

付朋飞, 高定焯, 张卓威, 等. G3基因群猪博卡病毒SYBR Green I 荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 山西农业科学, 2025, 53(6): 183-190.

FU P F, GAO D Z, ZHANG Z W, et al. Development and application of SYBR Green I fluorescent quantitative pcr assay for detecting the G3 genogroup of porcine bocavirus[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(6): 183-190.

doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2025.06.22

G3基因群猪博卡病毒SYBR Green I 荧光定量 PCR检测方法的建立及应用

付朋飞¹, 高定焯¹, 张卓威¹, 时逸洋¹, 卢安鑫¹, 林家文¹, 张语嫣¹, 洪 军¹, 李志钢²

(1.河南城建学院生命科学与工程学院, 河南 平顶山 467036; 2.平顶山市畜牧业发展中心, 河南 平顶山 467000)

摘 要:猪博卡病毒(Porcine bocavirus, PBoV)广泛存在于全球猪群中, 其中, G3基因群(PBoV G3)会导致猪群发生腹泻, 已成为威胁养猪业的重要病原。为了建立一种高效的PBoV G3检测方法, 为深入揭示PBoV G3的流行特征及相关疾病防控提供可靠的技术支持, 研究基于GenBank收录的PBoV G3 VP1基因保守区设计特异性引物, 并以重组质粒pCE3 Blunt-VP1为标准模板, 经条件优化构建了检测PBoV G3的SYBR Green I 荧光定量PCR(qPCR)检测方法。方法学评价结果表明, 该体系可实现4.51拷贝/ μ L的最低检测限, 灵敏度较常规PCR提高约100倍; 对PBoV G1、PBoV G2及多种常见猪肠道病毒均无交叉扩增, 特异性良好; 批内和批间变异系数均小于2%, 重复性稳定。临床样品检测结果显示, 在212份腹泻猪粪便中, 该方法的检出率为41.0%(87/212), 显著高于常规PCR的33.5%(71/212), 二者符合率达92.5%。综上所述, 该方法兼具灵敏、特异和稳定的优势, 适合大规模临床样品筛查。

关键词:猪博卡病毒; G3基因群; SYBR Green I; qPCR

中图分类号: S852.65⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2481(2025)06-0183-08

Development and Application of SYBR Green I Fluorescent Quantitative PCR Assay for Detecting the G3 Genogroup of Porcine Bocavirus

FU Pengfei¹, GAO Dingzhuo¹, ZHANG Zhuowei¹, SHI Yiyang¹, HU Anxin¹,

LIN Jiawen¹, ZHANG Yuyan¹, HONG Jun¹, LI Zhigang²

(1.School of Life Sciences and Engineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467036, China;

2.Pingdingshan Animal Husbandry Development Center, Pingdingshan 467000, China)

Abstract: Porcine bocavirus(PBoV) is widely prevalent in swine populations worldwide, among which the G3 genogroup (PBoV G3) has been associated with diarrheal outbreaks and has emerged as an important pathogen threatening the swine industry. To develop an efficient method for PBoV G3 detection, in this study, specific primers targeting the conserved region of the VP1 gene were designed based on sequences available in GenBank, and a recombinant plasmid(pCE3 Blunt-VP1) containing the VP1 gene fragment was constructed as a standard template. Following optimization of reaction conditions, a SYBR Green I-based fluorescent quantitative PCR(qPCR) assay was established to detect PBoV G3. Methodological evaluation demonstrated that the assay achieved a minimum detection limit of 4.51 copies/ μ L, with a sensitivity approximately 100-fold higher than that of conventional PCR. No cross-reactivity was observed with PBoV G1, PBoV G2, or other common porcine enteric viruses, indicating high specificity. Both intra- and inter-assay coefficients of variation were below 2%, confirming good repeatability. Application to clinical samples revealed that the detection rate of PBoV G3 using the established

收稿日期: 2025-07-22

基金项目: 河南城建学院科教融汇项目(K-X2025046)

