

# 犬细小病毒高效纳米 PCR 检测方法的建立及初步应用

秦彤<sup>1,2</sup>, 周灵<sup>1,2</sup>, 由欣月<sup>1,2</sup>, 梁琳<sup>1,2</sup>, 史利军<sup>1,2</sup>, 张建伟<sup>3</sup>, 李金祥<sup>4\*</sup>, 崔尚金<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 农业部兽药与诊断技术北京科学观测实验站, 北京 100193; 3. 北京市畜牧总站, 北京 100107; 4. 中国农业科学院, 北京 100081)

**摘要:** 为建立灵敏、快速的犬细小病毒(CPV)检测方法,本研究针对 CPV VP2 基因保守序列设计一对能扩增 574 bp 片段的特异性引物,对纳米 PCR 的退火温度、引物浓度等反应条件进行了优化,并对其特异性和灵敏度进行了评估。结果表明,所建立的纳米 PCR 特异性和灵敏性良好,最低核酸检出量为 2 拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ ,其敏感性比常规 PCR 高 1 000 倍。分别采用纳米 PCR 和常规 PCR,对广西、北京、吉林送检的 75 份疑似 CPV 的临床样品进行检测,CPV 阳性率分别为 89.3%(67/75)和 70.7%(53/75),表明该方法具有更高的敏感性,适用于 CPV 低含量临床样品的检测。本方法的建立为 CPV 感染的早期快速、灵敏、准确的诊断提供了新方法,为 CPV 的防控奠定基础,具有重大的临床应用意义和价值。

**关键词:** 犬细小病毒;VP2 基因;纳米 PCR;临床检测

中图分类号:S852.659.2

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2019)06-1268-07

## Establishment and Application of Nano PCR Assay for Detection of the Canine Parvovirus

QIN Tong<sup>1,2</sup>, ZHOU Ling<sup>1,2</sup>, YOU Xinyue<sup>1,2</sup>, LIANG Lin<sup>1,2</sup>,  
SHI Lijun<sup>1,2</sup>, ZHANG Jianwei<sup>3</sup>, LI Jinxiang<sup>4\*</sup>, CUI Shangjin<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Animal Sciences (IAS), Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100193, China; 2. Scientific Observing and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Technology of Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China; 3. Beijing Animal Husband Service, Beijing 100107, China; 4. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to establish a rapid and sensitive nanoparticle-assisted PCR (nano PCR) assay for detection of canine parvovirus (CPV), a pair of primers was designed based on the conserved region of the VP2 gene to amplify 574 bp fragment. The annealing temperature, primer concentration and other reaction conditions of nano PCR were optimized, and its specificity and sensitivity were evaluated. The results showed that the established nano PCR had good specificity and sensitivity, with a minimum nucleic acid detection amount of 2 copies· $\mu\text{L}^{-1}$ , and its sensitivity was 1 000 times higher than that of conventional PCR. Seventy-five clinical samples collected from Beijing, Guangxi and Jilin were tested, the positive rate of CPV was 89.3% (67/75) and 70.7% (53/75) by nano PCR and conventional PCR, respectively. The results showed that the method had higher sensitivity and was suitable for the detection of low amount of CPV in

收稿日期:2018-11-02

基金项目:中国农业科学院创新工程项目(ASTIP-IAS15);中国农业科学院基本科研业务费(2018-YWF-YTS-16);“十三五”国家重点研发计划(2016YFD0501003;2017YFD0501603)

作者简介:秦彤(1980-),女,河北石家庄人,博士,副研究员,主要从事动物传染病病原学与流行病学研究,E-mail:qintong@caas.cn

\*通信作者:李金祥,主要从事动物病原学与流行病学研究,E-mail:lijinxiang@caas.cn;崔尚金,主要从事动物传染病病原学与流行病学研究,E-mail:cuishangjin@caas.cn

clinical samples. The established nano PCR in this study provided a new method for rapid, sensitive and accurate diagnosis of CPV infection in the early stage, which laid a foundation for the prevention and control of CPV and had significant value in clinical application.

