

仇汝龙, 阮智杨, 胡 波, 等. 4 种重要外来病毒高通量液相芯片检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(13): 51–55.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.13.009

4 种重要外来病毒高通量液相芯片检测方法的建立

仇汝龙, 阮智杨, 胡 波, 魏后军, 范志宇, 宋艳华, 陈萌萌, 徐为中, 王 芳

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:为建立小反刍兽疫病毒(PPRV)、西尼罗病毒(WNV)、裂谷热病毒(RVSV)和南非型口蹄疫病毒(SAT FMDV)的高通量液相芯片检测方法,根据 GenBank 上公布的 PPRV 的 N 蛋白基因序列、WNV 的 E 蛋白基因序列、RVSV 的 S 片段基因序列和 FMDV 的 5'UTR 区基因序列,并基于各基因保守区设计相应的引物和探针。通过对多重 PCR 的上游、下游引物比例、杂交温度、杂交时间进行条件优化,并验证检测方法的特异性和敏感性。敏感性试验显示,该方法对于 PPRV、WNV、RVSV 以及 FMDV 4 种病毒最低检出量分别为 5.78×10^3 、 2.15×10^3 、 2.98×10^5 、 9.54×10^4 copies/ μ L。本研究建立的高通量液相芯片检测方法能够同时快速地检测 4 种外来病毒,具有良好的特异性、敏感性和稳定性,对于流行病学调查和防范外来动物疫病具有重要的意义。

关键词:检测方法;液相芯片;基因序列;条件优化;流行病学

中图分类号:S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)13-0051-05

小反刍兽疫病毒(PPRV)、西尼罗病毒(WNV)、裂谷热病毒(RVSV)和南非型口蹄疫病毒(SAT FMDV)是我国明确指出要重点防范的外来动物疫病病毒。小反刍兽疫(pestes des petits ruminants,简称 PPR)是由 PPRV 感染而引起的一种高度接触性传染病,作为外来疾病,它最早出现在中国西藏地区,并由西部向东部扩散^[1-2];西尼罗热(west Nile fever,简称 WNF)是由 WNV 引起的一种人兽共患传染病,该病在我国周边国家俄罗斯、印度、巴基斯坦等国均有存在或流行,且由于其媒介昆虫众多、自然宿主活动范围广泛,不排除随候鸟迁徙传入我国的可能性^[3];裂谷热(rift valley fever,简称 RVF)是由 RVSV 引起的反刍动物和人的一种急性、烈性传染病,该病主要发生在非洲,但随着我国与之贸易往来日益频繁,裂谷热对我国的威胁也越来越大^[4];口蹄疫(foot-and-mouth disease,简称 FMD)是由 FMDV 引起的一种急性、热性、高度接触性人兽共患传染病,常见发病于偶蹄类动物^[5]。FMDV 有 7 个血清型,根据其同源性可将它们分为 2 个群,群 1 包括 A、O、C 和 Asia I 型,群 2 则包括 SAT1、

SAT2 和 SAT3。目前我国流行的为群 1,但随着国际贸易的日益频繁,我国在进口检疫中亦存在 SAT FMDV 入侵的风险。

目前,对这些疾病的诊断主要采用血清学方法与分子生物学方法,然而传统血清学检测方法常涉及活病毒试验,对操作人员极易造成感染,并可能会导致病毒的扩散,因此血清学方法常被非疫区国家限制使用;并且传统的分子生物学检测方法也无法满足边境和出入境口岸的大量样品进行高通量检测的需求。液相芯片技术是一种新型的生物芯片技术,并且拥有高通量、快速和准确率等优势,很快就得到广泛应用,因此满足了本研究快速高通量检测的目的^[6-7]。随着液相芯片技术的普及,国内外已有多种液相芯片方法建立的报道,可以针对多种重要病原微生物的检测^[8]。液相芯片检测方法可以从血液和组织中同时检测多种病原,拥有良好的应用前景^[9-13]。

