

引用格式:

田琴, 张明华, 周碧君, 程振涛, 王开功, 文明. DuCV 和 GPV 与 DEV 三重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(2): 225-230.

TIAN Q, ZHANG M H, ZHOU B J, CHENG Z T, WANG K G, WEN M. Establishment and application of triple PCR method for duck circovirus, goose parvovirus and duck plague virus[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(2): 225-230.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



DuCV 和 GPV 与 DEV 三重 PCR 检测方法的建立及应用

田琴¹, 张明华¹, 周碧君^{1,2,3}, 程振涛^{1,2,3}, 王开功^{1,2,3*}, 文明^{1,2,3*}

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省动物疫病研究室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州省动物生物制品工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 根据 GenBank 中的序列, 合成针对鸭圆环病毒(DuCV) *REP* 基因、鹅细小病毒(GPV) *NSI* 基因、鸭肠炎病毒(DEV) *UL6* 基因的 3 对特异性引物, 以病毒的克隆质粒作为模板, 进行退火温度、引物终浓度的优化, 建立一种能同时鉴别 DuCV、GPV、DEV 的三重 PCR 检测方法, 并检验该方法的特异性、敏感性和重复性。结果显示: 试验所建立的三重 PCR 检测方法的最适退火温度为 58.5 °C, 引物 DuCV *REP*、GPV *NSI*、DEV *UL6* 的最适终浓度分别为 0.9、0.6、0.7 μmol/L; 该方法能够同时扩增出 DuCV、GPV 和 DEV 的特异性片段, 而不能扩增出 NDV、RA、AIV、DHV 和 TUMV, 表明该方法特异性强; 该方法对质粒 DuCV、GPV 和 DEV 模板的最低检测量分别为 1、100、10 fg, 表明该方法敏感性好; 运用该方法对 DuCV+GPV+DEV、DuCV+GPV、GPV+DEV、DuCV+DEV、DuCV、GPV、DEV 进行检测, 均能扩增出与预期一致的特异性片段, 表明该方法重复性好; 运用该方法对 42 份临床样本进行检测, 其检出率分别为 26.19%、30.95%和 19.05%, 与单一 PCR 的检出结果一致, 表明该方法能适用于临床样本的检测。试验建立的方法具有快速、简便、特异性强、敏感性好、重复性好等特点, 可用于 DuCV、GPV 和 DEV 临床样本混合感染的快速诊断及鉴别诊断。

关键词: 鸭圆环病毒(DuCV); 鹅细小病毒(GPV); 鸭肠炎病毒(DEV); 三重 PCR; 退火温度; 引物终浓度

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2021)02-0225-06

Establishment and application of triple PCR method for duck circovirus, goose parvovirus and duck plague virus

TIAN Qin¹, ZHANG Minghua¹, ZHOU Bijun^{1,2,3}, CHENG Zhentao^{1,2,3}, WANG Kaigong^{1,2,3*}, WEN Ming^{1,2,3*}

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Guizhou Animal Disease Research Laboratory, Guiyang, Guizhou 550025, China; 3. Guizhou Province Animal Biological Products Engineering Technology Research Center, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: According to the sequence in GenBank, 3 pairs of specific primers were synthesized for duck circovirus (DuCV) *REP* gene, goose parvovirus (GPV) *NSI* gene, duck enteritis virus (DEV) *UL6* gene, and the virus clone plasmid was used as a template. The annealing temperature and final primer concentration were optimized to establish a triple PCR detection method that can simultaneously identify DuCV, GPV and DEV, and test the specificity, sensitivity and

收稿日期: 2020-01-05

修回日期: 2020-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560703); 贵州省百层次创新型人才项目(黔科合人才[2016]4009号); 贵州省科技平台及人才团队计划项目(黔科合平台人才[2018]5253号); 贵州省生态家禽产业技术体系功能实验室项目(黔农体系[2017]03号); 三穗鸭工程技术研究中心建设项目(黔科合平台人才[2019]5203号); 贵州省研究生教育创新计划项目(GZZ2017002)

