到 10^{10} 拷贝· μ L $^{-1}$,再进行10倍梯度稀释,以 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 拷贝· μ L $^{-1}$ 9个拷贝数梯度作为标准模板,−20℃冻存备用。质粒质量浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)= $D(260)$ ×50($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)/1 000×准模板稀释倍数。

拷贝数计算公式:拷贝数(拷贝· μ L $^{-1}$)=质粒浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)×阿弗加德罗常数/重组质粒分子量。

1.4 实时荧光定量反应条件

实时荧光定量PCR反应采用20 μ L体系,其组分如下:SYBR[®] Premix Ex *Taq* GC(2 \times)10 μ L, qP1($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.4 μ L, qP2($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.4 μ L, ROX Reference Dye II(50 \times)0.4 μ L, 双蒸水7.8 μ L, 模板1 μ L。PCR扩增条件:95℃预变性30 s,按95℃10 s,60℃20 s,72℃30 s,进行40个循环。

1.5 标准曲线的建立

以重组质粒为标准品,进行10倍梯度稀释,取 10^8 ~ 10^0 拷贝· μ L $^{-1}$ 质粒为模板,用优化的实时荧光定量PCR体系及程序进行检测,同时设空白对照,每个标准品及空白对照均为3个平行重复。以起始

模板拷贝数为 x 轴, 循环阈值(C_t)值为 y 轴做回归曲线, 建立 PCV2 实时荧光定量 PCR 检测的标准曲线。

1.6 实时荧光定量 PCR 方法的重复性分析

对不同比例的标准品 DNA 10^4 , 10^3 和 10^2 拷贝· μL^{-1} 进行批间和批内重复性试验。样本有 3 个平行重复(批内重复), 分别进行 3 次重复(批间重复)。对所得 C_t 值的平均值、标准差和变异系数进行分析。

1.7 敏感性和特异性分析

敏感性分析: 以不同梯度标准品为模板, 分析最低检出限, 比较常规 PCR 与实时荧光定量 PCR 的敏感性差别。特异性分析: 用所建立的实时荧光定量 PCR 方法对已知阳性样品猪圆环病毒2(PCV2), 猪细小病毒(PPV), 猪瘟病毒(CSFV)和猪蓝耳病毒(PPRSV)病毒 DNA(或 cDNA)进行检测, 确定该方法的特异性。

1.8 临床样本的检测

对采集的 34 份临床样品进行检测。用试剂盒提取 DNA, 用上述建立的方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 标准质粒的制备

以 PCV2 DNA 为模板, *ORF2* 全长引物 *ORF2-F* 与 *ORF2-R* 进行 PCR 扩增, 目的片段大小为 702 bp, 连接到 pZERO-blunt 载体上, 并用载体上的酶切位点进行双酶切, 出现载体片段和目的基因片段大小与预期一致, 表明重组质粒构建正确(图 1)。测序结果与目的片段序列也完全一致。抽提重组质粒, 并梯度稀释为 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 拷贝· μL^{-1} 9 个比例的质粒为标准模板。