本研究利用液相芯片技术,通过在 GenBank 检索小反刍兽疫病毒、西尼罗病毒、裂谷热病毒和南非型口蹄疫病毒共 4 种病毒的基因保守区域作为靶标,设计 4 种病毒的多重 PCR 引物序列及相应的探针序列。将特异性探针与微球偶联后,与生物素化 PCR 产物杂交并与链亲和素藻红蛋白结合,经悬浮芯片检测仪来读取中位荧光值(median fluorescence intensity,简称 MFI)。用建立的液相芯片技术同时检测小反刍兽疫病毒、西尼罗病毒、裂谷热病毒和

收稿日期:2021-04-16

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0501800)。

作者简介:仇汝龙(1988—),男,山东济宁人,硕士,助理研究员,主要从事家兔疾病防治与疫苗的研制。E-mail:qr18891@163.com。

通信作者:王 芳,女,新疆伊宁人,博士,研究员,主要从事家兔重要疫病致病机制及防控技术研究。E-mail:rwangfang@126.com。

南非型口蹄疫病毒,通过条件优化后,评价其特异性和灵敏度。

1 材料与方法

1.1 试验材料

包含 PPRV 保守基因序列的质粒由笔者所在实验室构建和保存;包含 RVFV、WNV、FMDV 保守基因的质粒由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;检测样品中家畜样品部分由江苏等地养殖场采集,部分由中国动物卫生与流行病学中心国家外来动物疫病诊断中心提供;野生动物样品由东北林业大学野生动物资源学院提供。

1.2 主要试剂和仪器

RNAiso Plus 购自宝生物工程(大连)有限公司;Blood & Tissue Kits 购自 QIAGEN 公司;PrimeScript™ RT reagent Kit 购自 TaKaRa 公司;EDC (N – (dimethylaminopropyl) – N' – ethylcarbodiimide 购自美国 Pierce 公司;MES (2 [N – Morpholino] ethanesulfonic acid)、Sarkosyl (N – 月桂酰肌氨酸)、5 M TMAC(四甲基氯化铵)、10% SDS 溶液、100 ×

TE Buffer 均购自 Sigma 公司;链霉亲和素 – 藻红蛋白(SA – PE, streptavidin – phycoerythrin)、荧光编码微球购自美国 Bio – Rad 公司。Bio – Plex™ 200 悬浮芯片系统由美国 Bio – Rad 公司生产制造。

1.3 试验时间与地点

试验于 2017 年 11 月 5 日至 2018 年 5 月 30 日在江苏省农业科学院兽医研究所完成,期间使用悬浮芯片检测仪进行的检测在上海柏辰生物科技有限公司完成。

1.4 引物和探针的设计

根据 GenBank 上公布的各病毒的保守区域基因序列,PPRV 的 N 蛋白基因序列(GenBank: KX938427)、WNV 的 E 蛋白基因序列(GenBank: GQ502441)、RVFV 的 S 片段基因序列(GenBank: DQ380153)和 FMDV 南非型 SAT1 5' UTR 区基因序列(GenBank: AY593840),利用 Primer5 设计出了 4 种病原的特异性探针,并在探针上游、下游分别设计特异性引物。分别在特异性探针的 5' 端进行 C₁₂ 臂氨基化[$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{12}$]修饰,引物及探针序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表 1)。

表 1 4 种外来病原引物序列

| 病原 | 引物名称 | 引物序列(5'→3') | 片段大小 |
|------|------------|---|--------|
| PPRV | PPRV – F | CCTCACAGACTGGGACGAAAGAACC | 339 bp |
| | PPRV – R | Biotin – CTCCTCCCTGGTCTCCAGAATCT | |
| | PPRV Probe | $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{12}$ – TCAAAGATCGGCCGAGGCACTCTTC | |
| WNV | WNV – F | GAGCCACTCAGGCAGGGAGATTACG | 496 bp |
| | WNV – R | Biotin – AACACCACAGTGCCGTGACCT | |
| | WNV Probe | $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{12}$ – TGAAGGAACAACCTATGGCGTCTG | |
| RVFV | RVFV – F | CTTCGACCTAAGCTCTACTAGA | 330 bp |
| | RVFV – R | Biotin – ATGCTGGGAAGTGATGAG | |
| | RVFV Probe | $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{12}$ – ATGCTGTAGTTCCAAACTCAGCC | |
| FMDV | FMDV – F | AAGGGGGCGCTAGGCTCTAG | 107 bp |
| | FMDV – R | Biotin – GGTTCTGCCTGCCTAATAGAG | |
| | FMDV Probe | $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{12}$ – TAACGACCGTCCCCGGTTGAAAC | |