作者简介: 田琴(1993—), 女, 贵州务川人, 硕士研究生, 主要从事动物疫病诊断与兽医微生物学研究, 1414626192@qq.com; *通信作者, 王开功, 教授, 主要从事动物疫病诊断与兽医微生物学研究, as.kgwang@gzu.edu.cn; *通信作者, 文明, 博士, 教授, 主要从事动物疫病诊断与兽医微生物学研究, as.mwen@gzu.edu.cn

repeatability of the method. The results showed that the optimal conditions included the annealing temperature 58.5 °C and the optimal primer concentrations for DuCV *REP*, GPV *NSI*, DEV *UL6* 0.9, 0.6, 0.7 μmol/L, respectively. This detection method were sensitive to DuCV, GPV and DEV, but cannot amplify NDV, RA, AIV, DHV and TUMV, indicating that the method has strong specificity; the minimum detection volumes of this method for plasmid DuCV, GPV and DEV templates were 1, 100, 10 fg, indicating that the method is sensitive; using this method to detect DuCV+GPV+DEV, DuCV+GPV, GPV+DEV, DuCV+DEV, DuCV, GPV, DEV, amplification of specific fragments consistent with expectations indicates that the method has good reproducibility. 42 clinical samples were detected by this method, and the detection rates were 26.19%, 30.95%, and 19.05%, which were comparable to those of a single PCR, indicating that the method can be applied to the detection of clinical samples. The method established in this study has the characteristics of rapidness, simplicity, strong specificity, good sensitivity and good reproducibility. It can be used for the rapid diagnosis and differential diagnosis of mixed infection of DuCV, GPV and DEV clinical samples.

Keywords: duck circovirus(DuCV); goose parvovirus(GPV); duck enteritis virus(DEV); triple PCR; annealing temperature; final primer concentration

随着养鸭业的发展,威胁和危害养鸭业健康发展的疫病逐渐增多。引起疫病的病毒主要有鸭圆环病毒(DuCV)、鹅细小病毒(GPV)、鸭肠炎病毒(DEV)等^[1-3]。鸭圆环病毒病(DuCVD)是由 DuCV 引起的鸭类传染病,该病以感染鸭发育不良、羽毛脱落、免疫抑制等病理损伤为主要特征^[4]。小鹅瘟,又称为 Derzsy 病,其病原体为鹅细小病毒(GPV),临床上以精神委顿、体重下降、食欲减退、严重下痢、鼻孔流出浆液性鼻液、死亡率高为特点^[5]。鸭瘟(DP)又称鸭病毒性肠炎,是由 DEV 引起的急性、热性、败血性传染病,其易感性无性别和日龄之分^[6]。DuCV、GPV 和 DEV 是近年来严重危害养禽业发展的三大传染病。在养殖场中,不仅存在着单独感染,而且经常有混合感染的情况发生^[7-9]。

常见的用于病毒检测的方法,如病毒分离鉴定、电镜观察、血清学实验、RT-PCR 技术^[10]等,均存在费时、费力、特异性差、检测对象单一等弊端^[11]。PCR 技术仍被广泛应用于临床检测,并衍生出了多重 PCR 技术,在临床鉴别诊断上具有较大的应用价值。多重 PCR 具有操作简便、高效性、系统性、经济性等特点,是高效率低成本的检测方法,在临床批量检测中占据了重要的地位^[12-14];但多重 PCR 由于在同一个反应体系中添加了多对特异性引物和多个模板,其反应条件要求较高。多重 PCR 方法的建立主要受引物浓度,退火温度和模板量等因素的影响,而引物浓度是多重 PCR 成功的关键,直接影响到 PCR 扩增结果。

关于 DuCV、GPV、DEV 这 3 个病原体之间混合感染的单一 PCR 检测方法比较常见,而其多重

PCR 检测方法的报道则较少。本研究中,以 DuCV、GPV、DEV 为研究对象,拟建立一种操作简单、快速、特异性强、灵敏度高的三重 PCR 检测方法,以期同时检测 DuCV、GPV、DEV,为临床上快速检测病原体和净化养鸭场提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