**Key words:** canine parvovirus; VP2 gene; nano PCR; clinical detection

犬细小病毒病是危害我国养犬业的重要疫病之一,其病原是犬细小病毒(canine parvovirus, CPV),该病具有高度的传染性,极易传播,主要发生在幼犬,成年犬也会感染,病犬主要的临床症状表现为带有鱼腥味的出血性粪便和非化脓性心肌炎,死亡率高达 80%<sup>[1-2]</sup>。20 世纪 70 年代,CPV 作为一种新的病原首先在澳大利亚和加拿大被发现,接着几个月内就在全球范围内流行起来<sup>[3]</sup>。在其出现不久后,CPV-2 不断突变,连续产生两种新抗原突变体,CPV-2a 和 CPV-2b,并逐渐取代原来的 CPV-2 型。2001 年,在意大利检测到新的抗原突变体 CPV-2c<sup>[4-5]</sup>,并迅速传播到其他国家。近几年,中国在不同省份也有 CPV-2c 出现的报道<sup>[6]</sup>。CPV-2c 与原始 CPV-2 相比,抗原性突变体在犬中表现出高的致病性,并且增加宿主范围,能够感染猫并使其致病<sup>[7]</sup>。流行病学调查表明,最新型的 CPV-2c 在不同的地理区域中变得普遍,成年犬接种疫苗后也能被感染。然而,通过传统方法检测 CPV 感染并不敏感,因此,建立新型、灵敏度高、特异性好的犬细小病毒检测方法迫在眉睫。

纳米 PCR 技术是在 PCR 反应的 buffer 中添加一定量的粒径为 1~100 nm 的纳米金属颗粒,从而形成纳米流体,纳米流体具有极高的导热性,比普通流体要高得多,因此在添加了纳米金属颗粒的 PCR 热循环中,PCR 反应能够更快地达到目标温度,从而缩短了在非目标温度停留的时间,不仅减少了非特异扩增,也提高了反应的特异性<sup>[8-11]</sup>。

近年来,随着 CPV 感染数量的逐渐增加,CPV 的早期检测越来越受到研究人员的关注和重视。本研究以 CPV VP2 基因为目标基因,设计特异性引物,拟建立 CPV 纳米 PCR 检测方法,为 CPV 的分子流行病学调查和早期诊断提供试验方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

犬瘟热病毒(canine distemper virus, CDV)、犬细小病毒(CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 型)、狂犬病病毒(rabies virus, RV)和犬冠状病毒(canine coro-

navirus, CCoV)由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所宠物疫病防控科技创新团队保存。

### 1.2 临床样品

2016—2018 年在广西省、北京市和吉林省采集的 75 份疑似感染细小病毒的犬粪便样品,以 0.01 mol·L<sup>-1</sup> pH7.6 PBS 做 1:100 稀释,反复冻融后涡旋混匀,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min,取上清,-80 °C 保存。应用病毒 DNA 提取试剂盒提取临床样品的 DNA;应用病毒 RNA 提取试剂盒提取 CDV、RV、CCoV 的基因组 RNA,并以此为模板按照 M-MLV 反转录试剂盒进行 cDNA 的合成,-20 °C 保存,待检。

### 1.3 主要试剂

PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA 高保真酶,DL2000、Pluss Marker,La-Taq, DNA A-Tailing Kit, pET-28a 载体,HB101 感受态购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;胶回收试剂盒购自 AXYGEN 公司;纳米 PCR 试剂盒购自山东正大医疗器械股份有限公司。

### 1.4 引物设计

参照 GenBank 中发表的 CPV-2 (登录号: AB054222)基因组序列的分析,应用 Primer 5.0 软件设计扩增 CPV VP2 基因的全长序列引物,通过与已公布的 VP2 基因全长序列进行比对后筛选保守区域设计扩增 574 bp 片段的引物(P3/P4)。引物(表 1)由华大基因公司合成。

### 1.5 标准品的制备

以 CPV-BJ 株细胞培养物提取的 DNA 为模板,以 P1/P2 为引物,利用 PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA 高保真酶扩增 VP2 基因全长序列,并将其克隆至 pET-28a 载体中构建重组质粒 pET-28a-VP2,按照小提质粒试剂盒说明书提取质粒,并送至北京华大基因进行测序,测序正确的阳性质粒命名为 pET-28a-VP2(+),作为纳米 PCR 的质粒标准品,于 -20 °C 保存备用。