1.2 方法

1.2.1 多重 PCR 扩增 将小反刍兽疫病毒、西尼罗病毒、裂谷热病毒和南非型口蹄疫病毒的检测引物混合,引物混合液中的每种上游引物浓度为 1.25 μmol/L,下游引物浓度为 2.5 μmol/L。

以质粒 DNA 为模板,按照以下体系进行 PCR 反应:2 × High Fidelity Master Mix 12.5 μL,引物混合液 1.5 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 10 μL。反应条件:98 ℃ 3 min;98 ℃ 20 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共计 35 循环;72 ℃ 延伸 5 min。4 ℃ 保存。

1.2.2 微球与探针的偶联 选取编码为 36#、55#、

43#和 27#的磁性微球分别与经过 C₁₂ 臂氨基化[$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{12}$]修饰的 PPRV、WNV、RVFV 以及 FMDV 探针进行偶联,将 2 支新鲜 EDC 粉末从 4 ℃ 冰箱中取出于室温静置 30 min。以最高转速涡旋悬浮微球,并超声 30 s,使其完全分散开。取 200 μL 微球加入到 1.5 mL 离心管中,以最高转速离心 2 min,弃去上清,以 22 μL 0.1 mol/L pH 值 4.5 的 MES 重悬微球,彻底涡旋,使微球分散。在重悬的微球中加入 2 μL 对应的探针。取恢复至室温的 EDC 粉末,加入 1 mL ddH₂O 溶解。取 1.25 μL EDC 溶液加入微球中,迅速涡旋混匀。黑暗中室温孵育

30 min,再次制备新鲜 EDC 溶液,取 1.25 μL EDC 溶液加入微球中,迅速涡旋混匀。黑暗中室温孵育 30 min,加入 1 mL 0.02% Tween 20,轻微涡旋混匀,以最高转速离心 2 min,弃去上清,加入 0.1% SDS,重悬沉淀 40 s。以最高转速离心 2 min。弃去上清,用 40 μL TE Buffer(pH 值 8.0)重悬沉淀。涡旋仪上以最高转速涡旋 30 s,用锡纸包裹 EP 管,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下保存。

1.2.3 多重 PCR 产物与偶联核酸探针的微球混合物杂交 将 4 种病毒的阳性 PCR 产物与偶联了微球的探针进行杂交检测(027# - FMDV,036# - PPRV,043# - RVFV,055# - WNV)。配制工作微球混合液,在 660 μL 1.5 \times TMAC 杂交缓冲液中加入约 150 000 个偶联好的微球,加入双蒸水至终体积为 990 μL ,放置在冰上。将 33 μL 工作微球混合液加入反应管中,并加入 2 μL PCR 产物,并用 TE Buffer 补齐至 50 μL ,并以 PCR 阴性作为阴性对照,TE Buffer 作为空白对照。将反应管置于 PCR 仪中孵育杂交,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,52 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。配置新鲜的 SA - PE 工作液,用 1 \times TMAC 按照 100 倍稀释 SA - PE 至工作浓度。将杂交孵育后的样品转移至预热的滤板中,并在磁力洗板机中清洗 2 次。在每孔中加入 100 μL 1 \times TMAC 缓冲液,水平振荡器上重悬磁珠 1 min。加入 25 μL 稀释好的 SA - PE 工作液。52 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 5 min。在 Bio - Plex 悬浮芯片检测仪上读取数据。

