

HRCA 技术检测中华鳖虹彩病毒

彭姣 王洪强 李登峰* 陈炯 周永强 顾晓英 刘联国

(宁波大学 海洋学院 浙江 宁波 315211)

摘要: 【目的】中华鳖虹彩病毒(STIV)是甲鱼重要的病毒性病原之一, 建立特异性好、灵敏度高的中华鳖虹彩病毒超分支滚环扩增体系(HRCA), 对 STIV 进行快速、准确地检测。【方法】根据中华鳖虹彩病毒(STIV)独有的基因序列和锁式探针公共连接序列分别设计特异性的锁式探针及其扩增引物, 对 HRCA 的系列反应条件进行优化, 验证该方法的特异性和灵敏度, 并用该方法对感染 STIV 显症和未显症的甲鱼组织进行检测。【结果】10 nmol/L 探针经 T4 DNA 连接酶作用 20 min 环化, *Bst* DNA 聚合酶大片段扩增 20 min 即可获得很好的检测效果。特异性试验表明, 在多种待检病毒样中, HRCA 能特异地检测出 STIV, 同时 HRCA 具有极高的灵敏度, 能检测出的最低模板量为 10^1 拷贝, 而常规 PCR 的检测下限为 10^3 拷贝, 对显症和尚未显症的感染早期甲鱼组织的检测结果均为阳性。【结论】建立的中华鳖虹彩病毒 HRCA 检测体系具有灵敏、快速、简便等特点, 能从组织样品中准确地检测出 STIV, 可以用于该类疾病的早期诊断, 具有较好的推广前景。

关键词: 中华鳖虹彩病毒, 超分支滚环扩增, 检测

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30840061); 浙江省公益性技术应用研究计划项目(No. 2011C32004); 浙江省教育厅重点科研计划项目(No. Z201017998); 宁波市自然科学基金项目(No. 2010A610003); 宁波大学人才工程项目(No. XR0713017); 宁波大学学科项目(No. XK0715049); 宁波大学王宽诚幸福基金项目

*通讯作者: Tel: 86-574-86690815; 信箱: lidengfeng@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-03-27; 接受日期: 2012-05-07

Detection of soft-shelled turtle iridovirus with HRCA

PENG Jiao WANG Hong-Qiang LI Deng-Feng* CHEN Jiong

ZHOU Yong-Qiang GU Xiao-Ying LIU Lian-Guo

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

Abstract: [Objective] To establish a detection system of soft-shelled turtle iridovirus (STIV, a causative agent of severe diseases in cultured *Trionyx sinensis*) with hyper-branched rolling cycle amplification (HRCA) assay, which provides a stable, reliable and novel technique for early diagnosis of the disease and identification of the pathogen. **[Methods]** The padlock probe consists of a universal linking sequence and the two target complementary regions at 5' and 3' ends, which was designed based on the unique fragment sequence of STIV, was synthesized. Detection system of HRCA was established and optimized. The specificity and sensitivity of HRCA was determined and compared with conventional PCR. Sick turtles with or without obvious symptom were detected applying HRCA. **[Results]** HRCA is capable of amplifying STIV DNA, while can not detect related virus and other aquatic animal virus. The detection sensitivity of HRCA is as low as 10^1 copy which is 100-fold higher than that of conventional PCR. All the detections of the infected soft-shell turtles with or yet without evident symptoms at early stage of infection showed positive results. **[Conclusion]** The detection system of HRCA for STIV was successfully established. It is sensitive, specific, rapid and simple. It can be used for early diagnosis with good prospects for generalizing in the turtle culture.