作者简介: 付朋飞, 讲师, 博士, 主要从事分子病毒学和分子免疫学研究, E-mail: fpfwdm@126.com

通信作者: 洪 军, 教授, 博士, 主要从事微生物与抗菌肽研究, E-mail: hongjun@hncj.edu.cn

李志钢, 高级畜牧师, 主要从事畜牧业技术推广应用, E-mail: 472261294@qq.com

qPCR was 41.0%(87/212) in diarrheic fecal specimens, significantly higher than 33.5%(71/212) obtained by conventional PCR, with a concordance rate of 92.5% between the two methods. In conclusion, this assay combined high sensitivity, strong specificity, and reliable stability, making it suitable for large-scale clinical sample screening. It provided a robust technical tool for elucidating the epidemiological characteristics of PBoV G3 and supporting related disease prevention and control efforts.

Keywords: porcine bocavirus; G3 genogroup; SYBR Green I; qPCR

2009年,瑞典学者首次在猪群中发现猪博卡病毒(Porcine bocavirus, PBoV),该病毒在全球猪群中广泛流行^[1],在中国、越南、巴西、澳大利亚、马来西亚等多个国家被报道^[2-7],多种不同PBoV毒株在患有仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multi-systemic wasting syndrome, PMWS)、呼吸道疾病及腹泻的猪群中均有发现^[8-9]。PBoV属于细小病毒科(Parvoviridae)细小病毒亚科(Parvovirinae)的博卡病毒属(*Bocavirus*)^[10],通常与仔猪腹泻和上呼吸道感染有关,易与猪圆环病毒2型、猪细小病毒等发生共感染,其被认为具有潜在的免疫抑制功能^[8,11-12]。PBoV有3个主要的开放阅读框,编码非结构蛋白NS1、NP1和结构蛋白VP1、VP2^[13-14],其中VP1具有独特的N-末端区域(VP1u),包含1个酶活性的磷脂酶A2基序(PLA2),对于病毒对宿主细胞的特异性、细胞内运输和核定位至关重要^[10]。2012年YANG等^[15]提出了一种基于VP1基因的PBoV分类方法,将PBoV分为3个基因群,即PBoV G1、PBoV G2和PBoV G3。

近期研究显示,我国猪群中PBoV G3的感染率高于PBoV G1和PBoV G2,且PBoV G3多与猪群腹泻紧密相关^[16-17]。孙晓瑜等^[16]对不明原因的仔猪腹泻病例进行病毒宏基因组检测,发现样品中主要检出PBoV,而未发现猪常见的腹泻病毒,提示其可能是腹泻的主要病原。ARYAL等^[17]通过动物攻毒试验发现,饲喂PBoV阳性肠内容物的缺乳仔猪出现明显腹泻,并在小肠组织中检测到病毒和病变,证实了PBoV具有致病性。然而,目前因缺乏PBoV体外分离与传代细胞系,其具体致病机制尚待阐明。更值得关注的是,PBoV的宿主范围已出现扩展,在人类和水貂中均有检出,显示其可能突破物种屏障,给畜牧业生产和公共卫生防控带来新的挑战^[18-19]。因此,急需建立一种高效、灵敏且经济的PBoV G3检测方法,以更好地开展其监测与防控。

LI等^[20]建立了针对PBoV NS1基因的TaqMan qPCR方法,具备准确、灵敏、快速的优点。然而,

早期GenBank数据库中可供参考的PBoV基因序列有限,且该病毒持续变异,遗传多样性丰富,导致现有检测方法普遍存在灵敏性不高或成本较高等局限。鉴于PBoV G3在猪群中广泛传播且对猪群危害严重,目前临床上仍缺乏一种针对该基因群PBoV的高效检测手段。

本研究针对GenBank数据库中最新的48条PBoV G3的VP1基因序列,筛选出同源性较好的一段VP1保守区域并设计引物,建立检测PBoV G3的SYBR Green I qPCR方法,旨在为PBoV G3的定量检测和疫情防控提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒株与样品 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)和猪德尔塔冠状病毒(PDCoV)由平顶山市动物生物医药工程技术研究中心分离保存;PBoV的G1、G2、G3共3个基因群的阳性病料由平顶山市动物生物医药工程技术研究中心鉴定并保存;212份来自河南省不同地区猪场的腹泻猪粪便样品,由平顶山市动物生物医药工程技术研究中心收集并保存。此外,从平顶山市畜牧业发展中心获得5份经鉴定的PBoV G3阳性猪粪便样品和5份阴性粪便样品,用于临床样品检测中准确性和特异性的进一步验证。