1.2.4 杂交条件优化 从上游、下游引物比例、杂交温度和杂交时间 3 个方面对检测条件进行了筛选,从而优化液相芯片杂交的条件。分别选择上游、下游引物 1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5 这 4 个比例分别进行 PCR 反应,确定最佳上游、下游引物比例;根据所设计 4 条探针的 T_m 值,选择 48 ~ 58 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围,并且每隔 2 $^{\circ}\text{C}$ 设置温度梯度,确定最佳杂交温度;分别将杂交温度设定为 5、10、15、20、30 min 对各病毒进行杂交检测,确定最佳杂交时间。

1.2.5 杂交产物的检测及特异性试验 在 Bio - Plex 悬浮芯片检测仪上对样品进行检测并读取数据。根据每孔中中位荧光值(MFI)读数来进行结果判定。当检测时每种微球的检出数 ≥ 50 且空白对照背景中位荧光值小于 300,则表示结果可信。当样品中中位荧光值(Median florescence intensity,简称 MFI) ≥ 300 且与阴性对照的比值(qualitative criteria,简称 QC) ≥ 3 时,可判定结果为阳性,否则

为阴性。

1.2.6 检测方法的灵敏性 将构建的 PPRV 病毒质粒以及合成的各病毒序列,用无菌水进行 10 倍倍比稀释后,以各稀释度作为模板进行多重不对称 PCR 扩增,用所建立的液相芯片检测体系对各组 PCR 产物进行杂交检测,检测其灵敏度。

1.2.7 样品的检测 利用建立的液相芯片检测方法对来自养殖场及边境地区的 106 份样品进行了检测。利用 RNAiso Plus 和 Blood & Tissue Kit 试剂盒分别提取样品的 RNA,并使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit 试剂盒对 RNA 进行反转录。以 4 种 RNA 病毒 PPRV、RVFV、WNV、FMDV 的引物对反转录得到的 cDNA 进行多重不对称 PCR 扩增。将每份样品对应的 PCR 扩增产物等量混合后,用所建立的液相芯片检测体系对其进行杂交检测,并将 PCR 产物进行测序验证。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 检测

用各病毒引物对反转录的 cDNA 或合成的基因序列进行扩增,分别可扩增出 RVFV、FMDV、WNV、PPRV 的大小为 330、107、496、339 bp 的目的片段,片段大小与预期相符,PCR 扩增结果见图 1。

2.2 液相芯片杂交条件的优化

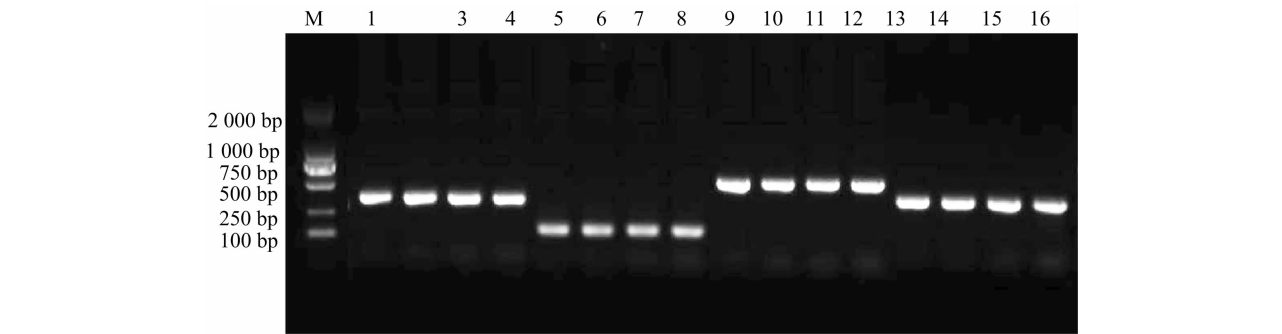
分别对液相芯片检测方法的杂交温度、上下游引物比例和杂交时间进行优化。检测时空白对照的 MFI 值符合杂交检测判定结果的要求,检测结果可信。根据杂交检测信号结果,在上游、下游引物比例筛选结果中,WNV 最佳上游、下游引物比例为 1 : 4,其他病毒最佳引物比例为 1 : 5(图 2 - A);在杂交温度筛选结果中,FMDV 的最佳杂交温度为 56 $^{\circ}\text{C}$,其他均为 54 $^{\circ}\text{C}$ (图 2 - B),确定最佳杂交温度为 54 $^{\circ}\text{C}$;在杂交时间筛选结果中,各病毒最佳杂交时间均为 30 min(图 2 - C)。