Keywords: STIV, HRCA, Detection

中华鳖虹彩病毒(Soft-shelled turtle iridovirus, STIV)是虹彩病毒蛙病毒属的成员,是危害中华鳖的重要病原之一,由陈在贤等^[1]首次从患红脖子病甲鱼体内分离并报道后引起了广泛的关注,该病毒感染动物初期并无异样,若未及时诊断并进行防护和处理,则容易暴发且难以控制。因此研发高效、超灵敏和高特异的中华鳖虹彩病毒检测技术,对养殖业者和进出口检验检疫工作人员而言非常重要。目前针对该病毒的检测方法主要有 PCR^[2]、巢式 PCR^[3]、双抗夹心 ELISA 检测^[4]以及间接免疫荧光^[5]等,李惠芳等还利用实时荧光 PCR 对包括 STIV 在内的虹彩病毒蛙病毒属病

毒进行了检测^[6],但这些方法都存在一定问题,如 PCR 和间接免疫荧光灵敏度偏低;巢式 PCR 灵敏度虽有所提高,但存在着进行第二次 PCR 扩增引起交叉污染几率大的问题;双抗夹心 ELISA 检测方法虽然灵敏度也很高,但是抗原制备的好坏直接影响检测结果的特异性,同时样品中的杂蛋白容易造成一定的假阳性结果;而实时荧光 PCR 则检测成本相对较高。上述检测方法都需要特定的仪器包括 PCR 仪、酶标仪等。

滚环扩增技术(Rolling circle amplification, RCA)是新近发展起来的一种恒温核酸扩增方法,凭借其高特异性、高灵敏度和易操作性(不需要热

循环仪等特殊仪器)在近几年中逐渐引起人们的注意,并越来越多地用于基础研究和实际检测中^[7]。RCA 反应分为锁式探针(Padlock probe)的连接和连接后扩增两部分。锁式探针的 5'端和 3'端特异性序列部分通过同靶序列上的互补区域结合,从而在连接酶的作用下连接成环。成环后的锁式探针在一个引物和合适的 DNA 聚合酶存在时恒温下进行滚环复制、扩增。锁式探针的两端与靶序列特异性互补,当有错配存在时,探针的连接反应就无法完成,因此确保了检测中的高特异性^[8-9]。1998 年, Lizardi 等^[10]在线性滚环扩增技术的基础,发明了超分支滚环扩增技术(Hyperbranched rolling circle amplification, HRCA),也有文献中称之为级联/瀑布滚环扩增(Cascade rolling circle amplification, CRCA)或网状分支扩增(Ramification amplification, RAM)。HRCA 是在 RCA 的基础上增加了一个序列同锁式探针中部分序列相同的引物,不但具有 RCA 的高序列特异性和简单易操作性,而且在两个引物存在下产物以超分支形式高效扩增,灵敏度极高,可以在 1 h 内对靶序列进行 10^{12} 倍的扩增,能够检测到单分子水平^[11-12]。HRCA 的应用广泛,可以用于单核苷酸多态性研究^[13-14]、细胞原位检测^[15]、DNA 芯片检测^[16-17]和免疫芯片检测^[18]等方面,此外,HRCA 还被运用于病原微生物检测,如鼻咽癌 EB 病毒^[19]、产志贺样毒素大肠埃希菌^[20]、乙型肝炎病毒 cccDNA^[21]以及植物病害病原微生物等的检测^[22-24]。

本研究旨在依据中华鳖虹彩病毒特异的基因序列,设计特异的锁式探针及其扩增引物,优化 HRCA 条件,建立特异、准确的中华鳖虹彩病毒超分支滚环扩增检测技术体系,并对其特异性、灵敏度和稳定性进行了研究,为中华鳖病毒病害的动态监测与控制提供又一新的便捷分子检测技术。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 DNA: STIV DNA 由深圳市出入境检验检疫局动植物中心刘荭博士馈赠。

1.1.2 主要试剂: *Bst* DNA 聚合酶大片段(含 10×缓冲液)购自 New England Biolabs 公司; dNTPs、*rTaq* DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase (含 10×缓冲液)、GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus 购自 TaKaRa 公司;锁式探针和通用引物 CF1/CF2 由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2 锁式探针与引物的设计

从 GenBank 中选取一段中华鳖虹彩病毒独有的 MCP 基因序列(登录号为 EU627010),依据锁式探针的设计原则采用 Primer Premier 5 设计锁式探针。探针的 5'端和 3'端各有 20 个碱基在靶 DNA 上紧邻并完全互补。锁式探针中的连接段部分不影响对靶位点检测的特异性,我们从与 STIV 序列同源性很低的质粒载体 pNAK1 中选取 3 779-3 692 nt 段序列,适当修改后作为锁式探针的连接段部分。锁式探针的通用引物为 CF1 和 CF2。