1.1.2 主要试剂 FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit (RC311-01)、Ultra-Universal TOPO Cloning Kit (C603-01)、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (P505-d1)、质粒小提试剂盒(DC201-01)、2×Rapid Taq Master Mix (P222-01)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Q711-02)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DH-5α感受态细胞由平顶山市动物生物医药工程技术研究中心制备并保存。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据GenBank中登录的48条PBoV G3的VP1基因序列,利用MEGA 11软件

对 *VP1* 基因片段进行同源性分析。为提高检测的覆盖率与适用性,根据 PBoV G3 *VP1* 基因序列的高度保守区,使用 Primer 6.0 软件设计简并引物 (PBoV-qPCR-F/PBoV-qPCR-R),用于建立 qPCR 方法。引物序列如表 1 所示,引物由通用

生物(安徽)股份有限公司合成。为验证引物的特异性,本研究将引物结合区与 PBoV G1、PBoV G2 和 PBoV G3 各 8 条代表性序列进行比对,并进一步通过 NCBI BLAST 分析,确认所设计引物的特异性。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequence

引物名称	Primer name	引物序列(5'-3')	Primer sequence(5'-3')	扩增大小/bp	Product length
PBoV-qPCR-F		TTATCGACTCKTTGCAGTCTG		167	
PBoV-qPCR-R		CGCAAAGTAYAGGTGACGTT		167	

1.2.2 重组质粒标准品的构建与鉴定 取 0.5 g 保存的呈 PBoV G3 阳性的猪粪便样品,加入 2 mL 无菌 PBS,涡旋仪充分振荡后 12 000 r/min 离心 5 min;取 200 μ L 离心后上清液,按照 FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit 试剂盒说明书提取病毒 DNA,以 PBoV-qPCR-F/PBoV-qPCR-R 为引物,采用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase PCR 扩增 PBoV G3 的 *VP1* 基因部分片段,PCR 产物纯化后连接至 pCE3 Blunt Vector,构建重组质粒标准品 pCE3 Blunt-*VP1*,测定其浓度,计算质粒拷贝。

1.2.3 荧光定量 PCR 条件优化 参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 推荐的扩增条件和反应体系,采用矩阵法对引物 PBoV-qPCR-F/PBoV-qPCR-R(10 μ mol/L)的体积(0.2~1.0 μ L,梯度为 0.2 μ L)和退火温度(58~65 $^{\circ}$ C,梯度为 1 $^{\circ}$ C)进行优化。

1.2.4 标准曲线和熔解曲线的建立 将构建的重组质粒标准品 pCE3 Blunt-*VP1* 按照 10 倍倍比关系进行稀释(10^4 ~ 10^{10}),用优化后的 qPCR 测定反应数据。绘制标准曲线时以 C_q 值为纵坐标、质粒拷贝数的对数值为横坐标。同时生成反应的熔解曲线。

1.2.5 特异性试验 PBoV 的 G1、G2、G3 基因群的阳性猪粪便样品的处理同 1.2.2,使用 FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit 提取 PBoV 的 G1、G2、G3 基因群阳性样品 DNA,提取 PEDV、PDCoV 和 TGEV 总 RNA,反转录成 cDNA。使用本研究建立的 qPCR 方法对 PEDV、PDCoV、TGEV 的 cDNA 和 PBoV G1、PBoV G2、PBoV G3 的 DNA 及 ddH₂O 进行检测,检验 qPCR 特异性。

1.2.6 灵敏性试验 以 10 倍倍比稀释(10^4 ~ 10^{10})

的 pCE3 Blunt-*VP1* 质粒为模板,采用本研究建立的 qPCR,建立实时反应曲线;同时使用本研究已设计合成的 PCR 引物通过常规 PCR 对梯度稀释的重组质粒标准品进行检测。通过对比 qPCR 出现阳性信号的最大稀释倍数和常规 PCR 凝胶电泳出现阳性条带的最大稀释倍数,比较二者的灵敏性,确定该 qPCR 方法的灵敏度。