2.2 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

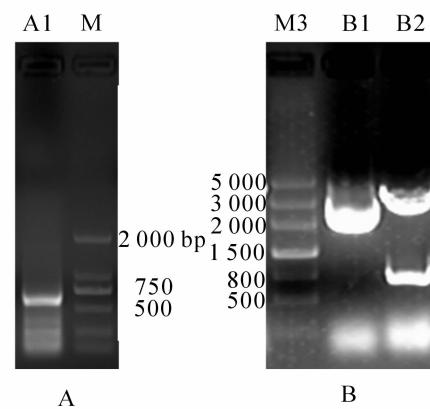
以梯度稀释重组质粒为模板进行标准曲线的制作。根据 PCV2 扩增动力学曲线, 系统自动生成标准曲线, 拷贝数(x)与循环阈值(C_t)之间的线性关系曲线表达式(图 2C)为: $C_t = -3.38 \times \lg x + 35.98$, 其斜率为 -3.38, 相关系数(R^2)为 1, 表明该标准曲线的线性度较好; PCR 的扩增效率为 97.6%, 且表明实时荧光定量 PCR 最低检测线为 10^1 拷贝· μL^{-1} 。扩增曲线平滑(图 2A), 每个样品之间间隔均匀, 阳性样品 C_t 值均在 33 以下, 阴性对照样品没有扩增, 最低检出限为 10^1 , 因此, 可以认为 C_t 值为 33 时是阴性样品和阳性样品的临界值, 即 $C_t \leq 33$ 可判为阳性, $C_t > 33$ 判为阴性。溶解曲线分析可以反映扩增产物的正确性, 是否有非特异性以及荧光信号是否由引物二聚体造成。本实验溶解曲线(图 2B)特征峰单一, T_m 值(解链温度)在 86 °C 左右, 表明是特异扩增。由此可以证明本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 方法完全可信, 可用于后续实验分析。

2.3 实时荧光定量 PCR 方法的重复性分析

实验重复性是方法稳定性的标志。为了验证本研究建立的实时荧光定量 PCR 的重复性, 我们以不同比例的标准品 DNA 10^4 , 10^3 和 10^2 拷贝· μL^{-1} 进行批间重复性试验, 3 份模板的 3 次批内(表 2)和批间(表 3)重复检测的 C_t 值误差均不到 0.5, 变异系数均小于 2%, 结果表明该方法具有较高的重复性。

2.4 特异性分析

PCR 扩增易出现假阳性, 会造成误检, 给生产带来负面效应。因此, 我们对本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法特异性进行分析, 结果表明(图 3): 经实时荧光定量 PCR 检测, 只有 PCV2 在 C_t 为 18 左右出现特异性扩增曲线, 而检测的猪细小病毒(PPV), 猪瘟病毒(CSFV), 猪蓝耳病毒(PPRSV)等样品 C_t 值均大于 33 或无扩增, 被判定为阴性。以上结果证明: 本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 的方法特异性高, 可以用于后续临床样品分析。