### 1.6 传统 PCR 方法的建立

传统 PCR 反应体系预设定:2× LA Taq Buffer II

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

片段 Fragment	引物序列 Primer sequences	产物大小/bp Product size
VP2	P1:5'-CGGGATCCATGAGTGATGGAGCAGTTCAA-3' P2:5'-GGAATTCTTAGTATAATTTTCTAGGTGCTAGTT-3'	1 755
VP2 保守区域 VP2 conservative region	P3:5'-TGATGGAGCAGTTCAACCAGA-3' P4:5'-TCAGATCTCATAGCTGCTGGA-3'	574

(Mg<sup>2+</sup> Plus) 10  $\mu$ L, P3/P4(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 0.6  $\mu$ L, pET-28a-VP2(+)  
1  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L; 反应条件预设定: 95  $^{\circ}$ C 4 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 35 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.7 纳米 PCR 方法的建立

#### 1.7.1 纳米 PCR 反应体系及反应条件的优化

反应体系: 2 $\times$  nanoPCR buffer 10  $\mu$ L, P3/P4 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 0.6  $\mu$ L, pET-28a-VP2(+)  
1  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。反应条件预设定: 95  $^{\circ}$ C 4 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 35 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。优化退火温度和引物浓度。将温度进行梯度设置为 45~55  $^{\circ}$ C, 间隔 1  $^{\circ}$ C, 进行退火温度的优化, 反应体系和其他反应条件均相同。引物的使用体积从 0.1 到 1.0  $\mu$ L 进行优化, 间隔 0.1  $\mu$ L, 按照优化后的退火温度进行。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7.2 敏感性试验 测定阳性模板 pET-28a-VP2(+)  
的质粒浓度, 并换算成拷贝数, 按照 10 倍比稀释后, 分别利用纳米 PCR 和常规 PCR 进行扩增, 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 比较两者

的敏感性; 试验重复 3 次。

1.7.3 特异性试验 应用纳米 PCR 分别对 CDV、RV、CCoV 的 cDNA 进行检测, 以此验证纳米 PCR 的特异性; 试验重复 3 次。并对 CPV 不同抗原突变体 CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 进行纳米 PCR 检测。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.8 临床样品的检测

对临床样品的检测比较, 将 75 份临床样品提取 DNA 作为模板, 分别应用纳米 PCR 和常规 PCR 对提取的 DNA 进行检测。

## 2 结果

### 2.1 纳米 PCR 反应条件的优化

2.1.1 CPV 纳米 PCR 检测方法最佳退火温度的确定 CPV 纳米 PCR 经退火温度(45~55  $^{\circ}$ C)优化, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。由图 1 可知, 45~55  $^{\circ}$ C 下, 纳米 PCR 均可扩增得到目的条带, 最佳退火温度为 47  $^{\circ}$ C。最终的反应条件: 95  $^{\circ}$ C 4 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 47  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 35 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