1.2.7 重复性试验 以 10 倍倍比稀释(10^4 ~ 10^{10})的 pCE3 Blunt-*VP1* 质粒为模板,用优化后的 qPCR 反应体系和反应条件分别做 3 个平行试验,进行批内重复试验;另在 3 个时间对各样品进行 3 个重复检测,为批间重复试验,记录数据。根据计算出的批内变异系数和批间变异系数,评估其重复性。

1.2.8 临床样品的检测 为评估该方法在实际临床样品中的应用效果,采集来自河南省不同地区猪场的 212 份腹泻猪粪便样品,样品处理同 1.2.2,使用 FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit 提取 DNA,利用该 qPCR 方法和常规 PCR 方法分别进行检测,统计检测结果,计算二者的符合率。同时,对来自平顶山市畜牧业发展中心的 5 份已知 PBoV G3 阳性样品和 5 份已知阴性对照样品进行检测,进一步评估该方法的准确性和特异性。

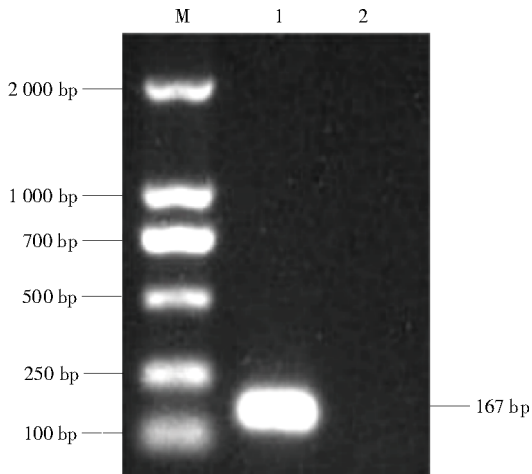
1.3 数据分析

利用 Microsoft Excel 2022 进行数据处理,采用 Adobe Illustrator 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 引物序列比对结果

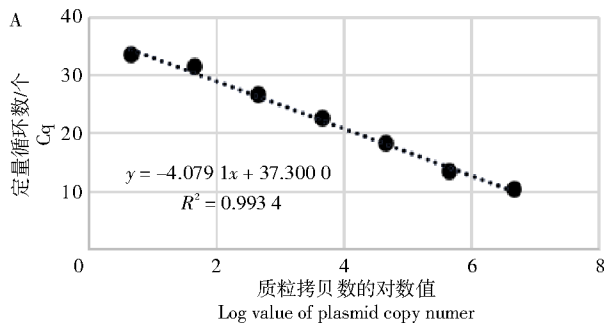
引物序列比对结果显示,PBoV G3 *VP1* 基因整体变异较大,即使在相对保守区段也存在差异。正向引物序列区在所分析的 PBoV G3 序列中较为



M. DL2000 DNA Marker; 1. VP1 基因; 2. 阴性对照
M. DL2000 DNA Marker; 1. VP1 gene; 2. Negative control

图2 重组质粒标准品的PCR鉴定结果

Fig.2 Identification effect of the recombinant plasmid standard by PCR



2.3 荧光定量PCR条件的优化

qPCR反应条件优化结果显示,引物最优用量均为 0.4 μL (浓度 10 $\mu\text{mol/L}$),退火最优温度为 61 $^{\circ}\text{C}$ 。优化后的最佳体系为 20 μL :预混酶 10 μL ,每条引物均 0.4 μL ,ddH₂O 8.2 μL ,DNA 模板 1 μL 。优化后的最佳扩增温度为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,共扩增 40 个循环。

2.4 标准曲线的建立和熔解曲线分析

以不同浓度质粒 pCE3 Blunt-VP1 ($4.51 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^0$ 拷贝/ μL)为模板,进行 qPCR 扩增,根据扩增数据绘制标准曲线(图 3-A),标准曲线方程是 $y = -4.0791x + 37.3000$ ($R = 0.9934$)。说明各梯度质粒浓度与 Ct 值之间呈良好线性关系。熔解曲线的结果显示,该方法的熔解曲线峰较为统一,平均熔解温度约为 86 $^{\circ}\text{C}$,前后波动不超过 1 $^{\circ}\text{C}$ (图 3-B)。