STIV 的 MCP 基因特异性 PCR 引物为 STIV-F/STIV-R (扩增序列为 926 bp)。各序列详见表 1。

1.3 标准品制备

对中华鳖虹彩病毒 MCP 基因片段进行 PCR 扩增,反应体系为 25 μ L,含 Tris-HCl (pH 8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, dNTPs 0.8 mmol/L, 引物 STIV-F 0.2 μ mol/L, 引物 STIV-R 0.2 μ mol/L, STIV DNA 1.0 μ L, *rTaq* DNA 聚合酶 5 U/ μ L;反应条件为: 94 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}C$ 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,预期大小的扩增条带用 QIAquick Gel Extraction 纯化回收。回收产物用 NanoDrop 定量后,稀释成 10^{10} 拷贝/ μ L 即为标准品。

表 1 引物及序列探针
Table 1 Primer and probe sequence

引物序列 Primer sequence (5'→3')	大小 Size (bp)	引物名称 Primer name
TTTGTCAAGGAGCACTACCC	20	STIV-F
ACGGGATCTACCGCAAGG	18	STIV-R
CTGCGTCACTCCCGTCGTGGtgactgctgaatccgttagccagcagccgcctcctattatcacttattcaggc gtagcaccagTCCGTCGGCTCCAATTACAC	105	Padlock probe
CTGGTGCTACGCCTGAATAAGTGA	24	CF1
GCTGAATCCGTTAGCCAGCAG	21	CF2

1.4 HRCA 体系的建立及优化

1.4.1 锁式探针的连接反应: 锁式探针的环化连接反应在 10 μ L 体系中完成: 锁式探针 1 μ L, 10 \times T4 DNA Ligase Buffer 1 μ L, 350 U/ μ L T4 DNA Ligase 0.2 μ L, DNA 模板 2 μ L, 无菌双蒸水 6.8 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后迅速置于冰上, 2 min 后加 T4 DNA Ligase, 16 $^{\circ}$ C 60 min (连接时间优化后再做调整), 最后 65 $^{\circ}$ C 10 min 终止连接反应, 连接反应液待用。反应条件的优化主要包括锁式探针的最适浓度和反应时间的选择。

1.4.2 HRCA 反应: HRCA 反应体积 25 μ L: 10 μ mol/L CF1 1 μ L, 10 μ mol/L CF2 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 10 \times *Bst* DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μ L, 8 U/ μ L *Bst* DNA 聚合酶 0.5 μ L, 连接反应产物 2 μ L, 双蒸水 14 μ L, 61 $^{\circ}$ C 1 h (反应时间优化后再做调整), 80 $^{\circ}$ C 20 min 终止反应。反应结束后取 5 μ L 于 2.0%的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色, 紫外凝胶成像系统照相分析。滚环扩增的优化条件主要为反应时间的确定。

1.5 HRCA 体系的性能检测

1.5.1 锁式探针特异性检测: 以 STIV 基因组 DNA 作为阳性对照, 另取 3 种不同相关度的水产病毒进行本研究的特异性验证, 即对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)、新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus,

SGIV)和梭子蟹呼肠孤病毒, 其中双蒸水作为空白对照。扩增产物分别通过琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 灵敏度检测: 取制备好的标准品稀释到 10^0 – 10^5 拷贝/ μ L 分别作为模板。按照已确定的优化体系及条件进行 HRCA 反应和常规 PCR 检测, 以确定并比较滚环扩增检测体系的检测灵敏度。