DuCV 毒株、GPV 毒株均由贵州省黔东南州三穗县某养鸭场检测得到;DEV 毒株、鸭疫里默氏杆菌(RA)、鸭肝炎病毒(DHV)、鸭坦布苏病毒(TUMV)均由贵州省动物疫病研究室保存;新城疫病毒(NDV)和禽流感病毒(AIV)均为世纪元亨公司通用型 RT-PCR 检测试剂盒中的阳性样本。42 份 30~39 日龄的三穗鸭临床样本来自贵州省黔东南州三穗县某养殖场。

1.2 主要试剂

Prime Script™ Master Mix 购自 TaKaRa;琼脂粉购自 Biowest;DNA 提取试剂盒购自北京世纪元亨动物防疫有限公司;DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;E.Z.N.A Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒、E.Z.N.A.TM Plasmid Kit 质粒提取试剂盒均购自 OMEGA。

1.3 引物设计与合成

参考 GenBank 中的 DuCV(MF627690.1) *REP* 基因序列、GPV(MK736656.1) *NSI* 基因序列、DEV(EF449516.1) *UL6* 基因序列设计 3 对引物,具体信息列于表 1。引物由生工生物工程(上海)股份有限公

司合成。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物	序列(5'—3')	引物大小/bp
DuCV <i>REP</i> F	GACCCTTGGAGACTGGTTCA	164
DuCV <i>REP</i> R	GGGATTCTGAACCTCCGAA	
GPV <i>NSI</i> F	CAAGCATCAACTGTGGCACC	589
GPV <i>NSI</i> R	TCTGATCTACCCGGACAGCA	
DEV <i>UL6</i> F	GGTGTGGCAACCACTATGGA	790
DEV <i>UL6</i> R	ATCATCGCCCATACGTCCAC	

1.4 质粒标准品的制备

取 DuCV 毒株、GPV 毒株和 DEV 毒株,按照 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,再分别扩增目的基因,将 PCR 产物纯化、回收并连接 pMD19-T 载体,转化后构建 pMD19-T-DuCV *REP*、pMD19-T-GPV *NSI* 和 pMD19-T-DEV *UL6* 共 3 种重组质粒,并将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。

1.5 质粒 DNA 的提取

按照 E.Z.N.A.™ Plasmid Kit 质粒提取试剂盒说明书提取质粒 DNA,采用核酸浓度测定仪测定洗脱出的质粒 DNA 浓度。

1.6 DuCV 和 GPV 与 DEV 的单一 PCR 检测及产物鉴定

分别以提取的质粒 DNA 为模板进行单一 PCR 扩增。PCR 扩增体系(25 μ L): $2\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L,对应引物终浓度 0.8 μ mol/L,上、下游引物各 1 μ L,模板 DNA 2 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,扩增 33 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;8 $^{\circ}$ C 保存。扩增结束后,取 PCR 产物 8 μ L,于 1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。

1.7 DuCV 和 GPV 与 DEV 三重 PCR 的建立及条件优化

参照文献[15-16]的方法,将提取的 DuCV、GPV 和 DEV 质粒 DNA 稀释到相同的数量级后,分别取 20 μ L 混匀,作为三重 PCR 的模板,对三重 PCR 体系进行退火温度和引物终浓度的优化。优化退火温度时,三重 PCR 的总反应体系为 25 μ L: $2\times$ Taq

PCR Master Mix 12.5 μ L, DuCV、GPV、DEV 混合模板 DNA 3 μ L,3 对引物终浓度为 0.8 μ mol/L,3 对上、下游引物各 1 μ L,ddH₂O 3.5 μ L。扩增程序中退火温度设置 46.8、49.2、51.5、53.8、56.1、58.5、60.4 $^{\circ}$ C 共 7 个不同的梯度。优化引物终浓度时,三重 PCR 的总反应体系为 50 μ L: $2\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ L, DuCV、GPV、DEV 混合模板 DNA 3 μ L,3 对引物终浓度和 ddH₂O 的用量列于表 2。其他扩增条件均与 1.6 中的相同。扩增结束后,取 PCR 产物 8 μ L,于 1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳,以选出最佳的三重 PCR 反应条件。