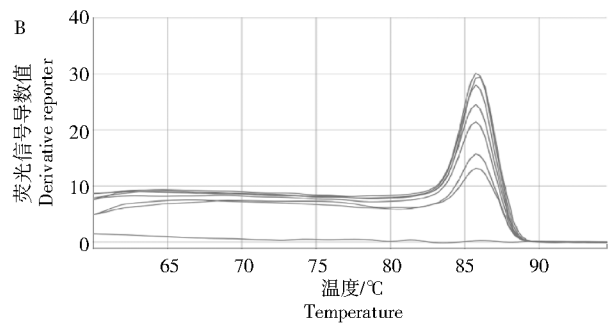


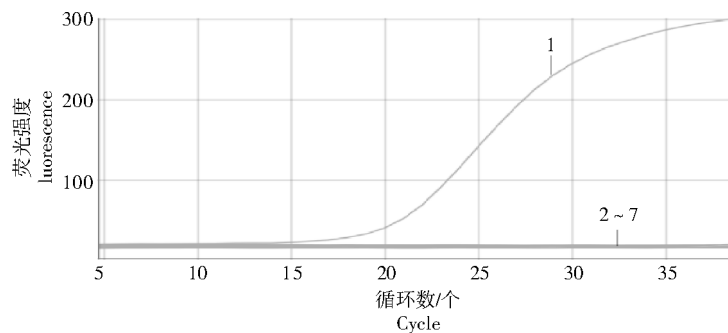
图3 PBoV G3 qPCR的标准曲线(A)和熔解曲线(B)

Fig.3 Standard curve (A) and melt curve (B) of PBoV G3 qPCR

2.5 特异性试验结果

用该 qPCR 方法对 PEDV、PDCoV、TGEV、PBoV G1、PBoV G2、PBoV G3 病毒的 DNA 或 cDNA 进行扩增,并设置 ddH₂O 为阴性对照进行检

测,只有 PBoV G3 扩增出高水平的荧光信号,其他样品均无扩增反应(图 4),该方法显示出较强的特异性。



1~7 分别为 PBoV G3、PEDV、PDCoV、TGEV、PBoV G1、PBoV G2、ddH₂O

1-7 respectively were PBoV G3, PEDV, PDCoV, TGEV, PBoV G1, PBoV G2, ddH₂O

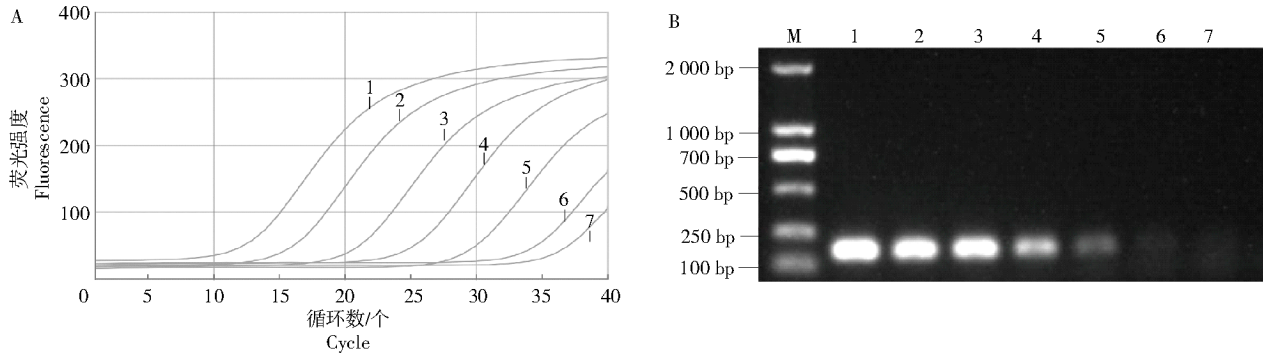
图4 荧光定量PCR特异性试验结果

Fig.4 The specific test of fluorescence qPCR

2.6 灵敏性试验结果

分别用该 qPCR 与常规 PCR 检测方法对浓度梯度为 $4.51 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的重组质粒标准品进行扩增,结果显示,qPCR 最低可检测到