2.3 4 种病毒的液相芯片特异性试验

利用优化后的液相芯片检测方法对 RVFV、FMDV、WNV 和 PPRV 病毒阳性质粒进行检测,发现各病毒间均未出现交叉反应,表现出良好的特异性(表 2)。

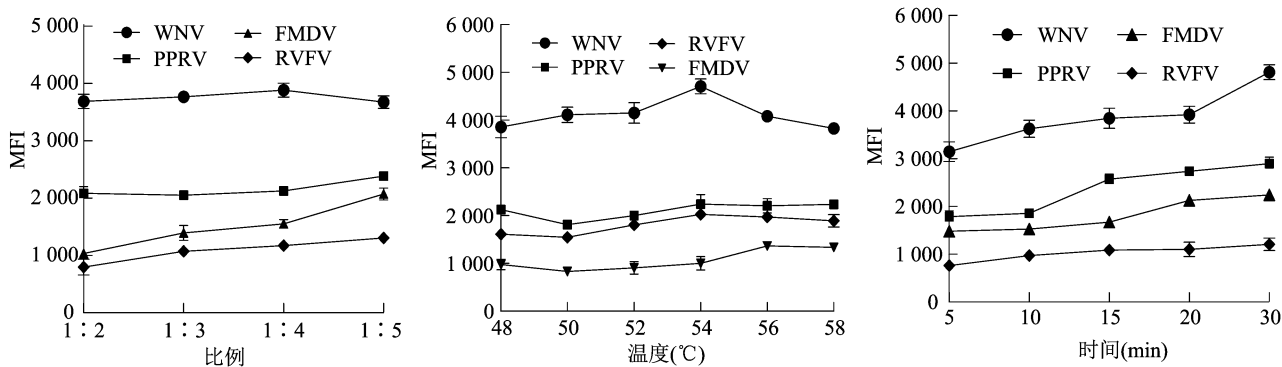
2.4 检测方法的灵敏性

利用优化后的液相芯片检测方法对各稀释度模板进行检测,RVFV、FMDV、WNV 和 PPRV 起始模板浓度分别为 1.08、1.12、1.17、2.15 ng/ μL 。根据液相芯片检测结果判定标准,RVFV、FMDV、WNV、



M—DL 2 000 DNA Marker; 1~4—RVFV; 5~8—FMDV; 9~12—WNV; 13~16—PPRV

图1 病毒的 PCR 扩增结果



A. 上游、下游引物不同比例筛选结果

B. 不同杂交温度筛选结果

C. 不同杂交时间筛选结果

图2 液相芯片杂交条件的优化

表 2 4 种病毒液相芯片特异性试验检测结果

| 病毒 | MFI 读数 | | | |
|-------|------------|------------|-----------|------------|
| | RVFV - 43# | FMDV - 27# | WNV - 55# | PPRV - 36# |
| Blank | 178.5 | 29.0 | 43.5 | 50.8 |
| RVFV | 1 881.3 | 24.0 | 36.5 | 57.7 |
| FMDV | 184.0 | 1 006.5 | 56.0 | 72.0 |
| WNV | 156.0 | 41.0 | 3 570.0 | 86.8 |
| PPRV | 207.0 | 25.0 | 47.0 | 1 761.7 |

PPRV 4 种病毒最低检出稀释度均为 10^{-6} , 灵敏度分别为 1.08×10^{-4} ng/ μ L (2.98×10^5 copies/ μ L)、 1.12×10^{-5} ng/ μ L (9.54×10^4 copies/ μ L)、 1.17×10^{-6} ng/ μ L (2.15×10^3 copies/ μ L)、 2.15×10^{-6} ng/ μ L (5.78×10^3 copies/ μ L) (表 3)。