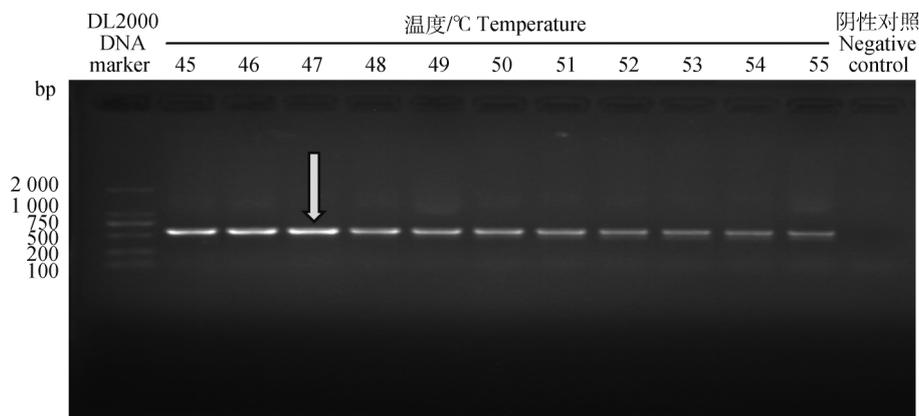


图 1 退火温度的优化

Fig. 1 Optimization of the annealing temperature of the CPV nano PCR

2.1.2 CPV 纳米 PCR 检测方法最佳引物浓度的确定 在最佳反应条件下,纳米 PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 2  $\times$  nano PCR buffer 10  $\mu\text{L}$ , P3/P4 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.1~1.0  $\mu\text{L}$ , pET-28a-VP2(+)  
1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ ; 纳米 PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  4 min; 95  $^{\circ}\text{C}$

30 s, 47  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  35 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。引物量分别设置为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0  $\mu\text{L}$ , 进行引物浓度优化。琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。结果表明当引物量为 0.8  $\mu\text{L}$  时扩增效果最佳。

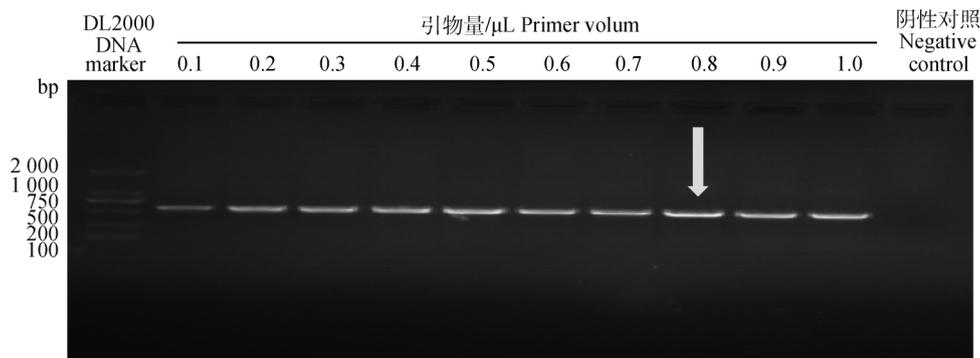


图 2 引物浓度的优化

Fig. 2 Optimization of the primer concentration of the CPV nano PCR

2.1.3 CPV 纳米 PCR 最佳反应体系的确定 经反应退火温度及引物浓度的摸索,最终确定 CPV 纳米 PCR 反应体系: 2  $\times$  nano PCR buffer 10  $\mu\text{L}$ , P3/P4 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ , pET-28a-VP2(+)  
1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。最终的反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  4 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 47  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  35 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min。

## 2.2 CPV 纳米 PCR 敏感性试验

构建的重组质粒 pET-28a-VP2(+)  
的浓度经测定为  $174 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 计算出质粒的拷贝数为  $2 \times 10^{10}$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。将重组质粒进行 10 倍倍比稀释, 得到浓度标准品为  $2 \times 10^9 \sim 2 \times 10^0$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 取每个稀释度的重组质粒模板分别进行纳米 PCR 和常规 PCR 检测。琼脂糖凝胶电泳结果见图 3。由图 3 A 可知, 纳米 PCR 能检测到 2 拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 而常规 PCR 的最低检测量为  $2 \times 10^3$  拷贝  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  (图 3B), 敏感性试验结果表明纳米 PCR 检测方法的灵敏度比普通 PCR 方法高 1 000 倍。

## 2.3 CPV 纳米 PCR 特异性试验

采用 P3/P4 引物分别对犬瘟热病毒(CDV)、狂犬病毒(RV)、犬冠状病毒(CCoV)进行纳米 PCR 检测, 结果只有 CPV 能扩增出 574 bp 的目的片段, 其他病毒均未扩增出条带(图 4A), 同时对 CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 检测都能扩增出目的片段(图 4B), 试验结果表明 CPV 纳米 PCR 检测具有良好的