1.6 组织样品 HRCA 检测

取健康甲鱼、感染病毒显症和感染未显症甲鱼组织分别提取 DNA 作为模板, 双蒸水作为空白对照, 按照已优化的体系及条件进行 HRCA 检测。

2 结果

2.1 HRCA 体系的建立及优化

2.1.1 最适锁式探针浓度的确定: 以标准品(10^{10} 拷贝/ μ L)为模板, 按照 1.4.1 所述的锁式探针连接反应体系和条件, 其中设置 6 个磷酸化锁式探针浓度 (10 μ mol/L、1 μ mol/L、100 nmol/L、10 nmol/L、1 nmol/L、100 pmol/L)进行连接反应, 反应结束后以 1.4.2 中所述体系进行 HRCA 反应。结果显示, 锁式探针浓度为 10 nmol/L 时, HRCA 反应产物电泳结果条带清晰可辨(图 1)。

2.1.2 锁式探针连接时间的确定: 按照 1.4.1 所述的锁式探针连接反应体系和条件, 进行连接反应以确定最优连接时间, 其中锁式探针的浓度为 10 nmol/L, 并设置 5 个连接反应时间(10、20、30、40、60 min)。反应结束后, 以 1.4.2 中所述体系进

行 HRCA 反应。结果显示, 连接时间超过 20 min 时, HRCA 反应产物电泳结果条带清晰可辨(图 2)。

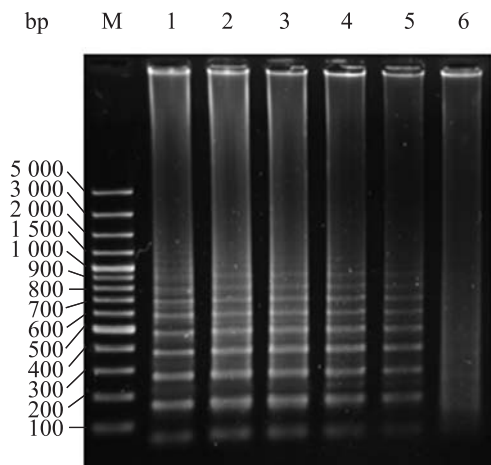


图 1 最适锁式探针浓度的确定

Fig. 1 The optimal concentration of the padlock probe

注: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1: 10 $\mu\text{mol/L}$; 2: 1 $\mu\text{mol/L}$; 3: 100 nmol/L; 4: 10 nmol/L; 5: 1 nmol/L; 6: 100 pmol/L; HRCA 反应 1 h.

Note: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1: 10 $\mu\text{mol/L}$; 2: 1 $\mu\text{mol/L}$; 3: 100 nmol/L; 4: 10 nmol/L; 5: 1 nmol/L; 6: 100 pmol/L; HRCA for 1 h.

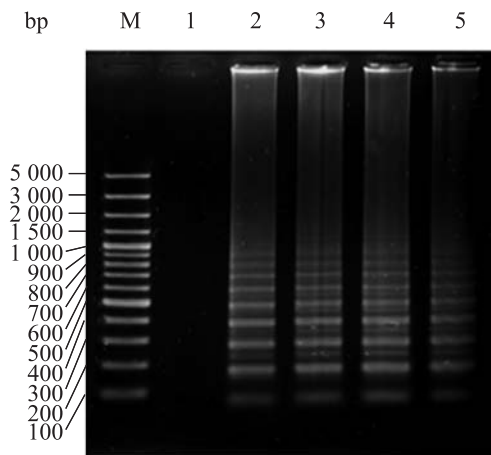


图 2 锁式探针最适连接时间的确定

Fig. 2 The optimal ligation time of the padlock probe

注: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1: 10 min; 2: 20 min; 3: 30 min; 4: 40 min; 5: 60 min; HRCA 反应 1 h.

Note: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1: 10 min; 2: 20 min; 3: 30 min; 4: 40 min; 5: 60 min; HRCA for 1 h.