2.5 临床样品的检测

利用建立的多重液相芯片检测方法对从养殖场及边境地区采集的 106 份样品进行了检测。结果检出 PPRV 阳性样品 15 份, 其余病毒检测结果均呈阴性(表 4)。阳性样本的 PCR 产物通过测序验证均符合。

3 讨论与结论

小反当兽疫(PPR)、西尼罗热(WN)、裂谷热

表 3 4 种病毒液相芯片敏感性试验检测结果

| 稀释度 | MFI 读数 | | | |
|-----------|------------|------------|-----------|------------|
| | RVFV - 43# | FMDV - 27# | WNV - 55# | PPRV - 36# |
| Blank | 296.8 | 204.3 | 209.0 | 183.3 |
| 10^{-1} | 1 340.0 | 1 654.0 | 3 872.4 | 2 446.0 |
| 10^{-2} | 1 297.8 | 1 708.2 | 3 768.1 | 2 574.0 |
| 10^{-3} | 1 302.5 | 1 540.9 | 3 589.0 | 2 129.5 |
| 10^{-4} | 1 037.2 | 1 321.3 | 3 240.5 | 1 372.1 |
| 10^{-5} | 762.8 | 895.0 | 1 578.0 | 938.0 |
| 10^{-6} | 439.2 | 574.0 | 647.6 | 597.3 |
| 10^{-7} | 215.3 | 277.6 | 195.0 | 284.0 |
| 10^{-8} | 209.0 | 159.3 | 143.7 | 106.0 |

表 4 多重液相芯片样品检测结果

| 样品种属 | 来源省份 | 样品总数 | RVFV | FMDV | WNV | PPRV |
|------|------|------|------|------|-----|------|
| 羊 | 黑龙江 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 羊 | 江苏 | 11 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| 野兔 | 黑龙江 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 猪 | 江苏 | 81 | 0 | 0 | 0 | 0 |

(RVF)、外来型口蹄疫(FMD)是 4 种《国家动物疫病防治中长期规划》中明确指出要重点防范的外来动物疫病,近年来,在我国周边国家时有暴发,严重威胁着我国公共卫生安全。这些动物疫病一旦传入,对于野生动物保护以及家畜养殖业都将是毁灭

性的打击。因此,在边境动物及其制品的进出口检疫中,如何快速准确地检测这些外来疫病和防止传入国内显得尤为重要。常规的分子生物学检测方法虽然具有安全、特异、敏感等优点,但是同样不能满足边境高通量检测的需求。因此,急需研发一种满足边境高通量检测需求且能够快速排查、准确诊断外来动物疫病的方法。

目前,病毒的检测主要依靠 PCR 检测技术,主要包括普通 PCR 和荧光定量 PCR。随着检测通量的增加,普通 PCR 和荧光定量 PCR 的灵敏度和准确性均难以保证,特别是多重荧光定量 PCR 的成本大大增加^[14]。液相芯片系统是一种以流式技术为检测平台,不同荧光编码的微球为载体,用于高通量分子检测的新型生物芯片技术。其中以 MagPlex 微球应用最为广泛。它以磁性微球替代了原本的聚苯乙烯微球,省去了操作过程中过滤的步骤,既减少了微球的损失,也使操作更为便捷,并且缩短了检测时间,提高了检测效率。荧光微球编码是通过红色和橙色 2 种荧光染料,每种染料分为 10 个浓度梯度,不同浓度的 2 种荧光染料相互组合可赋予微球载体 100 种颜色,以此来对微球进行编码,对 1 份待检样品中最多 100 个指标进行同步检测。本研究建立的液相芯片检测技术,可实现在 1 个反应内检测 4 种病毒,节省了试验时间,并且提高了检测效率。