特异性。

## 2.4 纳米 PCR 与常规 PCR 对临床样品的检测比较

提取采集的 75 份粪便样本的 DNA, 应用所建立的纳米 PCR 对 CPV 进行检测。检测结果显示, 纳米 PCR 和常规 PCR 检测阳性率分别为 89.3% (67/75) 和 70.7% (53/75) (表 2)。为进一步确定所建立方法检测的准确性, 将纳米 PCR 检出但普通 PCR 未检出的 14 份样本的产物送华大基因测序分析。测序结果显示, 纳米 PCR 获得的 574 bp 特异性片段与 CPV 相似性均达 99% 以上。对临床样品的检测结果表明, 所建立的纳米 PCR 比普通 PCR 更加敏感, 适用于低含量 CPV 临床样品的检测。

## 3 讨论

CPV 主要感染犬, 尤其是幼犬, 传染性极强, 致死率也很高。一年四季均可发病, 以冬、春季节多发。目前, 检测 CPV 感染的技术主要有免疫层析(IC)试验、血凝试验(HA)、病毒分离(VI)试验、常规 PCR<sup>[12]</sup>、巢式 PCR<sup>[13]</sup>、荧光定量 PCR<sup>[14]</sup> 等。与分子生物学技术比较, IC 试验的相对灵敏度不超过 50%, 而特异性为 100%; HA 试验结果的准确性受红细胞质量、红细胞沉降系数的影响, 具有不稳定性; 病毒分离(VI)仅可在实验室细胞上进行, 需要一定专业技术和细胞培养能力的实验人员, 需要长达数天的时间, 并需要进行免疫荧光试验来检测病

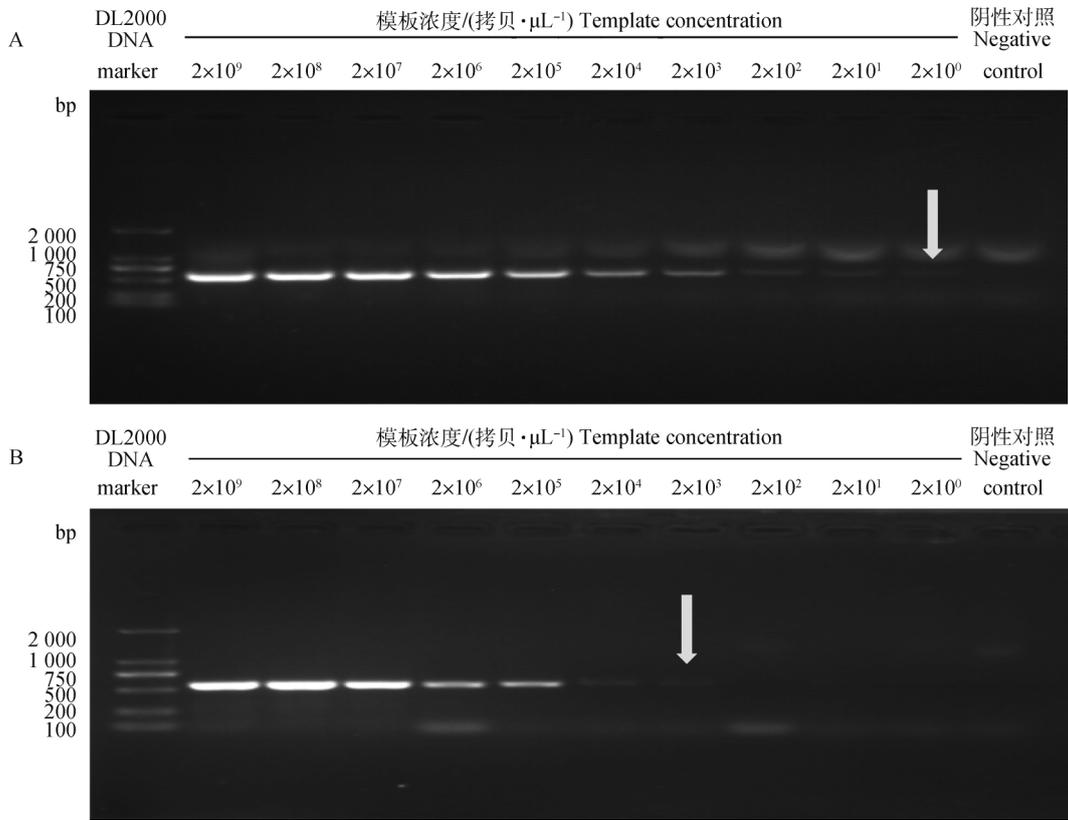
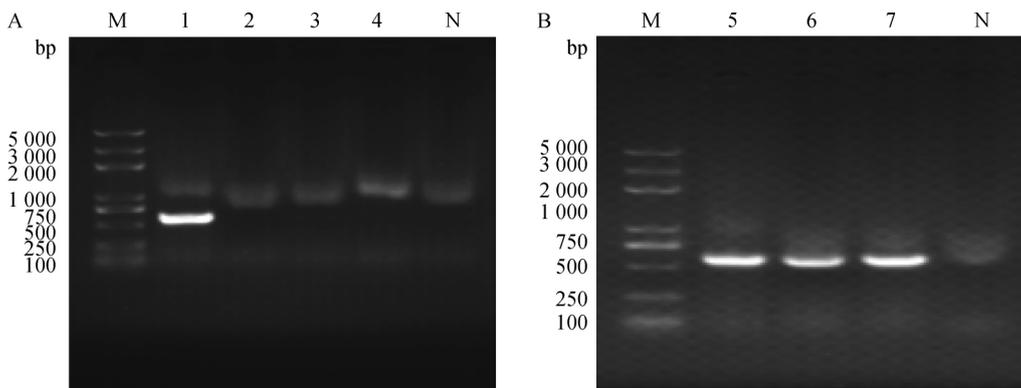