表 2 三重 PCR 时引物终浓度和 ddH₂O 的用量

Table 2 The final concentration of primer and the dosage of ddH₂O of triple PCR

引物组合	引物终浓度/(μ mol·L ⁻¹)			ddH ₂ O/ μ L
	DuCV <i>REP</i> F+ DuCV <i>REP</i> R	GPV <i>NSI</i> F+ GPV <i>NSI</i> R	DEV <i>UL6</i> F+ DEV <i>UL6</i> R	
1	0.4	0.2	0.2	18.5
2	0.5	0.2	0.3	17.0
3	0.6	0.3	0.4	15.5
4	0.7	0.4	0.5	14.0
5	0.8	0.5	0.6	12.5
6	0.9	0.6	0.7	11.0
7	1.0	0.7	0.8	9.5

1.8 三重 PCR 方法的检验

1.8.1 特异性试验

以优化的三重 PCR 方法对 DuCV+GPV+DEV 的混合模板和 DuCV、GPV、DEV 单一模板及 NDV、RA、AIV、DHV、TUMV 的核酸为模板分别进行检测,以鉴定该方法的特异性。

1.8.2 敏感性试验

参照文献[17]的方法,将上述 1.5 中提取的 3 种质粒 DNA 模板分别进行 10 倍梯度稀释,共计 12 个梯度,分别为 1×10^0 、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 和 1×10^{11} ;各个稀释梯度分别取 1 μ L DNA 混匀,作为三重 PCR 模板,用优化后的三重 PCR 进行扩增,以检测该方法的敏感性。

1.8.3 重复性试验

应用建立的三重 PCR 方法对 DuCV+GPV+DEV、DuCV+GPV、GPV+DEV、DuCV+DEV、

DuCV、GPV、DEV 的核酸样本进行多次重复试验，以验证三重 PCR 的稳定性。

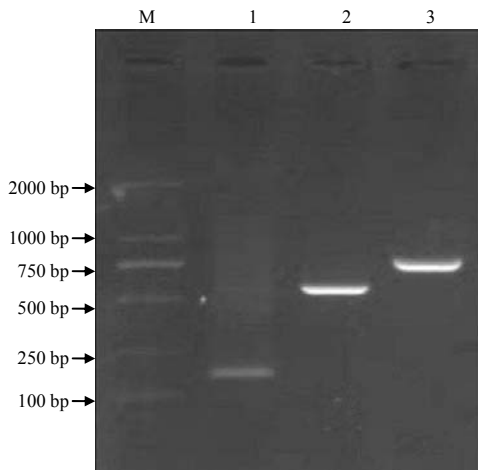
1.8.4 临床应用

应用建立的三重 PCR 方法对 42 份临床发病鸭组织样本进行 DuCV、GPV、DEV 检测，同时进行单一 PCR 的检测，将两者的检测结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 DuCV 和 GPV 与 DEV 的单一 PCR 检测及产物鉴定结果

各对引物均能扩增出相应的病毒靶基因，经测序可知，DuCV *REP*、GPV *NS1*、DEV *UL6* 基因的大小分别为 164、589、790 bp，均与预期大小相符(图 1)。与 NCBI 中的 BLAST 进行比对，测序结果与参考基因的一致性均能达到 99%，与 NCBI 中的其他序列同源性达到 98%以上。



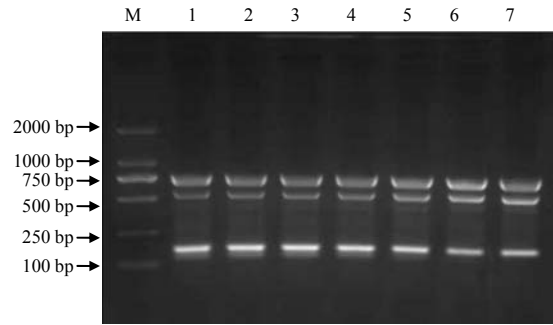
M DNA Marker ; 1 DuCV ; 2 GPV ; 3 DEV.