A. *ORF2* 基因克隆(A1是*ORF2*片段, M为DL2000); B. 重组质粒验证(M3为标记物III, B1为重组质粒, B2为重组质粒消化验证)

图 1 *ORF2* 基因克隆和重组质粒验证

Figure 1 Clone of *ORF2* and verification of recombinant plasmid

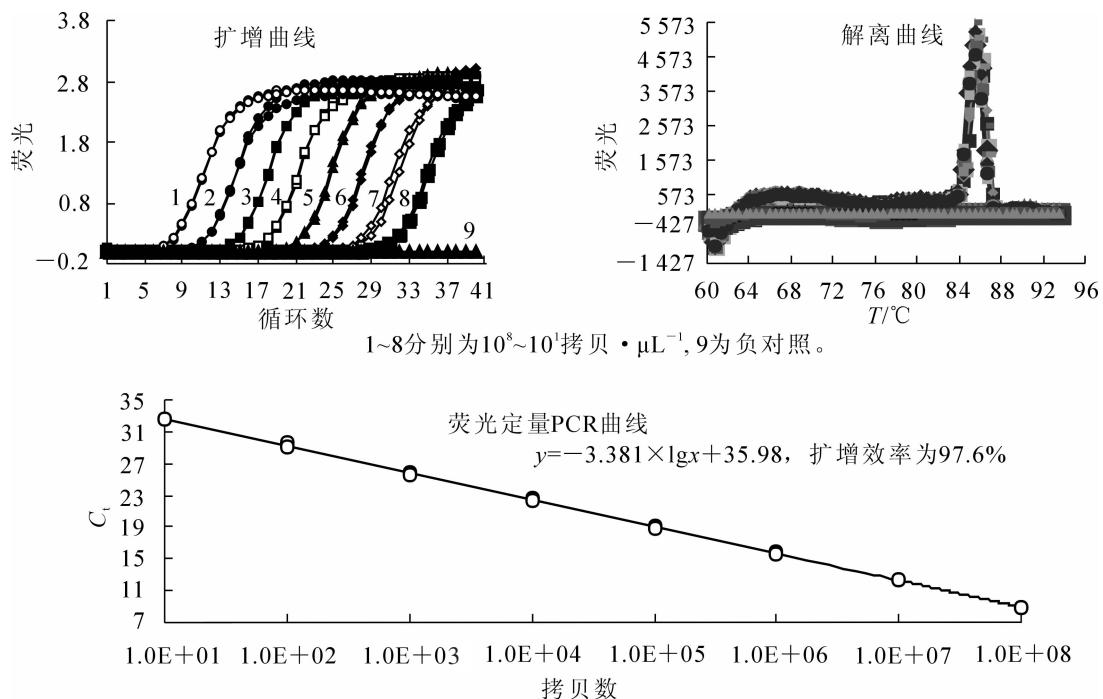


图2 实时荧光定量PCR标准曲线的建立

Figure 2 Development of standard curve of real-time PCR method

表2 实时荧光定量PCR方法的批内重复性实验结果

Table 2 Repetitive experimental results of intra-assay of real-time PCR method

拷贝数	重复1	重复2	重复3	平均值	标准差	变异系数/%
10 ²	29.72	29.63	28.95	29.43	0.42	1.43
10 ³	26.03	25.93	25.70	25.89	0.17	0.65
10 ⁴	22.63	22.54	22.35	22.51	0.14	0.64

表3 实时荧光定量PCR方法的批间重复性实验结果

Table 3 Repetitive experimental results inter-assay of real-time PCR method

拷贝数	重复1	重复2	重复3	平均值	标准差	变异系数/%
10 ²	22.93	22.60	22.41	22.65	0.26	1.16
10 ³	26.49	25.99	25.76	26.08	0.37	1.43
10 ⁴	29.92	29.69	29.02	29.54	0.47	1.58

2.5 敏感性分析

敏感性对评价检测方法的灵敏性非常重要,因此,我们分析了普通PCR和实时荧光定量PCR这2种方法的敏感性。结果发现:普通PCR有扩增条带的模板浓度为 10^4 拷贝· μL^{-1} ,而实时荧光定量PCR方法在模板比例为 10^1 拷贝· μL^{-1} (图4)时有扩增,也就表明实时荧光定量PCR检测PCV2的敏感性比普通PCR的敏感性高1 000倍。以上结果表明:本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2的方法敏感性高。

2.6 临床样本的检测

临床样品检测是技术推广的前提。本研究从杭州周围猪场采集的34份样品,其中阳性病灶样品30份,阴性样品4份,通过检测发现普通PCR检测方法符合率为50.0%,实时荧光定量PCR检测符合率为100%(表4),且带病样品的拷贝数为 $10^1\sim 10^4$ 拷贝· μL^{-1} 。以上结果表明:本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2方法比普通PCR方法灵敏度高,能完全适合猪场疾病的检测,且能够定量分析样品的病毒量。

3 讨论

Ⅱ型猪圆环病毒可以引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS),育肥猪皮炎与肾病综合征(PDNS),增生性坏死性肺炎(PNP),猪呼吸道综合征,怀孕母猪的繁殖障碍、新生仔猪的先天性震颤(CT)和新生仔猪腹泻病等疾病^[2, 10-14]。中国很多地方猪养殖场PCV2阳性率高达100%,仔猪死亡率高达30%。目