2.1.3 HRCA 反应时间的确定: 按照 1.4.1 配制连接反应体系, 其中锁式探针浓度为 10 nmol/L, 连接时间 20 min, 按照 1.4.2 中所述的反应体系配制 HRCA 反应液。在 61 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 设置 6 个反应时间(10、20、30、40、50、60 min)进行 HRCA 反应。结果显示, 反应 20 min 后可以观察到清晰条带(图 3)。因此, HRCA 的最优反应时间为 20 min。

2.2 HRCA 体系的性能检测

2.2.1 特异性验证: 对于所测试的 4 种病毒, HRCA 检测体系能够特异性地检出 STIV, 而其余 3 种病毒检测结果均为阴性。结果表明本实验建立的滚环扩增体系是特异的, 适合于中华鳖虹彩病毒的检测(图 4)。

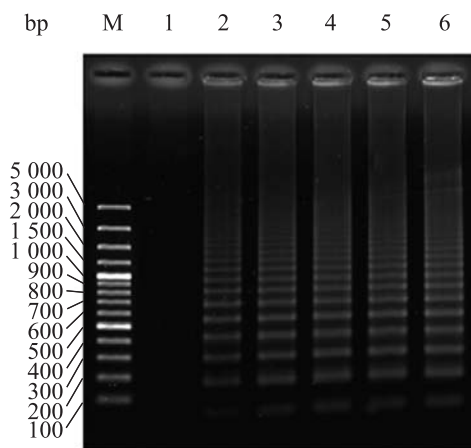


图 3 HRCA 反应条件的优化

Fig. 3 The optimization of reaction conditions of HRCA

注: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1、2、3、4、5、6 泳道的 HRCA 反应时间分别为 10、20、30、40、50、60 min; 各 HRCA 反应所用的连接产物为模板(10^{10} 拷贝/ μL)与锁式探针(10 nmol/L)连接 20 min 获得。

Note: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1, 2, 3, 4, 5, 6: The time of the HRCA 10, 20, 30, 40, 50, 60 min; The template for the HRCA is obtained from the ligation of template (10^{10} copies/ μL) and padlock probe (10 nmol/L) for 20 min.

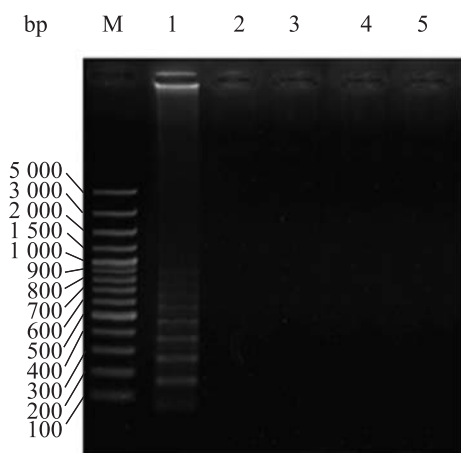


图4 HRCA 法检测 STIV 的特异性验证

Fig. 4 The specificity of HRCA

注: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1: 中华鳖虹彩病毒; 2: 对虾白斑综合症病毒; 3: 新加坡石斑鱼虹彩病毒; 4: 梭子蟹呼肠孤病毒; 5: 无模板。

Note: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1: Soft-shelled turtle iridovirus; 2: Whit spot syndrome virus; 3: Singapore grouper iridovirus; 4: Portunustrituberculatus reovirus; 5: Blank.

2.2.2 灵敏度验证: 将制备好的标准品按照 10 倍梯度进行稀释, 分别进行滚环扩增检测和常规 PCR 检测。检测结果表明, HRCA 法所能检测到

的最低模板量接近 10^1 拷贝, 这与已报道的结果相符^[25], 而常规 PCR 的检测下限为 10^3 拷贝。因此, 由灵敏度实验得出, HRCA 法比常规 PCR 法具有更高的灵敏度(图 5)。

2.2.3 组织样品检测: 对分别从正常甲鱼、显症和未显症感染甲鱼组织中提取的 DNA 样品进行了 HRCA 检测, 显症和未显症感染甲鱼组织检测结果均为阳性, 正常甲鱼组织检测结果为阴性(图 6), 结果表明, HRCA 能够从感染病毒甲鱼组织中检测出 STIV, 未显症甲鱼组织的阳性检测结果表明, 该方法可以用来进行 STIV 早期感染的检测。