4.51 拷贝/ μL 的 DNA 模板(图 5-A),而常规 PCR 检测下限为 4.51×10^2 拷贝/ μL (图 5-B)。该 qPCR 是常规 PCR 灵敏性的 100 倍,表明其灵敏性较高。



M. DL2000 DNA Marker; 1~7. $4.51 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的重组质粒标准品
M. DL2000 DNA Marker; 1~7. $4.51 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^0$ copies/ μL of recombinant plasmid standards

图 5 qPCR (A) 和常规 PCR (B) 的灵敏性试验

Fig.5 Sensitivity assay of the qPCR (A) and conventional PCR (B)

2.7 重复性试验结果

以 $4.51 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的重组质粒标准品为模板,使用该 qPCR 方法分别进行批内和

批间重复试验,结果显示,批内变异系数在 0.5% 以内,批间的变异系数在 2% 以内(表 2),表明重复性较好。

表 2 qPCR 重复性试验结果

Tab.2 Results of qPCR repeatability test

质粒浓度/(拷贝/ μL) Concentration of standard plasmid	重复次数 Times of repetition	批内重复性试验 Intra-assay repeatability test				批间重复性试验 Inter-assay repeatability test			
		平均数 Mean	变异系数/% CV	平均数 Mean	变异系数/% CV				
4.51×10^6	3	10.61	0.473	10.44	0.953				
4.51×10^5	3	13.15	0.180	13.42	0.738				
4.51×10^4	3	18.25	0.265	18.01	0.476				
4.51×10^3	3	22.70	0.167	22.65	0.680				
4.51×10^2	3	26.80	0.035	26.65	0.323				
4.51×10^1	3	31.83	0.151	31.84	1.067				
4.51×10^0	3	33.56	0.252	33.40	1.185				

2.8 临床应用检测结果

利用建立的 qPCR 和常规 PCR 分别对来自河南省的 212 份临床腹泻猪粪便样品进行检测,结果显示,qPCR 的 PBoV G3 检出率为 41% (87/212),阴性率为 59% (125/212);常规 PCR 的 PBoV G3 检出率为 33.5% (71/212),阴性率为 66.5% (141/212),阴性符合率为 88.7%,阳性符合率为 100%,总符合率为 92.5%。表明该 qPCR 方法更灵敏,可以广泛用于 PBoV G3 的临床检测。此外,为进一步验证检测方法的准确性和特异性,本研究选取了

来自平顶山市畜牧业发展中心的 5 份 PBoV G3 阳性猪粪便样品和 5 份阴性样品进行检测;结果显示,阳性样品均获得正确检出,阴性样品均未检出 PBoV G3,未出现假阳性或假阴性,充分证明该方法在临床样品检测中的可靠性和特异性。

3 结论与讨论

近年来,PBoV 在世界范围内被广泛报道,并与猪群的腹泻、呼吸道疾病及混合感染相关,并出现跨物种传播,对养猪业和公共卫生均构成潜在威

肠^[18,21-24]。已有研究表明,在我国猪群中,PBoV G3的检出率高于PBoV G1和PBoV G2基因群,并可导致猪群发生腹泻^[16-17]。在本研究中,PBoV G3在腹泻样品中的检出率达到41%,明显高于常规PCR的检出率(33.5%),进一步说明其在临床病例中的广泛流行,也凸显了建立高效检测方法的必要性。