图 1 DuCV 和 GPV 与 DEV 的单一 PCR 检测电泳结果

Fig.1 The electrophoresis results of DuCV and GPV and DEV detected by single PCR

2.2 DuCV 和 GPV 与 DEV 三重 PCR 的建立及条件优化结果

通过对退火温度和引物终浓度的优化，确定其最适退火温度为 58.5 °C(图 2)，最适 DuCV *REP*、GPV *NS1*、DEV *UL6* 引物终浓度分别为 0.9、0.6、0.7 μmol/L(图 3)。最适扩增程序：95 °C 预变性 3 min；95 °C 变性 30 s，58.5 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，扩增 33 个循环；72 °C 延伸 10 min；8 °C 反应结束。

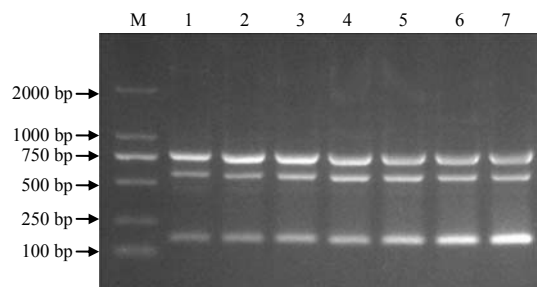


M DNA Marker ; 泳道 1~7 分别示退火温度为 46.8、

49.2、51.5、53.8、56.1、58.5、60.4 °C 的处理。

图 2 不同退火温度下 DuCV 和 GPV 与 DEV 的三重 PCR 检测电泳结果

Fig.2 The electrophoresis results of DuCV, GPV and DEV detected by triple PCR at different annealing temperatures



M DNA Marker ; 1~7 分别对应表 2 中 1~7 组引物浓度的处理。

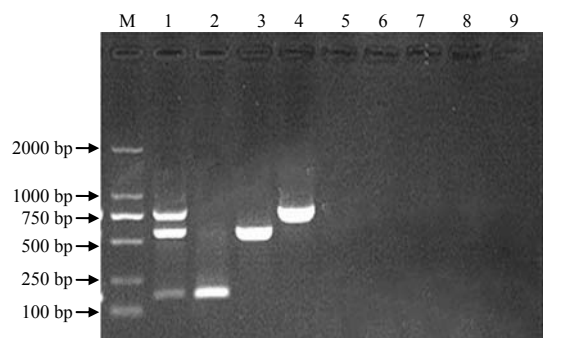
图 3 不同引物浓度 DuCV 和 GPV 与 DEV 的三重 PCR 检测电泳结果

Fig.3 The electrophoresis results of DuCV and GPV and DEV detected by triple PCR with different primer concentrations

2.3 三重 PCR 方法的检验结果

2.3.1 特异性

DuCV+GPV+DEV 混合模板和 DuCV、GPV、DEV 单一模板均能扩增出特异性的目的片段，除此之外未见其他的扩增片段，表明该方法具有较好的特异性(图 4)。



M DNA Marker ; 1 DuCV+GPV+DEV ; 2 DuCV ; 3 GPV ;

4 DEV ; 5 NDV ; 6 RA ; 7 AIV ; 8 DHV ; 9 TUMV.

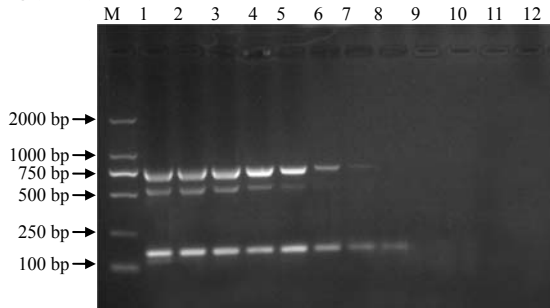
图 4 三重 PCR 特异性试验的结果

Fig.4 The results of specificity test of triple PCR

2.3.2 敏感性

该三重 PCR 对 DuCV、GPV、DEV 核酸进行

扩增，可扩增出清晰条带的最大稀释梯度分别为 1×10^7 、 1×10^5 、 1×10^6 ，其最低检出量分别为 1、100、10 fg(图 5)。



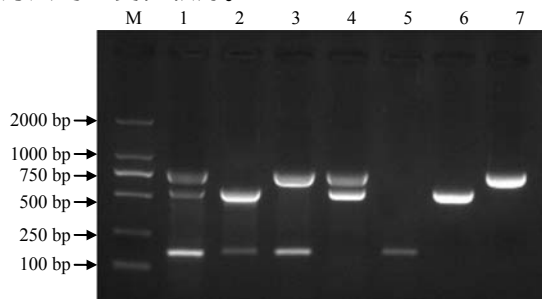
M DNA Marker 泳道 1~12 分别示稀释梯度为 1×10^0 、 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 的处理。