3 讨论

近年来, HRCA 作为一种新型的核酸扩增技术已成功应用于多种人、畜、禽和植物病原的检测, 但在水产动物病原检测中, 目前只有笔者所在研究团队对传染性肾脾坏死病毒进行过 HRCA 检测的研究^[26]。

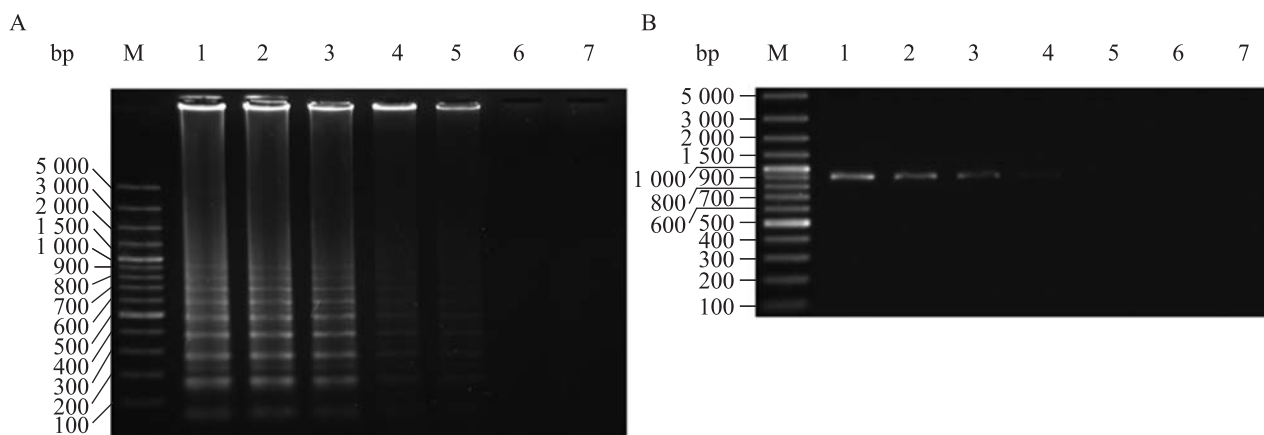


图5 STIV 的灵敏度验证

Fig. 5 The sensitivity of HRCA

注: A: HRCA 法检测 SITV 的灵敏度验证。M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1、2、3、4、5、6 的模板浓度(拷贝/ μ L)分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 ; 7: 双蒸水作空白对照。B: 常规 PCR 法检测 STIV 的灵敏度验证。M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1、2、3、4、5、6 的模板浓度(拷贝/ μ L)分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 ; 7: 双蒸水作空白对照。

Note: A: The sensitivity of HRCA. M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1, 2, 3, 4, 5, 6: The template concentrations (copies/ μ L): 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 ; 7: Double distilled water as template. B: The sensitivity of PCR. M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1, 2, 3, 4, 5, 6: The template concentrations (copies/ μ L): 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 ; 7: Double distilled water as template.

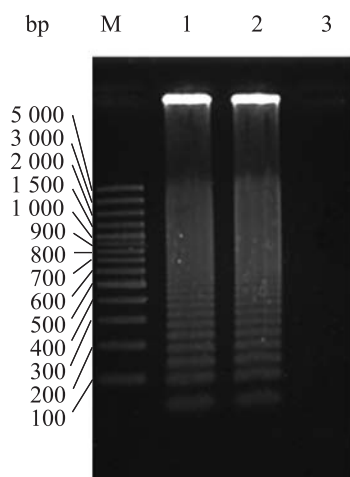


图 6 组织样品的 HRCA 检测

Fig. 6 The HRCA of samples

注: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1: 显症甲鱼组织 DNA; 2: 未显症甲鱼组织 DNA; 3: 正常甲鱼组织 DNA.

Note: M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus; 1: DNA sample of the soft-shelled turtle with obvious symptom; 2: DNA sample of the soft-shelled turtle without obvious symptom; 3: DNA sample of healthy soft-shelled turtle.

