

磁珠快速核酸提取法在南美白对虾病原检测中的应用及其性能评价

徐胜威¹, 葛明峰^{1*}, 卢先东², 刘艳红², 黄一哲², 王雯琼¹, 王雪磊¹, 王建平¹, 柳海¹

(1.宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012; 2.宁波爱基因科技有限公司, 浙江 宁波 315105)

摘要:为实现南美白对虾相关病原核酸快速、便捷提取,并实现原材料国产化,降低成本,建立了一种基于国产磁珠的核酸快速提取方法(以下简称磁珠法)。以携带虾肝肠胞虫的南美白对虾为实验样本,通过微流控芯片对3种磁珠提取的核酸进行测试,并对裂解液中盐酸胍浓度及洗涤液2中乙醇浓度进行了优化。通过优选实验确定:奥润磁珠提取效果优于其他两种磁珠;裂解液中盐酸胍的最佳浓度为 $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$;洗涤液2中乙醇的最佳质量分数为75%。在此基础上,分析评价了优化后的磁珠法核酸提取线性范围、灵敏度、精密度、特异性及抗干扰能力等技术性能。结果显示:稀释 10^4 倍后的低浓度病原核酸仍保持较好的扩增效果,变异系数为2.03%,表明建立的磁珠法具有较宽的检测范围,灵敏度高,特异性和抗干扰能力强。本文建立的磁珠法可实现快捷、通用、高纯度、低成本的南美白对虾主要病原的核酸提取。

关键词:磁珠法;快速;核酸提取;评价

中图分类号: S945.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2023) 03-0010-06

南美白对虾每年因病害造成的经济损失较为严重,据《2022 中国水生动物卫生状况报告》^[1],2021年养殖虾类因疾病造成经济损失高达90亿元,亟需建立南美白对虾主要疾病的快速诊断技术,及时发现病害,阻断疫病蔓延,从而减损增效。

病原检测技术大部分基于目的核酸片段的诊断,因此,有效快速的核酸提取方法尤为重要。目前常见的核酸提取方法为常规沉淀离心法,但该方法操作时间长,裂解不充分,存在交叉污染等风险,继而影响检测结果的准确性,且对仪器和操作要求较高,提取过程中用到的酚、氯仿等有机试剂对操作人员有一定的危害^[2-5]。

随着分子生物学技术的快速发展,近年来,磁性纳米材料在核酸分离中的应用越来越受关注^[6]。磁珠法核酸提取是一项将生物分子技术与纳米材料科学相结合的新型技术,其原理是在外磁场的作用下,通过细胞裂解出来的核酸分子被特异地

吸附到磁性纳米颗粒表面,实现核酸分离纯化^[7]。该方法是核酸提取纯化领域的一项重大突破,能从血液、动植物组织、食品、土壤、粪便、唾液等大多数生物组织样本中分离纯化核酸,并已应用于食品、医疗等领域的病原体快速检测^[8]。磁珠法克服了传统核酸提取法操作繁杂、费时等问题,不需要特殊的分离设备,避免了反复离心而造成的核酸损失,可实现快捷、简便、通用、高纯度的核酸提取。

本研究在国内现有磁珠材料和核酸快捷提取方法基础上,根据磁珠法DNA提取纯化试剂盒检测通则^[9],利用针对南美白对虾病原核酸开发的一种磁珠试剂盒,通过对试剂盒中磁珠种类、裂解液成分和磁珠洗涤条件等进行优化,建立了快速提取核酸的方法,并对优化后磁珠法的线性范围与灵敏度、精密度、特异性及抗干扰能力等进行了分析评价。

收稿日期: 2023-02-06.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 宁波市公益类科技计划(2021S076)。

第一作者: 徐胜威(1983-),男,浙江兰溪人,工程师,主要研究方向:水生动物病害防控。E-mail: 546207546@qq.com

*通信作者: 葛明峰(1988-),男,浙江宁波人,硕士,主要研究方向:水生动物病害防控。E-mail: 910342950@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料