图 5 三重 PCR 检测 DuCV 和 GPV 与 DEV 敏感性试验的结果

Fig.5 The results of the sensitivity test of DuCV and GPV and DEV detected by triple PCR

2.3.3 重复性

DuCV+GPV+DEV、DuCV+GPV、GPV+DEV、DuCV+DEV、DuCV、GPV、DEV 的核酸样本均能扩增出与预期片段大小一致的目的条带(图 6)，说明该方法的重复性较好。



M DNA Marker ; 1 DUCV+GPV+DEV ; 2 DUCV+GPV ; 3 DUCV+DEV ; 4 GPV+DEV ; 5 DUCV ; 6 GPV ; 7 DEV。

图 6 三重 PCR 重复性试验的结果

Fig.6 The results of repeatability test of triple PCR

2.3.4 临床应用结果

从表 3 可知，三重 PCR 与单一 PCR 检测样品的阳性数和阳性率均相同，两者的符合率为 100%。

表 3 DuCV 和 GPV 与 DEV 临床样品的检测结果

检测项目	阳性数		阳性率/%		符合率/%
	三重 PCR	单一 PCR	三重 PCR	单一 PCR	
DuCV	11	11	26.19	26.19	100
GPV	13	13	30.95	30.95	100
DEV	8	8	19.05	19.05	100

3 结论与讨论

本研究中，得出的最适退火温度为 58.5°C ，最适引物终浓度组合 DuCV REP、GPV NS1、DEV UL6 分别为 0.9、0.6、0.7 $\mu\text{mol/L}$ 。该引物终浓度比吴专伟等^[18]的更小，即可稀释量更多。确定退火温度和引物终浓度后，利用所建立的三重 PCR 对 NDV、RA、AIV、DHV、TUMV 进行检测，未扩增出目的片段，表明其特异性强。对模板量进行优化得出，所建立的三重 PCR 对 DuCV、GPV、DEV 的最低核酸检出量分别为 1、100、10 fg，这远低于饶体宇等^[16]、李海琴等^[19]所建立的三重 PCR 的最低检出量，表明本研究中所建立的三重 PCR 敏感度高。其原因可能是本研究中所运用的是质粒模板，而饶体宇等^[16]所运用的是尿囊液扩增的模板。用于 42 份临床样品检测后，三重 PCR 与单一 PCR 的一致性达到 100%，表明其重复性好。

综上所述，本研究中所建立的三重 PCR 方法具有特异性强、灵敏度高、重复性好、简便、快速等特点，可用于鉴别诊断和批量诊断临床样品中的 DuCV、GPV 和 DEV。

参考文献：

- [1] XU Y, JIA R Y, ZHANG Z L, et al. Analysis of synonymous codon usage pattern in duck circovirus[J]. Gene, 2015, 557(2): 138-145.
- [2] SCHESSLER C H. Isolation of a highly pathogenic virus from geese with hepatitis[J]. Avian Diseases, 1971, 15(2): 323-325.
- [3] 田彬, 汪铭书, 程安春. 鸭瘟病毒致病性研究进展[J]. 中国家禽, 2018, 40(12): 38-42.
TIAN B, WANG M S, CHENG A C, Progress in pathogenicity of duck plague virus[J]. China Poultry, 2018, 40(12): 38-42.
- [4] KOONIN E V, DOLJA V V, MORRIS T J. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1993, 28(5): 375-430.
- [5] LIU M M, ZHAO Y, HU D M, et al. Clinical and histologic characterization of co-infection with astrovirus and goose parvovirus in goslings[J]. Avian Diseases, 2019, 63(4): 731-736.
- [6] HAN S J, LI R, LIN J, et al. Galectin-1 induces immune response and antiviral ability in Cherry Valley ducks after