快速准确的检测方法是病害监测与控制的技术保证。在本研究中, 我们根据 HRCA 中锁式探针的特点设计了锁式探针 5' 和 3' 端的检测序列, 使之与中华鳖虹彩病毒特异的基因序列完全互补, 毗邻配对。由于 HRCA 反应中用到的 *Bst* DNA 聚合酶在 61 °C–65 °C 反应温度区间反应时结果无明显区别, 因此采用 61 °C 进行 HRCA 反应。为了得到反应的最佳条件, 对影响 HRCA 反应的几个主要参数进行了优化, 优化参数包括锁式探针浓度、连接时间及滚环扩增的反应时间等。并对 HRCA 检测的特异性和灵敏度进行了验证。我们在对 HRCA 的反应体系优化后确定的锁式探针的浓度为 10 nmol/L, 在这个浓度下连接 20 min, 再进行 20 min 的等温扩增即可观察到清晰的结果。传染性肾脾坏死病毒和中华鳖虹彩病毒是分离于鱼类和爬行动物的虹彩病毒, 对传染性肾脾坏死病毒进行 HRCA 的研究结果表明, 在传染性肾脾坏死病毒的 HRCA 反应中需要锁式

探针浓度为 100 nmol/L 连接 20 min 再进行 HRCA 反应 30 min 才可观察到微弱的条带^[26], 这与本研究得出的反应条件不同, 可能是因为在在本研究中本底扩增相对较少。在本研究中, 经过优化后的 HRCA 方法可以检测到接近 10 拷贝/μL 的病毒模板量, 相较于巢式 PCR 的 10² 拷贝/μL 的病毒检测测量有了很大的提高^[3], Liu 等运用环介导等温扩增(LAMP)也只能检测到 20 拷贝/μL 的 STIV^[27], 而本研究团队进行的传染性肾脾坏死病毒的 HRCA 检测则能检测仅 1 拷贝/μL 的病毒, 这表明 HRCA 运用于 STIV 检测的灵敏度可能还有一定提升空间。此外, 我们对 HRCA 的临床检测效果也进行了相应的评价, 通过对感染病毒的显症和未显症甲鱼样品分别进行 HRCA 检测, 结果表明, HRCA 不仅能够很好地应用于甲鱼组织的检测, 而且可以对 STIV 进行早期检测, 对疾病的早期防治具有重要意义。

上述结果表明 HRCA 方法相较于其他中华鳖虹彩病毒检测方法来说具有更高的灵敏度, 特异性也很好, 而且 HRCA 不需要热循环仪等昂贵的器材, 十分有利于在中华鳖养殖中推广使用。但 HRCA 同样存在着一些不足之处, 其中最大的不足之处在于锁式探针的成本问题。目前获得锁式探针的主要方式是直接合成, 其通常长达 100 bp, 合成费用较高。锁式探针中的连接段部分对不同的锁式探针可以完全相同, 并不影响对靶位点检测的特异性, 通常针对不同靶序列设计的探针可以有相同或几乎相同的连接序列, 所以当需要较多的锁式探针时, 可以采用以通用连接序列为模板、特异互补区序列为引物的 PCR 反应来合成探针。目前有报道采用这种方法在实验室中合成探针, 用 *Pfu* 聚合酶实现了 60%–70% 探针产物的正确合成和相应的连接效率^[28], 这将在很大程度上降低成本。锁式探针的成本问题一经解决, 其无与伦比的优越性就显得更加诱人了。