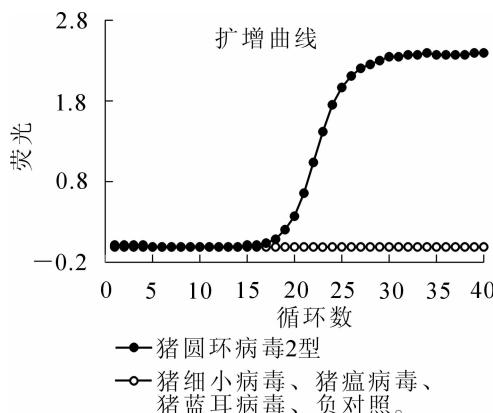


图3 特异性实验结果

Figure 3 Result of specific analysis

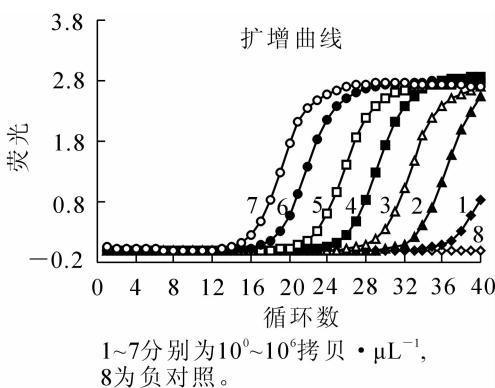


图4 敏感性实验结果

Figure 4 Results of sensitivity analysis

表4 临床样品检测结果

Table 4 Analysis of clinical samples

样品来源	阳性样品	阴性样品	普通PCR		实时荧光定量PCR	
			阳性数(阴性)	符合率/%	阳性数(阴性)	符合率/%
国茂	19	0	7(12)	36.8	19(0)	100
国正	11	4	6(9)	66.7	11(4)	100
总计	30	4	13(21)	50.0	30(4)	100

前, 对PCV2引起疾病的诊断标准、致病机理以及对病毒本身的防治研究还不清晰^[15]。PCV2引起疾病的预防主要通过注射疫苗, 但是免疫效果不理想。

PCV2引起疾病的诊断主要采用临床症状、病理剖解和实验室诊断等, 这些方法诊断结果准确, 但耗时长、工作量大, 实际生产中难以推广应用^[16]。此外, 这些方法对亚临床感染猪的诊断经常会遭遇困难。为了解决这些问题, 实验室开展了血清中和实验、ELISA、胶体金试纸和PCR等方法用于检测PCV2^[17-21]。研究发现, 猪圆环病毒2-dCap-ELISA抗体检测试剂盒在检测PCV2中具有成本低、不需要特殊仪器且能满足基层需要的优点^[18], 但是操作过程比较繁琐, 中间环节可能会带来污染。而琼脂扩散试验和圆环病毒抗体胶体金试纸条检测PCV2的方法, 虽然特异性、稳定性、符合率等都很高^[17], 但是依然存在较高假阳性问题。近年来, 实时荧光定量PCR方法在疾病检测方面的应用, 进一步提高了检测的灵敏度, 缩短了检测时间。

本研究根据PCV2 ORF2基因设计实时荧光定量PCR引物。ORF2编码病毒的核衣壳蛋白(Cap), 该蛋白可引起感染猪产生高含量的抗体, 且在2个血清型(PCV1和PCV2)之间无交叉反应性, 是检测病毒抗体水平的良好抗原^[22]。因此, ORF2也成为PCR鉴别PCV2的重要基因^[9]。郭慧娟等^[23]根据ORF2设计TaqMan实时荧光定量PCR引物, 建立了PCV2检测方法, 其灵敏度高达到 4.53×10^2 拷贝· μL^{-1} , 而曹伟伟等^[16]TaqMan实时荧光定量PCR方法的最低检测限度为5.06拷贝· μL^{-1} 。而SYBR Green I Real-time PCR检测方法的灵敏度基本在10~100拷贝· μL^{-1} , 比普通PCR检测方法检测灵敏度提高100~1 000倍^[24-25]。