图 3 CPV 纳米 PCR(A)和常规 PCR(B) 敏感性试验  
 Fig. 3 Sensitivity of CPV nano PCR assay (A) and conventional PCR assay (B)



M. 2K Plus 相对分子质量标准; N. 阴性对照; 1. 犬细小病毒; 2. 犬瘟热病毒; 3. 狂犬病病毒; 4. 犬冠状病毒; 5. CPV-2a 型; 6. CPV-2b 型; 7. CPV-2c 型

M. 2K Plus marker; N. Negative control; 1. CPV; 2. CDV; 3. RV; 4. CCoV; 5. CPV-2a; 6. CPV-2b; 7. CPV-2c

图 4 纳米 PCR 特异性试验结果

Fig. 4 Specificity result of the nano PCR

毒抗原;PCR 是比较常见的技术,但其缺陷在于耗时、敏感性不显著且不能定量检测;荧光定量 PCR 的敏感性和准确性高于普通 PCR,但其实施需要昂贵的实时荧光定量 PCR 仪,在二三线城市的动物诊所或实验室难以普及推广。以上这些缺点限制了上述方法在临床诊断中的应用。

本研究建立了检测犬细小病毒的高效纳米 PCR 技术,由于纳米流体具有极高导热性,使 PCR 体系达到温度所需平衡时间短,实现目的条带的快速扩增,提高特异性产物的产量;敏感性试验结果显示纳米 PCR 检测的敏感性可达到常规 PCR 技术的 1 000 倍。目前,纳米 PCR 已成功应用于水貂肠炎

表 2 临床样品的检测结果

Table 2 Test results of clinical samples

方法 Method	样品数 <i>n</i>	阳性数 Positive	阳性率/% Positive rate
普通 PCR Conventional PCR	75	53	70.7
纳米 PCR Nano PCR	75	67	89.3

病毒、猪博卡病毒、猪细小病毒等多种动物病原的临床检测中,且其敏感性远远高于普通 PCR<sup>[15-17]</sup>。2018 年, Gabriel 等<sup>[18]</sup>将纳米 PCR 技术成功应用于脑食性变形虫的快速检测中,首次发现了石墨烯氧化物、氧化铜和氧化铝的纳米混合颗粒可以优化棘阿米巴、巴拉木翘和奈格莱里亚的 PCR 检测效果,表明纳米 PCR 法在寄生虫感染的临床诊断、流行病学和病理学研究以及其他微生物的环境监测等方面也具有潜在的应用价值。

为证明获得的 574 bp 是 CPV 来源的特异性片段,笔者将纳米 PCR 能检出但普通 PCR 未检出的 14 份样本的 PCR 产物进行了克隆测序,并进行了序列同源性分析,结果显示 14 个样本的测序结果与 CPV VP2 基因的相似性均在 99% 以上,证明纳米 PCR 获得的 574 bp 是 CPV 来源的特异性片段,排除了纳米 PCR 假阳性的问题。