经行标法(SC7232-2020)检测确认携带虾肝肠胞虫(EHP)的南美白对虾采自宁波市南美白对虾养殖场;荧光预混液由宁波爱基因科技有限公司提供;裂解液(管 1): $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍、5%吐温 20、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA;洗涤液 1(管 2): $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris、50%乙醇;洗涤液 2(管 3): 75%乙醇;洗脱液(管 4): TE 溶液;磁珠为硅羟基磁性纳米颗粒,磁珠粒子直径 500 nm,磁珠 1 购自北京百欧泰生物科技有限公司,磁珠 2 购自苏州北科震泽生物技术有限公司,磁珠 3(产品货号: GNT-108)购自上海奥润微纳新材料科技有限公司;其他试剂都为国产分析纯;核酸扩增检测设备:爱基因 MA2000e 微流控核酸检测仪。

1.2 实验方法

1.2.1 磁珠法核酸提取

磁珠法核酸提取流程如图 1 所示,操作前将管 1、管 2、管 3 和管 4 放入 60°C 金属浴中预热。

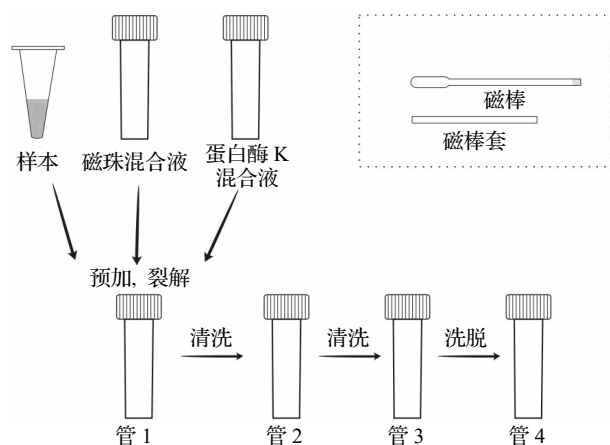


图 1 磁珠法核酸提取流程

裂解: 取 $5 \mu\text{L}$ 磁珠混合液(磁珠和超纯水组成, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 $20 \mu\text{L}$ 蛋白酶 K 混合液($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)加入管 1, 加入 $200 \mu\text{L}$ 准备好的样本(虾苗整虾研磨, 成虾取鳃、肝胰腺、肠管、肌肉等组织研磨, 将样品放入匀浆袋加入适量双蒸水反复挤刮获得匀浆液)到管 1 中, 用磁棒套上下振荡 10 s 后孵育 5 min. 将磁棒插入到磁棒套中, 放入管 1 上下抽打 10 次(10 s), 再静置 1 min.

清洗: 将磁棒插入管 2, 上下快速抽打 30 次,

然后将磁棒放入管 3, 上下快速抽打 30 次。

洗脱: 将磁棒放入管 4, 抽出磁棒留下磁棒套, 上下快速抽打/旋转 20 次, 60°C 孵育 3 min, 然后用磁棒套快速搅动 20 次. 将磁棒插回磁棒套内, 吸取管 4 内所有磁珠, 再取出磁棒, 管 4 内液体可直接用于分子检测。

1.2.2 检测体系和程序

上样体系为 $25 \mu\text{L}$, 其中荧光预混液 $10 \mu\text{L}$, 核酸 $15 \mu\text{L}$. 将上述体系置于 MA2000e 微流控核酸检测仪于 63.5°C 下反应 60 min, 荧光通道设置为 FAM.

1.2.3 磁珠筛选

选择市场上常见的 3 种磁珠: 磁珠 1、磁珠 2、磁珠 3, 按照 1.2.1、1.2.2 的方法分别进行测试评估。

1.2.4 裂解液优化

更改管 1 (裂解液)盐酸胍的浓度分别为 $3.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (裂解液 1)、 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (裂解液 2)、 $4.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (裂解液 3), 按照 1.2.1、1.2.2 的实验过程和方法进行核酸提取和靶基因扩增验证。

1.2.5 磁珠洗涤条件优化

更改管 3 (洗涤液 2)乙醇的质量分数分别为 65% (洗 1 组)、75% (洗 2 组)、85% (洗 3 组)做同步实验, 确认管 3 中最合适的乙醇质量分数。

1.2.6 线性范围与灵敏度评价

将使用优化后磁珠法提取的已知质量浓度为 $143.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品核酸作 10 倍比稀释, 配制一系列浓度的稀释液(稀释倍数: $10^1 \sim 10^6$), 根据扩增曲线确认其灵敏度和线性范围。

1.2.7 精密度评价

按照优化后的磁珠法对携带 EHP 的原组织样本进行多次核酸提取, 通过核酸扩增, 测定变异系数(CV)。

1.2.8 特异性测试

按照优化后的磁珠法对南美白对虾常见的白斑综合征病毒(WSSV)、桃拉综合征病毒(TSV)、传染性皮下和造血组织坏死病毒(IHHNV)、十足目虹彩病毒 1 (DIV1)、偷死野田村病毒(CMVN)、传染性肌坏死病毒(IMNV)、致急性肝胰腺坏死弧菌(*V. AHPND*)、EHP 共 8 种病原样本(由宁波市海洋与渔业研究院提供)分别进行核酸提取, 并用对应的引物进行检测, 根据扩增曲线确认特异性。

1.2.9 抗干扰物测试

在携带 EHP 的南美白对虾样品中添加常见的乙醇、池塘水、饲料等干扰物,干扰物与组织样品的体积比为 1:3,按照优化后的磁珠法提取核酸,检测抗干扰能力。

2 实验结果

2.1 磁珠筛选

使用不同类型的磁珠提取核酸,根据表 1 可知,磁珠 1 平均起峰时间 10.90 min;磁珠 2 平均起峰时间 12.87 min;磁珠 3 平均起峰时间 9.63 min. 故选择磁珠 3 (奥润)作为最佳磁珠。

表 1 磁珠筛选实验数据 min

磁珠	起峰时间				平均起峰时间
磁珠 1	10.90	11.02	10.94	10.94	10.90±0.08
	10.80	10.92	10.75	10.89	
磁珠 2	12.27	12.76	12.20	12.47	12.87±0.49
	13.33	13.48	13.02	13.46	
磁珠 3	9.68	10.06	9.88	9.59	9.63±0.23
	9.38	9.59	9.53	9.30	

2.2 裂解液优化

裂解液成分中盐酸胍的浓度对核酸提取效果影响见表 2,裂解液 1 平均起峰时间 12.42 min;裂解液 2 平均起峰时间 11.84 min;裂解液 3 平均起峰时间 13.79 min. 故选择裂解液 2 (盐酸胍浓度 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)为最适裂解液。

表 2 裂解液优化实验数据 min

裂解液	起峰时间				平均起峰时间
裂解液 1	11.72	11.46	13.16	13.32	12.42±0.83
裂解液 2	10.46	10.60	13.29	13.02	11.84±1.32
裂解液 3	15.38	15.02	12.35	12.42	13.79±1.41

2.3 磁珠洗涤条件优化

洗涤液 2 中乙醇的浓度对核酸提取效果影响较大,由表 3 可知,洗 1 组平均起峰时间 14.20 min;洗 2 组平均起峰时间 9.13 min;洗 3 组平均起峰时间 22.10 min. 故选洗 2 组(乙醇质量分数 75%)作为最优的磁珠洗涤条件。

表 3 洗涤条件优化实验数据 min

洗液体系	起峰时间				平均起峰时间
洗 1 组	14.87	14.68	13.29	13.97	14.20±0.62
洗 2 组	9.27	9.00	9.00	9.25	9.13±0.13
洗 3 组	24.13	22.96	20.14	21.18	22.10±1.55

2.4 线性范围与灵敏度评价

将核酸样本进行 10 倍梯度稀释,经核酸扩增后的效果见表 4,可见在核酸稀释 10^4 倍后还是可以保持很好的扩增效果,证明上述优化的磁珠核酸提取法具有良好的线性范围和灵敏度。

表 4 线性范围和灵敏度测试实验数据 min

样品处理	起峰时间				平均起峰时间
原液	6.71	6.66	6.61	6.59	6.64±0.05
稀释 10^1 倍	7.41	7.30	7.30	7.32	7.33±0.05
稀释 10^2 倍	9.56	8.98	9.21	9.69	9.36±0.28
稀释 10^3 倍	9.86	10.69	11.73	10.26	10.64±0.70
稀释 10^4 倍	16.53	14.32	16.53	15.71	15.77±0.90
稀释 10^5 倍	12.36	40.95	—	48.16	—
稀释 10^6 倍	—	—	—	—	—

注:“—”表示扩增曲线未起峰。

2.5 精密度评价

按照优化后的磁珠法体系,对携带 EHP 的组织样本进行 8 次重复提取核酸,每个提取样本 4 个平行。结果表明,32 个反应平均起峰时间为 5.98 min,标准差为 0.12 min, CV 值为 2.03%,证明其具有良好的稳定性(表 5)。

表 5 精密度测试实验数据 min

样本	起峰时间				平均起峰时间
样本 1	6.22	5.87	6.00	6.06	6.04±0.13
样本 2	5.83	5.85	5.96	6.05	5.92±0.09
样本 3	6.19	5.87	5.97	6.07	6.03±0.12
样本 4	6.22	5.86	6.02	6.04	6.04±0.13
样本 5	5.84	5.84	6.03	6.06	5.94±0.10
样本 6	5.81	5.86	6.00	6.06	5.93±0.10
样本 7	5.80	5.88	6.06	6.07	5.95±0.12
样本 8	5.83	5.92	6.03	6.08	5.97±0.10

2.6 特异性评价

用上述优化磁珠法提取含有 8 种病原的对虾组织核酸, 核酸质量浓度分别为 $103.87\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (EHP)、 $96.49\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (V_{AHPND})、 $201.58\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (IHHNV)、 $220.85\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (WSSV)、 $158.64\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (DIV1)、 $147.32\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (TSV)、 $166.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (CMNV)、 $189.54\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (IMNV), 检测 8 种病原的核酸扩增曲线. 由图 2 可知, 该方法提取的核酸只会引起对应的检测试剂产生特异性扩增峰, 具有良好的特异性.

2.7 抗干扰物测试

在携带 EHP 的南美白对虾样品中添加常见干扰物, 按照优化后的磁珠法提取核酸后进行特异性扩增实验. 由表 6 可知, 在样品中添加常见干扰物后提取核酸, 对之后的检测未产生明显影响.

表 6 干扰物测试实验核酸扩增起峰时间 min

实验组	起峰时间			平均起峰时间
未添加干扰物	5.7	5.8	6.0	5.8 ± 0.12
添加乙醇	5.7	6.0	6.1	5.9 ± 0.17
添加池塘水	6.0	5.9	6.3	6.1 ± 0.17
添加饲料	6.2	6.4	6.5	6.4 ± 0.12

3 讨论

核酸提取是病原检测中关键步骤之一, 影响核酸提取效果的因素很多, 除了初始样本量、提取方法外, 还有提取后加入的溶解核酸溶液量. 因此, 选择一种高效的核酸提取方法对保证核酸检测结果的快速与准确至关重要. 纳米磁珠技术极大地推动了基于磁性微球的核酸自动化提取发展进程, 磁珠法现已逐渐应用于核酸和其他多种生物物质

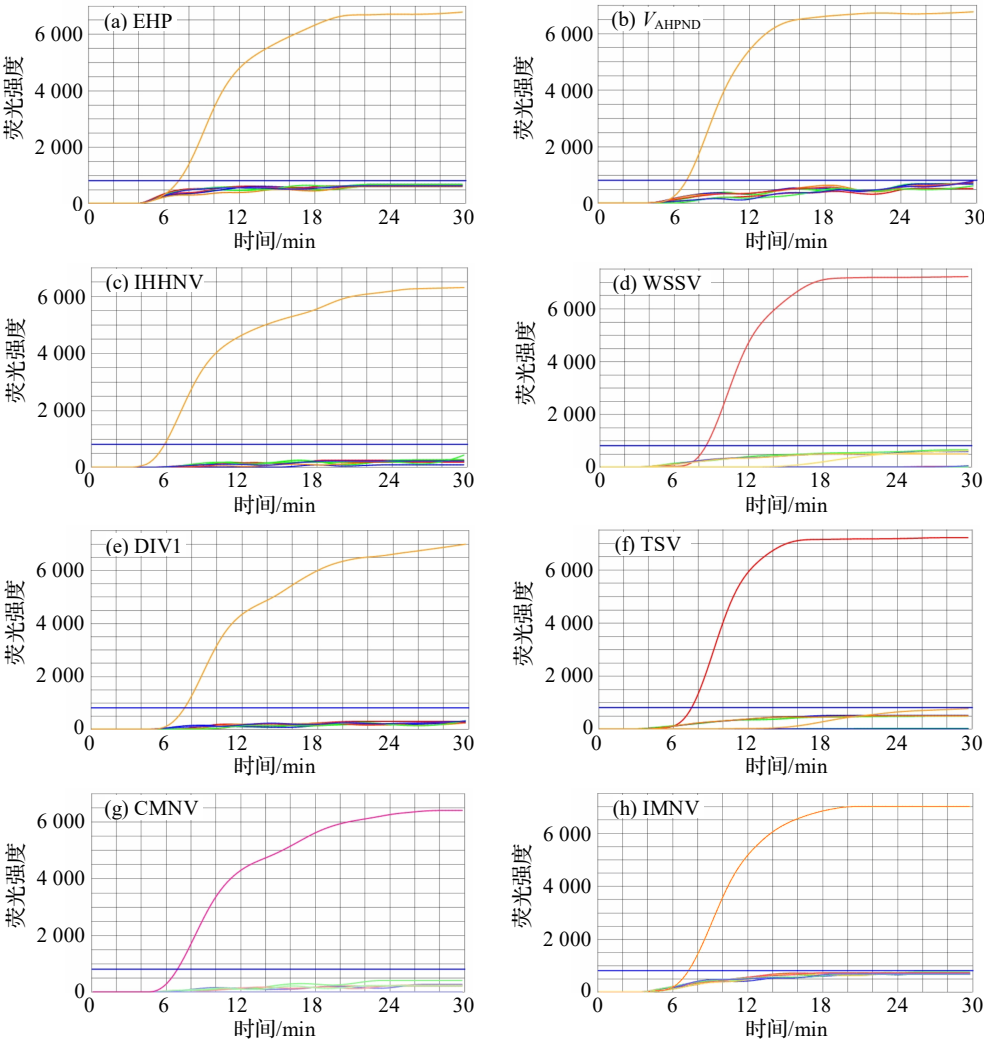


图 2 特异性测试实验结果

的分离与纯化^[10]。在核酸提取中,磁珠种类、添加剂成分及体系组成等都是影响核酸纯化效果的关键因素^[11],提取方法的灵敏度、特异性也直接关系到后续实验的成败^[12]。目前,由于提取试剂成分的限制,运用磁珠法快速提取基因组核酸均针对某一种特定的样本,缺乏广泛适用性^[6]。

本文以携带病原的南美白对虾为实验样本,介绍了磁珠法核酸提取技术的开发。目前市面上所销售的磁珠法试剂盒大多采用国外试剂,而进口试剂价格昂贵,在国内基层很难推广应用^[10,13-14]。通过筛选市面上常见的几种国产磁珠,运用本文方法提取核酸,提纯的核酸通过检测南美白对虾常见病原,证明具有较好的扩增效果。盐酸胍在核酸提取中起到裂解组蛋白的作用,它可使氢键断裂,溶解蛋白质,从而破坏蛋白质二级结构,使蛋白质从核酸上解离下来,核酸分子暴露的磷酸基团与磁珠表面修饰的基团形成氢键,增加DNA的吸附^[6]。许朋等^[6]研究发现,在磁珠法进行小鼠肺组织基因组DNA的提取实验中,当盐酸胍浓度高于 $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随浓度的增加电泳条带也加粗、加亮,当盐酸胍浓度高于 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,DNA提取效率呈现饱和趋势,增加效果不明显,该结论与本研究基本相符,本方法中选择盐酸胍浓度为 $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,核酸提取效果好、效率高。

核酸的提取效率直接影响检测灵敏度,核酸的纯度和质量与扩增效果密切相关^[15]。王军等^[16]实验表明磁珠法提取核酸具有较高的灵敏度,用磁珠法提取新城疫病毒阳性检出率高达100%,而柱式法提取核酸检出率仅为86.36%,同时还指出磁珠法提取的核酸在病原检测中具有较好的重复性,病原检出率100%。本实验提取的核酸(初始质量浓度 $143.57\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,经nano-300微量分光光度计测定)稀释 10^4 倍后仍具有较好的扩增效果,表明该方法检测载量的线性范围良好,具有较好的检测灵敏度,这与毕昊等^[15]使用国产磁珠核酸自动提取系统对人巨细胞病毒DNA检测的性能评价一致。本研究中,对携带EHP的组织样本经过8次重复提取核酸后,32个扩增反应的平均起峰时间仅为5.98 min, CV值为2.03%,证明其具有良好的检测灵敏度、稳定性和可重复性。磁珠法试剂使用特异性纳米磁珠对核酸进行吸附,核酸提取效率较高,

操作过程中可实现磁珠的可视化,防止核酸丢失,因而实验结果准确度较高^[17]。

南美白对虾病原检测中干扰物对核酸提取有较大的影响,主要包括采样中伴随样本的残饵、池塘水以及用于样品固定的乙醇。本实验模拟以上干扰物质,在携带EHP的南美白对虾样本中添加乙醇、池塘水、饲料等干扰物,干扰物与组织样品的体积比为1:3,用优化后的磁珠法提取核酸,扩增曲线表明加入干扰物组与对照组相比没有显著差异,显示本方法提取核酸具有良好的抗干扰能力。郑瑜宏等^[18]研究表明,磁珠法抗干扰能力较强,因为磁珠能够高效吸附核酸,然后通过洗涤等步骤能有效去除样本中的干扰物质,极大地提高了试剂盒的灵敏度,降低了假阴性率。

本研究通过对磁珠法核酸提取过程中磁珠种类、试剂成分及条件优化,找到了一种适用于南美白对虾主要病原检测的核酸快速提取方法,该方法12 min内可完成核酸提取,在南美白对虾主要病原检测上具有较高的灵敏度、可重复性和特异性,且无需大型设备,操作简单,为养殖基层实现自检提供了可靠的技术参考。

参考文献:

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站. 2022中国水生动物卫生状况报告[M]. 北京:中国农业出版社,2022.
- [2] 刘洪波,刘晓雷,罗小铭. 核酸提取方法进展[J]. 现代生物医学进展,2011,11(16):3187-3190.
- [3] 查瑶,王小灵,朱诗艳,等. 煮沸裂解法与磁珠法在HBV DNA荧光定量检测中的核酸提取效果[J]. 浙江预防医学,2015,27(12):1292-1293.
- [4] 卢瑛,刘照关,徐宏,等. 一种快速提取基因组DNA的方法[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(3):69-73.
- [5] 高秋月,景奉香,李海燕,等. 基于磁珠的细菌基因组DNA快速提取方法[J]. 安徽农业科学,2010,38(21):11071-11074.
- [6] 许朋,郑春辉,孙智勇,等. 磁珠法快速提取基因组DNA的实验研究[J]. 生物信息学,2018,16(3):190-195.
- [7] Wang J H, Ali Z, Wang N Y, et al. Simultaneous extraction of DNA and RNA from *Escherichia coli* BL 21 based on silica-coated magnetic nanoparticles [J]. Science China Chemistry, 2015, 58(11):1774-1778.
- [8] 曹飞扬,王娉,赵晓美,等. 常见病原菌基因组DNA快速提取试剂盒研制[J]. 东北农业大学学报,2016,

- 47(6):81-88.
- [9] GB/T 40171—2021. 磁珠法 DNA 提取纯化试剂盒检测通则[S].
- [10] 陆佳飞, 周科隆, 王缦. 磁珠快速提取乙型肝炎病毒 DNA 方法的建立及其应用研究[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(9):843-850.
- [11] 王舒婷, 马振男, 李玲玉, 等. 基于功能化磁珠快速提取植物病毒 RNA 方法的建立与优化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(1):127-134.
- [12] 张翠真, 袁小龙, 陈志和, 等. 基于磁珠的核酸快速提取和纯化[J]. 生物学杂志, 2019, 36(4):97-101.
- [13] 陆佳飞, 周克隆, 王缦. 磁珠法快速提取乙型肝炎病毒 DNA 的研究及其在诊断试剂中的应用[C]//第五次全国免疫诊断暨疫苗学术研讨会论文汇编. 银川, 2011: 167-171.
- [14] 王瑞莲, 张婷, 龙军, 等. 国产磁珠法试剂在荧光定量 PCR 检测乙型肝炎病毒核酸中的应用[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(21):3594-3596.
- [15] 毕昊, 吴岚, 郭秋, 等. 一种国产磁珠核酸自动提取系统对人巨细胞病毒 DNA 检测的性能评价[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(8):529-533.
- [16] 王军, 何长生, 王维, 等. 磁珠法和柱式法提取核酸在新城疫荧光定量检测中的比较[J]. 中国动物保健, 2021, 23(3):98; 100.
- [17] 张英哲, 宋英兰. 磁珠法在 120 例丙型肝炎病毒核酸定量检测中的应用效果观察[J]. 延边大学医学学报, 2020, 43(3):205-207.
- [18] 郑瑜宏, 钟凤金, 陈岩松, 等. 磁珠核酸提取方法在血浆 EBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测中应用的性能评价[J]. 中国医药导报, 2017, 14(24):13-16.

Application and performance evaluation of magnetic beads method for rapid nucleic acid extraction in pathogen detection of *Litopenaeus vannamei*

XU Shengwei¹, GE Mingfeng^{1*}, LU Xiandong², LIU Yanhong², HUANG Yizhe², WANG Wenqiong¹,
WANG Xuelei¹, WANG Jianping¹, LIU Hai¹

(1.Ningbo Ocean and Fisheries Research Institute, Ningbo 315012, China;

2.Ningbo iGene Technology Co., Ltd., Ningbo 315105, China)

Abstract: In order to promote the rapid and convenient extraction of pathogenic nucleic acid related to *Litopenaeus vannamei*, and to enable the localization of raw materials and reduce costs, a rapid nucleic acid extraction method based on domestic magnetic beads (magnetic beads method) was developed. In the present study, *L. vannamei* carrying *Enterocytozoon hepatopenaei* was used as the experimental sample. The nucleic acid extracted from three magnetic beads was tested by microfluidic chip, and the concentration of guanidine hydrochloride in the lysate and the concentration of ethanol in the washing solution 2 were optimized. Through the optimization test, it was determined that the extraction effect of Allrun magnetic beads was better than the other two kinds of magnetic beads. The optimum concentration of guanidine hydrochloride in the lysate was $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The optimum concentration of ethanol in washing solution 2 was 75%. On this basis, the linear range, sensitivity, precision, specificity, and anti-interference ability of optimized magnetic beads method were analyzed and evaluated. The results showed that the low concentration of pathogenic nucleic acid which was diluted 10^4 times still maintained good amplification effect. The coefficient of variation was 2.03%, indicating that the established magnetic beads method produced a wide detection range, high sensitivity, strong specificity and anti-interference ability. The established magnetic beads method can achieve rapid, universal, high-purity and low-cost nucleic acid extraction of the main pathogens of *L. vannamei*.

Key words: magnetic beads method; rapid; nucleic acid extraction; evaluation

(责任编辑 韩 超)