方法学性能方面,本研究建立的SYBR Green I qPCR方法展现出较大优势。灵敏度方面,该方法最低检出限为4.51拷贝/ μL ,较常规PCR提高约100倍,达到了目前同类研究的先进水平。特异性方面,本研究通过检测PBoV G1、PBoV G2、PBoV G3及多种常见猪肠道病毒,结果显示,仅PBoV G3扩增出阳性信号,证明了所设计引物的高度特异性。重复性方面,无论批内还是批间试验,变异系数均小于2%,表明该方法稳定可靠。之前国内学者建立了基于TaqMan探针的PBoV G3 qPCR检测方法^[20],其灵敏度达到20拷贝/ μL 水平,展现出良好的检测性能,在相关研究中发挥了重要作用。而本研究构建的基于SYBR Green I染料法的PBoV G3 qPCR检测方法,经过PBoV G3高度保守区引物设计和试验条件优化,在灵敏度方面取得了进一步提升,达到了4.51拷贝/ μL 的高灵敏度水平。相比于TaqMan探针法,本方法没有复杂且造价昂贵的探针,节省了检测成本^[25-27],同时在灵敏度上实现了进一步提升,显示出较高的经济性和可推广性。

值得注意的是,由于PBoV G3 VP1基因整体变异较大,即使在相对保守区段亦存在碱基差异,本研究在正反向引物设计中均引入了简并碱基,以增强检测对不同PBoV G3毒株的覆盖性。通过多序列比对与NCBI BLAST分析,确认了引物仅与PBoV G3序列匹配,进一步保障了引物特异性。此外,在应用该方法进行临床样品检测时,增加了5份已知阳性和5份已知阴性对照样品,结果显示,对照样品与其已知状态完全一致,进一步验证了该方法的准确性和特异性。

从临床和流行病学角度看,本研究显示,PBoV G3在腹泻样品中检出率较高,提示其在猪群腹泻病例中可能发挥重要作用。既往研究显示,PBoV的致病机制可能与VP1u区的PLA2基序相关,该结构既参与病毒DNA的复制,也可能影响病毒的致病性,但由于当前尚缺乏适合的体外分

离与传代体系,其机制仍需进一步研究。本研究建立的高灵敏度检测方法为未来揭示PBoV G3的流行规律和潜在致病作用提供了可靠工具。

综上所述,本研究建立的SYBR Green I qPCR方法在灵敏度、特异性和重复性方面均表现优异,显著提升了PBoV G3的检出效率。该方法不仅适合实验室常规检测,也能应用于临床诊断和大规模流行病学调查,为PBoV G3的持续监测和疫情防控提供了重要的技术支持。

参考文献:

- [1] BLOMSTRÖM A L, BELÁK S, FOSSUM C, et al. Detection of a novel porcine *Boca*-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. *Virus Research*, 2009, 146(1/2):125-129.
- [2] ZHENG L L, CUI J T, QIAO H, et al. Detection and genetic characteristics of porcine bocavirus in central China[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(2):451-460.
- [3] PRPIĆ J, KEROS T, BOŽIKOVIĆ M, et al. Current insights into porcine bocavirus (PBoV) and its impact on the economy and public health[J]. *Veterinary Sciences*, 2024, 11(12):677.
- [4] NGUYEN V G, DANG H A, NGUYEN T T, et al. Polymerase chain reaction-based detection of coinfecting DNA viruses in Vietnamese pigs in 2017 and 2021[J]. *Veterinary World*, 2022, 15(10):2491-2498.
- [5] DA SILVA M S, BUDASZEWSKI R F, WEBER M N, et al. Liver virome of healthy pigs reveals diverse small ssDNA viral genomes[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 81: 104203.
- [6] BHATTA T R, CHAMINGS A, ALEXANDERSEN S. Exploring the cause of diarrhoea and poor growth in 8-11-week-old pigs from an Australian pig herd using metagenomic sequencing[J]. *Viruses*, 2021, 13(8):1608.
- [7] LEE C Y, TAN C Y, TAN Y J, et al. First nearly complete genome sequence of porcine bocavirus strain from Malaysia[J]. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2019, 7(9): 776-781.
- [8] ZHAI S L, YUE C, WEI Z Z, et al. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China[J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(8): 1313-1317.
- [9] ZHANG B, TANG C, YUE H, et al. Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt 7):1603-1611.
- [10] VELEZ M, MIETZSCH M, HSI J, et al. Structural characterization of canine minute virus, rat and porcine bocavirus[J]. *Viruses*, 2023, 15(9):1799.
- [11] ARYAL M. 猪博卡病毒 Group 3 分离株的病毒特性研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2022.
ARYAL M. Study of group 3 porcine bocavirus strain isolated from China[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sci-