临床中,在 CPV 早期感染时病毒量在病犬体内很少,用普通的检测方法很难检测到,但应用本研究建立的纳米 PCR 技术能够更加高效、快速地检测,且适合基层实验室使用。因此,本方法的建立为 CPV 的早期检测、流行病学调查、预防和治疗奠定了基础。

#### 4 结 论

成功建立犬细小病毒的纳米 PCR 检测方法,该方法适用于 CPV 低含量临床样品的检测,特异性和灵敏性良好,最低核酸检出量为 2 拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ ,其敏感性比常规 PCR 高 1 000 倍,可应用于犬细小病毒感染的早期诊断和流行病学调查,为犬细小病毒感染的鉴定和防控奠定基础,具有重大的临床应用意义和价值。

#### 参考文献 (References):

[1] PINTO L D, STRECK A F, GONCALVES K R, et

al. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010[J]. *Virus Res*, 2012, 165(1):29-33.

[2] SHACKELTON L A, PARRISH C R, TRUYEN U, et al. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(2):379-384.

[3] PÉREZ R, BIANCHI P, CALLEROS L, et al. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155(2-4):214-219.

[4] BUONAVOGLIA C, MARTELLA V, PRATELLI A, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(12):3021-3025.

[5] DECARO N, BUONAVOGLIA C. Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155(1):1-12.

[6] 张仁舟,杨松涛,冯 昊,等. 中国国内首次检测到犬细小病毒 CPV-2c[J]. *中国病原生物学杂志*, 2010, 5(4):246-249, 275.

ZHANG R Z, YANG S T, FENG H, et al. The first detection of canine parvovirus type 2c in China [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2010, 5(4):246-249, 275. (in Chinese)

[7] PALERMO L M, HAFENSTEIN S L, PARRISH C R. Purified feline and canine transferrin receptors reveal complex interactions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges[J]. *J Virol*, 2006, 80(17):8482-8492.

[8] LI H K, HUANG J H, LV J H, et al. Nanoparticle PCR;nanogold-assisted PCR with enhanced specificity [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(32):5100-5103.

[9] SHEN C C, YANG W J, JI Q L, et al. NanoPCR observation;different levels of DNA replication fidelity in nanoparticle-enhanced polymerase chain reactions[J]. *Nanotechnology*, 2009, 20(45):455103.

[10] LI H X, ROTHBERG L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(39):14036-14039.

[11] MA X J, CUI Y C, QIU Z, et al. A nanoparticle-assisted PCR assay to improve the sensitivity for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies virus and gene-deleted vaccine strains [J]. *J Virol*

- Methods*, 2013, 193(2):374-378.
- [12] DECARO N, DESARIO C, BEALL M J, et al. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test[J]. *Vet J*, 2010, 184(3): 373-375.
- [13] HIRASAWA T, KANESHIGE T, MIKAZUKI K. Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction[J]. *Vet Microbiol*, 1994, 41(1-2):135-145.
- [14] DECARO N, ELIA G, MARTELLA V, et al. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 105(1):19-28.
- [15] WANG J K, CHENG Y N, ZHANG M, et al. Development of a nanoparticle-assisted PCR (nano PCR) assay for detection of mink enteritis virus (MEV) and genetic characterization of the NS1 gene in four Chinese MEV strains[J]. *BMC Vet Res*, 2015, 11:1.
- [16] WANG X L, BAI A Q, ZHANG J, et al. A new nano PCR molecular assay for detection of porcine bocavirus[J]. *J Virol Methods*, 2014, 202:106-111.
- [17] CUI Y, WANG Z, MA X, et al. A sensitive and specific nanoparticle-assisted PCR assay for rapid detection of porcine parvovirus[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2014, 58(2):163-167.
- [18] GABRIEL S, RASHEED A K, SIDDIQUI R, et al. Development of nanoparticle-assisted PCR assay in the rapid detection of brain-eating amoebae[J]. *Parasitol Res*, 2018, 117(6):1801-1811.

(编辑 白永平)