本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2的方法能够对处于亚临床状态猪进行检测, 可以为该病的治疗抢得宝贵时间。本研究建立的实时荧光定量PCR方法与普通PCR相比, 灵敏度提高了1 000倍, 和已报道实时荧光定量PCR^[16, 23, 25-26]检测PCV2的灵敏度相似。总体来说, 实时荧光定量PCR方法检测费用较高, 所需仪器和操作环境要求较高。但是, 本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2的方法重复性和特异性高, 不会造成错诊, 会大大减少因病毒蔓延导致的猪场经济损失。此外, 本研究建立的实时荧光定量PCR还可以对PCV2进行准确定量, 对感病猪的早期诊断和猪场分类防治管理提供了重要的依据。

4 参考文献

- [1] GRAU-ROMA L, FRAILE L, SEGALES J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2 [J]. *Vet J*, 2011, **187**(1): 23 – 32.
- [2] ALLAN G M, ELLIS J A. Porcine circoviruses: a review [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, **12**(1): 3 – 14.
- [3] 陈溥言, 华修国. 断奶仔猪多系统消耗综合征[J]. 畜牧与兽医, 2002, **34**(7): 33 – 35.
- CHEN Puyan, HUA Xiuguo. Postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Anim Husb & Vet Med*, 2002, **34**(7): 33 – 35.
- [4] 田晓婷, 李宝玉, 柳纪省. 猪圆环病毒的分子生物学与检测方法的研究现状[J]. 中国农学通报, 2012, **28**(14): 66 – 72.
- TIAN Xiaoting, LI Baoyu, LIU Jixing. A review for the molecular biology characteristics and molecular diagnosis methods of porcine circovirus [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, **28**(14): 66 – 72.
- [5] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2000, **81**(9): 2281 – 2287.
- [6] BLANCHARD P, MAHE D, CARIOLET R, et al. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Vet Microbiol*, 2003, **94**(3): 183 – 194.
- [7] 陈陆, 杨霞, 王江辉, 等. 猪圆环病毒 2 型(PCV2)河南分离株进化分析及 ORF2 基因的表达[J]. 农业生物技术学报, 2009, **17**(4): 561 – 566.
- CHEN Lu, YANG Xia, WANG Jianghui, et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus 2 (PVC2) isolated from Henan province and expression of the *ORF2* gene in *Escherichia coli* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2009, **17**(4): 561 – 566.
- [8] 王子馨, 李坤, 刘金朋, 等. PCV2 *ORF2* 基因与猪 *IL-18* 基因共表达 DNA 疫苗的免疫原性[J]. 中国兽医学报, 2013, **33**(4): 532 – 537.
- WANG Zixin, LI Kun, LIU Jinpeng, et al. Enhancement of DNA vaccine potency against PCV2 by coexpression of PCV2 *ORF2* and *IL-18* genes [J]. *Chin J Vet Sci*, 2013, **33**(4): 532 – 537.
- [9] CHEUNG A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2003, **305**(1): 168 – 180.
- [10] BRUNBORG I M, FOSSUM C, LIUM B, et al. Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds, affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Acta Vet Scand*, 2010, **52**: 22 – 31.
- [11] GUO Longjun, LU Yuehua, WEI Yanwu, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China [J]. *Virol J*, 2010, **7**(1): 273 – 285.
- [12] KURTZ S, GRAU-ROMA L, CORTEY M, et al. Pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) generate antibody responses capable to neutralise PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins [J]. *Vet Res*, 2014, **45**: 29 – 38.
- [13] OPRIESSNIG T, MENG Xiangjin, HALBUR P G. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2007, **19**(6): 591 – 615.
- [14] XIAO C T, HALBUR P G, OPRIESSNIG T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d [J]. *J Gen Virol*, 2015, **96**: 1830 – 1841.
- [15] STEINER E, BALMELLI C, GERBER H, et al. Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs [J]. *BMC Vet Res*, 2009, **5**(1): 45 – 57.
- [16] 曹伟伟, 郭抗抗, 许信刚, 等. 猪圆环病毒 II 型 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, **41**(1): 13 – 18.
- CAO Weiwei, GUO Kangkang, XU Xingang, et al. Establishment and application of *Taq Man* real-time fluorescent quantitative PCR for detecting porcine circovirus type II [J]. *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2013, **41**(1): 13 – 18.
- [17] 苗丽娟, 刘玉茹, 李静姬, 等. II 型猪圆环病毒 Cap 蛋白琼脂扩散试验检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, **46**(9): 105 – 106.