- ences, 2022.
- [12] PERFUMO C J, PEREDA A, JONGKAEWWATTANA A, et al. Editorial: emerging swine viruses[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 132.
- [13] 穆乐, 孙锦涵, 张健, 等. 犬博卡病毒结构蛋白 VP1 多克隆抗体的制备及特异性鉴定[J]. *中国动物传染病学报*, 2021, 29(6): 55-61.
MU L, SUN J H, ZHANG J, et al. Preparation and characterization of polyclonal antibodies against bocavirus VP1 protein[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2021, 29(6): 55-61.
- [14] CHENG W X, LI J S, HUANG C P, et al. Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13583.
- [15] YANG W Z, YU J M, LI J S, et al. Genome characterization of a novel porcine bocavirus[J]. *Archives of Virology*, 2012, 157(11): 2125-2132.
- [16] 孙晓瑜, 单虎, 黄娟. 病毒宏基因组学检测猪博卡病毒及其遗传进化分析[J]. *中国兽医杂志*, 2024, 60(4): 50-57.
SUN X Y, SHAN H, HUANG J. Detection of porcine bocavirus by viral macrogenomics and analysis of its genetic evolution[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(4): 50-57.
- [17] ARYAL M, HUANG X, FU Y G, et al. Isolation, pathogenesis, and genetic evolution of a porcine bocavirus PBoV/HB/30/2018 strain in China[J]. *Virology*, 2022, 572: 55-63.
- [18] SAFAMANESH S, AZIMIAN A, SHAKERI A, et al. Detection of porcine bocavirus from a child with acute respiratory tract infection[J]. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2018, 37(12): e338-e339.
- [19] WANG Y, ZHAO J, ZHENG M, et al. Genome sequence of a porcine bocavirus detected in feces of domestic minks in China[J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(45): e01170.
- [20] LI B, XIAO S B, MA J J, et al. Development of a novel *TaqMan*-based real-time PCR assay for the detection of porcine *Boca*-like virus (Pbo-likeV)[J]. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 357.
- [21] ARYAL M, LIU G L. Porcine bocavirus: a 10-year history since its discovery[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(6): 1261-1272.
- [22] 周宇. 猪博卡病毒分子流行病学调查及仔猪致病性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
ZHOU Y. Investigation on molecular epidemiology and study on pathogenicity in piglets of porcine bocavirus (PBoV)[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020.
- [23] 郝飞, 汤德元, 李春燕, 等. 猪博卡病毒流行病学研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(10): 1609-1617.
HAO F, TANG D Y, LI C Y, et al. Research on the epidemiology of porcine bocavirus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(10): 1609-1617.
- [24] 覃绍敏, 王浩, 刘金凤, 等. 广西外观正常猪群中博卡病毒检测及全基因遗传演化分析[J]. *中国动物传染病学报*, 2020, 28(4): 29-38.
QIN S M, WANG H, LIU J F, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine bocavirus in asymptomatic nursery piglets in Guangxi province[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2020, 28(4): 29-38.
- [25] 付钰广, 刘光亮, 弓超, 等. 一种检测 G3 型猪博卡病毒检测试剂盒: CN202310174216.9[P]. 2023-06-23.
FU Y G, LIU G L, GONG C, et al. Detection kit for detecting G3 type porcine bocavirus: CN202310174216.9[P]. 2023-06-23.
- [26] 张明辉, 安伟, 张海强. 致对虾急性肝胰腺坏死病原菌 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(10): 1032-1037.
ZHANG M H, AN W, ZHANG H Q. Development and application of SYBR Green I fluorescent quantitative PCR method for acute hepatopancreatic necrosis disease due to pathogenic *Vibrio*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2023, 45(10): 1032-1037.
- [27] 徐航, 任建伟, 于德涛, 等. 犬瘟热病毒与犬冠状病毒双重 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(4): 379-384.
XU H, REN J W, YU D T, et al. Establishment and preliminary application of dual *TaqMan* fluorescence quantitative RT-PCR for canine distemper virus and canine coronavirus detection[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2023, 45(4): 379-384.