此次研究成功地建立了用于中华鳖虹彩病毒检测的 HRCA 体系,为中华鳖虹彩病毒的早期诊断提供了一种新型的特异、可靠、快速的检测技术。

致谢:衷心感谢深圳市出入境检验检疫局动植物中心刘荭博士为我们提供了 STIV DNA。

参 考 文 献

- [1] Chen ZX, Zhen JC, Jiang YL. A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle[J]. *Virus Research*, 1999, 63(1/2): 147–151.
- [2] 范万红, 刘荭, 吕建强, 等. 蛙病毒属 PCR 检测方法的建立及其在甲鱼“红脖子”病病原鉴定中的应用[J]. *检验检疫科学*, 2007(1): 6–9.
- [3] 张旻, 林祥梅, 江育林. 蛙虹彩病毒巢式 PCR 检测方法的建立[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(3): 661–666.
- [4] Zhang M, Yang JX, Lin XM, et al. A double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of soft-shelled turtle iridovirus antigens [J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 167(2): 193–198.
- [5] 朱春华. 中华鳖虹彩病毒单克隆抗体的制备、特性分析及应用研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2008.
- [6] 李惠芳, 田飞焱, 吕建强, 等. 虹彩病毒蛙病毒属病毒实时荧光PCR检测方法的建立[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 172–176.
- [7] Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, et al. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection[J]. *Science*, 1994, 265(5181): 2085–2088.
- [8] Szemes M, Bonants P, Weerd MD, et al. Diagnostic application of padlock probes-multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(8): e70.
- [9] Thomas DC, Nardone GA, Randall SK. Amplification of padlock probes for DNA diagnostics by cascade rolling circle amplification or the polymerase chain reaction[J]. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 1999, 123(12): 1170–1176.
- [10] Lizardi PM, Huang XH, Zhu ZR, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification[J]. *Nature Genetics*, 1998, 19(3): 225–232.
- [11] Zhang DY, Zhang W, Li X, et al. Detection of rare DNA targets by isothermal ramification amplification[J]. *Gene*, 2001, 274(1/2): 209–216.
- [12] Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification[J]. *Genome Research*, 2001, 11(6): 1095–1099.
- [13] Pickering J, Bamford A, Godbole V, et al. Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(12): e60.
- [14] Cheng YQ, Li ZP, Zhang X, et al. Homogeneous and label-free fluorescence detection of single-nucleotide polymorphism using target-primed branched rolling circle amplification[J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 378(2): 123–126.
- [15] Christian AT, Pattee MS, Attix CM, et al. Detection of DNA point mutations and mRNA expression levels by rolling circle amplification in individual cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(25): 14238–14243.
- [16] Nallur G, Luo CH, Fang LH, et al. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(23): e118.
- [17] Prins TW, Dijk JP, Beenen HG, et al. Optimised padlock probe ligation and microarray detection of multiple (non-authorised) GMOs in a single reaction[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 584.
- [18] Zhou HP, Bouwman K, Schotanus M, et al. Two-color, rolling-circle amplification on antibody microarrays for sensitive, multiplexed serum-protein measurements[J]. *Genome Biology*,

- 2004, 5(4): R28.
- [19] 张福明, 李凡. 分枝扩增法检测鼻咽癌患者外周血 EB 病毒基因[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2004, 30(1): 105-107.
- [20] 赵春燕, 李凡. 网状分枝扩增技术检测产志贺样毒素大肠埃希菌[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(7): 460-463.
- [21] 任晓强, 苏何玲, 邹正升, 等. 滚环扩增在乙型肝炎病毒 cccDNA 检测中的应用[J]. 解放军医学杂志, 2009, 43(6): 657-678.
- [22] 黄冠军, 殷幼平, 张仑, 等. 柑桔溃疡病菌滚环扩增检测体系的建立[J]. 微生物学报, 2008, 48(3): 375-379.
- [23] 余玲玲, 钱亚娟, 周雪平. 用滚环扩增技术检测双生病毒[J]. 植物病理学报, 2008, 38(6): 570-575.
- [24] 蔡俊, 殷幼平, 葛建军, 等. 超分支滚环扩增法检测小麦矮腥黑穗菌[J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3493-3500.
- [25] Wang B, Potter SJ, Lin YG, et al. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(5): 2339-2344.
- [26] 孔铖将, 史雨红, 黎昊雁, 等. 超分支滚环扩增法检测传染性脾肾坏死病毒[J]. 水产科学, 2011, 30(9): 575-579.
- [27] Liu ZX, Liu H, Xie XY, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of soft-shelled turtle iridovirus[J]. Journal of Virological Methods, 2011, 173(2): 328-333.
- [28] Antson DO, Isaksson A, Landegren U, et al. PCR-generated padlock probes detect single nucleotide variation in genomic DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e58.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 SE 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。