- MIAO Lijuan, LIU Yuru, LI Jingji, *et al.* Establishment of Cap protein agar diffusion assay for detection of porcine circovirus type II [J]. *Heilongjiang Animal Sci Vet Med*, 2013, **46**(9): 105 – 106.
- [18] 赵玉龙, 焦玉兰, 郁宏伟, 等. 一种猪圆环病毒Ⅱ型ELISA抗体检测试剂盒的临床应用[J]. 中国兽药杂志, 2011, **45**(3): 31 – 34.
- ZHAO Yulong, JIAO Yulan, YU Hongwei, *et al.* Clinical applications of antibody detection ELISA kit for porcine circovirus type 2 [J]. *Chin J Vet Drug*, 2011, **45**(3): 31 – 34.
- [19] 岳丰雄, 崔尚金, 冉多良, 等. PCV2, PPV, PRV 和 PRRSV 多重PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医科学, 2008, **38**(8): 691 – 696.
- YUE Fengxiong, CUI Shangjin, RAN Duoliang, *et al.* Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of PCV2, PPV, PRV and PRRSV [J]. *Chin Vet Sci*, 2008, **38**(8): 691 – 696.
- [20] YUE Fengxiong, CUI Shangjin, ZHANG Chaofan, *et al.* A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens [J]. *Viru Gen*, 2009, **38**(3): 392 – 397.
- [21] LIU Changming, IHARA T, NUNOYA T, *et al.* Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen [J]. *J Vet Med Sci*, 2004, **66**(3): 237 – 242.
- [22] 郭官鹏, 刘畅, 陈龙彪, 等. 猪圆环病毒2型ORF2基因截断表达及ELISA抗体检测方法的初步建立[J]. 中国兽医学报, 2014, **34**(7): 1059 – 1064.
- GUO Guanpeng, LIU Chang, CHEN Longbiao, *et al.* Development of an indirecr ELISA based on prokaryotic expression of truncated ORF2 gene of porcine circovirus type 2 [J]. *Chin J Vet Sci*, 2014, **34**(7): 1059 – 1064.
- [23] 郭慧娟, 李秀丽, 张国伟, 等. 猪圆环病毒2型TaqMan荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, **41**(5): 39 – 45.
- GUO Huijuan, LI Xiuli, ZHANG Guowei, *et al.* Establishment of Taq-Man real-time PCR for detection of porcine circovirus type II [J]. *China Anim Husb & Vet Med*, 2014, **41**(5): 39 – 45.
- [24] 张福良, 宋长绪, 杨鸣琦, 等. 猪圆环病毒2型荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2006, **26**(3): 248 – 250.
- ZHANG Fuliang, SONG Changxu, YANG Mingqi, *et al.* Development of fluorescent quantitative PCR assay for PCV2 detection [J]. *Chin J Vet Sci*, 2006, **26**(3): 248 – 250.
- [25] 李鹏, 郭军庆, 金前跃, 等. 猪圆环病毒2型荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 华北农学报, 2014, **29**(2): 66 – 70.
- LI Peng, GUO Junqing, JIN Qianyue, *et al.* Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a SYBR Green I real-time PCR [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*, 2014, **29**(2): 66 – 70.
- [26] 董林, 王艳萍, 魏凤, 等. 猪圆环病毒2型SYBR Green I实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2013, **43**(10): 1073 – 1078.
- DONG Lin, WANG Yanping, WEI Feng, *et al.* Development and application of a SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of type 2 porcine circovirus [J]. *Chin J Vet Sci*, 2013, **43**(10): 1073 – 1078.