本研究建立的液相芯片检测技术具有较好的特异性。本研究建立的液相芯片技术检测小反刍兽疫病毒(PPRV)的灵敏度为 $2.15 \times 10^{-6} \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($5.78 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$)、西尼罗热病毒(WNV)的灵敏度为 $1.17 \times 10^{-6} \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($2.15 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$),与其他已报道的液相芯片检测方法灵敏度基本一致,并且与商业化的荧光定量检测试剂盒的检测灵敏度 $10^2 \sim 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 也相当^[15]。其他 2 种病毒 RVFV 和 FMDV 的检测灵敏度分别为 2.98×10^5 、 $9.54 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L}$,灵敏度相对比较低。在进行敏感性试验时,多重液相芯片检测相较于单重检测出现了本底值出现背景信号升高的现象,在排除可能引起本底值背景升高的原因后,发现此为多重检测中存在的正常现象^[16]。然而由于本底值的升高,会对阳性结果的判定有一定影响,表现为部分探针检测敏感性降低。随着检测靶基因的增多,引物扩增效率,微球的数量以及反应条件等都会影响液相芯片的检测,因此,还需要通过对引物设计和液相芯片的检测体系等条件进行优化,从而提高检测方

法的灵敏性。另外,在对临床样品的检测,使用多重液相芯片检测方法检测到小反刍兽疫病毒阳性的样本 15 份,说明了该方法可用于临床样本的检测。

参考文献:

- [1] 李 飞,李岳洋,张路瑶,等. 我国小反刍兽疫病毒 H 基因序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(7):149-152,158.
- [2] 向 蓉,黄 勉,向 华,等. 小反刍兽疫流行状态及检测方法研究进展[J]. 中国动物检疫,2017,34(10):46-49.
- [3] 邵振国,黄蕊芳,赵 俊,等. 新疆喀什地区西尼罗病毒监测系统评估[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2020(2):212-213.
- [4] 刘建礼,田 茵,王 飞,等. 我国首例输入性裂谷热病毒感染病例的实验室检测[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2016(4):233-236.
- [5] 李 茜,代军飞,丁耀忠,等. 南非 2 型口蹄疫病毒结构蛋白抗原表位研究进展[J]. 动物医学进展,2020,41(6):81-85.
- [6] Bortolin S, Black M, Modi H, et al. Analytical validation of the tag - it high - throughput microsphere - based Universal array genotyping platform: application to the multiplex detection of a panel of thrombophilia - associated single - nucleotide polymorphisms[J]. Clinical Chemistry, 2004, 50(11):2028-2036.
- [7] Houser B. Bio - Rad's Bio - Plex® suspension array system, xMAP technology overview[J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2012, 118(4):192-196.
- [8] 董晓妹. 五种致病性弧菌快速高通量检测方法的建立[D]. 扬州:扬州大学,2019.
- [9] Schmitt M, Bravo I G, Snijders P J, et al. Bead - based multiplex genotyping of human papillomaviruses[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(2):504-512.
- [10] Yan Y, Jy L, Chen Y, et al. A multiplex liquid - chip assay based on Luminex xMAP technology for simultaneous detection of six common respiratory viruses[J]. Oncotarget, 2017, 8(57):96913-96923.
- [11] Rusnak S, Vrzalova J, Sobotova M, et al. The measurement of intraocular biomarkers in various stages of proliferative diabetic retinopathy using multiplex xMAP technology[J]. Journal of Ophthalmology, 2015, 2015:424783.
- [12] Yu C, Yang C, Song S, et al. Development of a sensitive Luminex xMAP - based microsphere immunoassay for specific detection of Iris yellow spot virus[J]. Virology Journal, 2018, 15(1):62.
- [13] Kleymentov D A, Gushchin V A, Gintsburg A L, et al. Impact of aerosol dust on xMAP multiplex detection of different class pathogens[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:2341.
- [14] 郭佳琪,杨晓宇,冯 宇,等. 猪非典型性瘟病毒 RT - PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2):357-362.
- [15] 戴 莹,雷亚克,岳苗苗,等. 应用液相芯片技术检测六种输入性烈性传染病病原的方法研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(11):1303-1307.
- [16] 孙 凯,汪 谦. 液相芯片技术研究应用进展[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(5):639-640.