- duck plague virus infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 98: 205–213.
- [7] 鲜思美, 汪德生, 王春文. 番鸭细小病毒、鸭瘟病毒与沙门菌混合感染的诊断[J]. *中国家禽*, 2012, 34(22): 54–56.
- XIAN S M, WANG D S, WANG C W. Diagnosis of mixed infection of muscovy duck parvovirus, duck plague virus and salmonella[J]. *China Poultry*, 2012, 34(22): 54–56.
- [8] 柴同杰. 山东省樱桃谷鸭群鸭圆环病毒及其混合感染的调查[J]. *中国家禽*, 2009, 31(6): 4–7.
- CHAI T J. Investigation on duck circovirus and its mixed infection in cherry valley duck flock in Shandong Province [J]. *China Poultry*, 2009, 31(6): 4–7.
- [9] 李志杰, 李舫, 王莉莉, 等. 雏鹅小鹅瘟病毒与 H9N2 禽流感病毒混合感染的诊治[J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(3): 123–124.
- LI Z J, LI F, WANG L L, et al. Diagnosis and treatment of mixed infection of gosling gosling plague virus and H9N2 avian influenza virus[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(3): 123–124.
- [10] 刘崇, 高颖, 杨洪一. 辣椒轻斑驳病毒的分子杂交检测[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(4): 360–363.
- LIU C, GAO Y, YANG H Y. Molecular hybridization detection for pepper mild mottle virus[J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2015, 41(4): 360–363.
- [11] 师志海, 徐照学, 兰亚莉, 等. 牛诺如病毒、牛星状病毒和牛环曲病毒多重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(10): 1924–1928.
- SHI Z H, XU Z X, LAN Y L, et al. Establishment and application of a multiple PCR for detection of BNoV, BAstV and BToV[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2020, 40(10): 1924–1928.
- [12] 母润红, 聂丹丹, 李明成, 等. 水产品中食源性病原菌多重 PCR 快速检测方法的建立[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2020, 21(6): 756–760.
- MU R H, NIE D D, LI M C, et al. Rapid detection of foodborne pathogenic bacteria by establishment of multi-PCR method[J]. *Journal of Beihua University(Natural Science)*, 2020, 21(6): 756–760.
- [13] 张飞燕, 赵玲, 金洁, 等. 多重 PCR 技术在实验动物病原检测中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(10): 111–116.
- ZHANG F Y, ZHAO L, JIN J, et al. Application of multiplex PCR to detecting experimental animal pathogens[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2018, 28(10): 111–116.
- [14] CHAMBERLAIN J S, GIBBS R A, RAINER J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(23): 11141–11156.
- [15] 包细明. 鸭主要病原菌耐药性分析及噬菌体的分离鉴定[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- BAO X M. Analysis of drug resistance of duck main pathogens and isolation and identification of phage[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019.
- [16] 饶体宇, 张益, 鲜思美, 等. 鸭瘟病毒、鹅细小病毒和番鸭细小病毒三重 PCR 检测方法的建立[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(7): 85–89.
- RAO T Y, ZHANG Y, XIAN S M, et al. Establishment of a triple PCR method for identifying duck plague virus, goose parvovirus and muscovy duck parvovirus[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 51(7): 85–89.
- [17] 吴静, 赵润鹏, 徐雪维, 等. 鸡六种病毒多重 PCR 检测方法的建立和应用[J]. *安徽理工大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(3): 8–12.
- WU J, ZHAO R P, XU X W, et al. Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of six chicken-related virus[J]. *Journal of Anhui University of Science and Technology(Natural Science)*, 2016, 36(3): 8–12.
- [18] 吴专伟, 饶体宇, 鲜思美, 等. 鸭瘟病毒和番鸭细小病毒双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国家禽*, 2019, 41(12): 17–21.
- WU Z W, RAO T Y, XIAN S M, et al. Establishment and application of double PCR method for detection of duck plague virus and Muscovy duck parvovirus[J]. *China Poultry*, 2019, 41(12): 17–21.
- [19] 李海琴, 傅光华, 黄江南, 等. 鸭三种病毒性疾病多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *福建农业学报*, 2018, 33(7): 655–659.
- LI H Q, FU G H, HUANG J N, et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of three duck viral diseases[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33(7): 655–659.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳正