

NASBA 技术及其在检验检疫中的应用

王英超, 王宁宁, 吴兴海*, 陈长法, 魏晓棠, 封立平, 张成标

(山东出入境检验检疫局, 青岛 266002)

摘要: 序列特异性核酸体外扩增技术(nucleic acid specific-based amplification, NASBA)是在 PCR 基础上发展起来的一种扩增 RNA 的新技术, 作为一种新型研究手段, 具有便捷、准确性好、灵敏度高、周期短的特点, 尤其适用于 RNA 的分析研究。核酸分析技术是出入境检验检疫工作的重要手段, 可用于食品病原微生物、动植物产品中的有害生物、病原的分析及鉴定。本文简要介绍了 NASBA 技术的基本原理, 在论证对比 NASBA 技术与普通 PCR 方法、荧光 PCR 方法及其他恒温扩增等核酸分析技术的差异及相似性后, 根据其使用特点进一步对 NASBA 在进出境检验检疫的食品安全检测及动植物检疫的应用予以综述及展望。

关键词: 序列特异性核酸体外扩增技术; RNA 检测; 检验检疫; 应用

Nucleic acid specific-based amplification and its application in inspection and quarantine

WANG Ying-Chao, WANG Ning-Ning, WU Xing-Hai*, CHEN Chang-Fa, WEI Xiao-Tang,
FENG Li-Ping, ZHANG Cheng-Biao

(Shandong Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

ABSTRACT: Nucleic acid specific-based amplification (NASBA) is a new technology to amplify RNA originated in PCR. As a new research means, NASBA has the characteristics of convenience, good accuracy, high sensitivity and short periods, especially applicable to RNA analysis. The nucleic acid analysis technology is an important means in entry-exit inspection and quarantine, which can be used to detect and identify pathogenic microorganism in food, pests and pathogen in animals and plants. The paper briefly introduced basic principle of NASBA, compared NASBA to RT-PCR, realtime RT-PCR and other isothermal amplification methods and revealed their differences and similarity. According to the usage characteristics of NASBA, the paper reviewed the application and prospect of NASBA in food safety detection and animal and plant quarantine in entry-exit inspection and quarantine.

KEY WORDS: nucleic acid specific-based amplification; RNA detection; inspection and quarantine; application

序列特异性核酸体外扩增技术(nucleic acid specific-based amplification, NASBA)是在 PCR 基础上发展起来的一种扩增 RNA 的新技术, 是由一对引物引导的、连续均一的、体外特异核苷酸序列等温扩增的酶促反应过程, 反应在 42 °C 进行, 可以在 2 h 左右将模板 RNA 扩增约 10⁹ 倍, 不需

要特殊的仪器^[1]。NASBA 技术适用于单链核糖核酸 RNA 一步扩增及检测, 已广泛应用于人类及动植物病原的检测与诊断。本文就 NASBA 技术的研究进展结合自身研究项目进行简要综述, 以期进一步系统了解 NASBA 技术原理, 为今后拓宽其在食品安全、动植物检疫领域的应用作以铺垫。

*通讯作者: 吴兴海, 副教授, 主要研究方向为食品农产品安全检测。E-mail: wuxinghaiciq@163.com

*Corresponding author: WU Xing-Hai, Associate Professor, Shandong Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China. E-mail: wuxinghaiciq@163.com

1 NASBA 技术的基本原理

NASBA 反应依赖于 AMV 反转录酶、RNA 酶 H、T7 RNA 聚合酶共同协作完成, 标准的 NASBA 反应体系除以上 3 种酶外, 还应有脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、核糖核苷三磷酸(NTP)、2 个特殊的引物和适宜的缓冲液。其中引物 3' 端与靶序列互补, 5' 端具有被 RNA 聚合酶识别的启动子序列, 引物 I 的 5' 端序列与靶 RNA 序列相同^[2]。

NASBA 反应可分为两相: 循环相与非循环相^[3]。在非循环相, 引物 I 与模板 RNA 退火, AMV 催化合成 1 条 cDNA 链, 形成 RNA: DNA 杂交体, RNA 酶 H 水解杂交体上的 RNA, 剩下 1 条单链 DNA, 引物 II 随后与此 DNA 链退火, AMV 催化合成第 2 条 DNA 链, T7 RNA 聚合酶识别双链 DNA 中的启动子后, 催化合成 RNA。由每个模板分子可产生 100 拷贝的 RNA。新合成的 RNA 进入循环相, 成为反转录的模板, 它们首先与引物 II 结合, 由 AMV 催化合成 1 条 DNA 链, 形成 RNA: DNA 杂交体, RNA 酶 H 水解 RNA, 留下 1 条单链 DNA 与引物 I 退火, AMV 催化合成 1 条新的含有 T7 RNA 聚合酶启动子的 DNA 片段, T7 RNA 聚合酶在以此 DNA 为模板合成更多的 RNA。如此循环反复, 使 RNA 不断扩增。

2 NASBA 技术的特点

目前, RNA 的扩增方法主要有 RT-PCR、NASBA 及 RT-SDA(reverse transcriptase-strand displacement amplification), 与 RT-PCR 广泛的应用范围相比, NASBA 或许由于其扩增体系较为复杂, 对检测人员的技术水平要求较高, 发展较为缓慢。但是 NASBA 技术在耗时、扩增效率、灵敏度、仪器成本等方面展现出了明显的优势。作为以单链 RNA 为模板, 并以单链 RNA 为最终产物的 RNA 直接扩增技术, 与其他恒温扩增技术相比, 无须前期的反转录处理步骤, NASBA 在 RNA 病毒扩增的领域具有自身的特点。与 PCR 及其他恒温扩增的产物 DNA 分子不同, RNA 分子不易对实验仪器和环境造成污染, 避免了产物交叉污染实验仪器、操作环境导致的假阳性结果, 解决了环介导等温扩增技术(LAMP)及其他恒温扩增技术经常面临的气溶胶污染问题。

2.1 便捷性

在扩增 RNA 的时候, 无须前期的 DNA 消化酶的处理, 同时该种技术在进行恒温扩增时, 不需要昂贵的核酸扩增反应装置。整个过程始终在 42 °C 进行, 因此, 该技术也叫同温聚合酶链式反应(同温 PCR), 无需热循环仪, 仅 1 个普通的恒温水浴锅就可完成。研究人员利用杂交设备、荧光读数系统简化了扩增的时间和步骤, 在标准条件下, NASBA 扩增能在 1.5~2.0 h 左右结束, 缩短检测周期。

2.2 保守性和特异性

NASBA 的各种酶循环反应的循环数少, 相对于

RT-PCR 错配率较低。首先, 由于该方法使用的模板是 RNA, 反应的产物也是 RNA, 反应的结果不受环境中 DNA 的影响。即使存在外来的双链 DNA 污染, 但由于其不具备 T7 启动子序列, 不可能被扩增; 其次, 该反应只在 42 °C 恒温条件下进行, 不需高温变性步骤, 所以 NASBA 反应流程不会受到外来双链 DNA 的污染, 也减少了错配的概率。因此, 适于检测和定量特异 RNA。Simpkins 等^[4]研究表明 NASBA 能够在基因组 DNA 存在的背景下, 特异性地扩增出 mRNA 以检测活体细胞。

2.3 引物设计

NASBA 反应的引物设计: 与 PCR 基本相同, 不同的是, 引物 5' 端附加一段 T7 RNA 聚合酶启动子序列, 以使 T7 RNA 聚合酶识别特异性启动子而进行体外转录^[5]。

2.4 灵敏度

较高的扩增效率决定了该方法的高灵敏度, NASBA 反应 2 h 左右可将模板 RNA 扩增约 $10^9 \sim 10^{12}$ 倍。1 个 RNA 模板能够产生大约 100 个拷贝。比起 PCR 技术, 该技术能用较少的循环便扩增出大量的目的基因, 保证了 NASBA 的高敏感性。值得注意的是, Birch 等^[6]和 Jean 等^[7]在不同时间先后发现并证实, NASBA 技术是一种灵敏度高于 RT-PCR 反应的检测技术。

2.5 周期短

更高的扩增效率在保证 NASBA 的灵敏度的同时也使其经过较少的循环数, 便可得到与 PCR 相同扩增产物。PCR 大约需要 20 轮循环才能扩增 10^6 倍, 而 NASBA 只需循环 4~5 轮即可达到 10^6 倍^[5]。

2.6 兼容性

若反应中加入变性步骤, NASBA 不仅能扩增 RNA, 而且能扩增双链核酸, 具有粘性末端的核酸也可被扩增。但是产物仍然是 RNA, 扩增效率没有改变。反应过程也分为非循环相和循环相两个部分。

3 NASBA 在检验检疫中的应用

3.1 NASBA 在食品微生物检测中的应用

国内外关于 NASBA 检测食品安全的报道较多。国内有研究者^[8]利用自行建立和优化的 NASBA 检测体系, 对溶藻弧菌进行检测。采用溶藻弧菌的 hsp60 基因为目的片段设计特异性引物, 建成可快速检测溶藻弧菌的 NASBA 检测法, 并进行了特异性和灵敏度试验。结果表明, 通过通用型核酸扩增物快速检测板检测, 所建立起的 NASBA 检测方法, 灵敏度为 6.9×10^2 CFU/mL, 高于普通 PCR 方法。在沙门氏菌的 NASBA 检测^[9]中, 经 50 min 反应后均可扩增出预期 120 bp 大小的产物, 第 1 次 PCR 产物经转录实验

后与 NASBA 直接扩增的产物具有较好的同源性, 其灵敏度达到 10^3 CFU, 证明了 NASBA 法对沙门菌检测具有良好的特异性和灵敏度。

3.2 NASBA 在动物检疫中的应用

在动物病原检测方面, 该技术应用得更为广泛。在禽病检测领域, 2002 年, Collins 等^[10]针对禽流感病毒建立了 NASBA 技术, 其敏感性比传统的病毒培养敏感度高 10 倍。2003 年, Collins 等^[11]进一步改良该技术, 建立了可以区分高致病性禽流感和低致病性禽流感病毒的 NASBA。在我国检测禽流感病毒的国家标准中 2 个涉及到使用 NASBA 方法, 分别是 H5 亚型检测标准(CT19439—2004 H5 亚型禽流感病毒 NASBA 检测方法)和通用型检测标准(GB/T19440—2004 禽流感病毒 NASBA 检测方法。2007 年, 可检测新城疫病毒(NDV)所有血清型的 NASBA 技术也被研究人员所建立^[12]。在猪病检测领域, Collins 等^[13]和 Lau 等^[14]先后针对与口蹄疫病毒建立了 NASBA 技术。2009 年, 梁海霞等^[15]针对猪繁殖与呼吸综合征病毒的非结构蛋白的编码基因将 NASBA 与 ELISA 相结合, 成功检测了该种高致病性病毒。

3.3 NASBA 在植物检疫中的应用

在植物病毒检测领域, 由于植物细胞壁中富含大量的多糖、酚类物质, 植物病毒 RNA 的提取存在着稳定性差、重复性低、效率低等问题, 加之在提取过程中 RNA 本身的自降解现象, 病毒 RNA 的含量往往较低, 对检测方法的灵敏度和稳定性提出了较高要求。同时由于多糖等物质对于 Taq 聚合酶的抑制作用, 在葡萄、草莓、粮谷类等多酚含量较高的植物病毒 RNA 检测中, RT-PCR 技术的应用受到限制和挑战。由于 NASBA 技术的反转录过程被直接合并到扩增反应中, 因此 NASBA 具备了适合于病原 RNA 的扩增、检测的特点, 最适合各种 RNA 样品的分析。研究人员先后对利用 NASBA 结合分子信标对草莓镶脉病毒(strawberry vein banding virus, SVBV)进行了检测^[16], 灵敏度可达到 1 ng 左右。此外, NASBA 技术还被用于检测柑橘速衰病毒(citrus tristeza virus, CTV)、苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)、草莓皱缩病毒(strawberry crinkle virus, SCV)、苹果锈果类病毒(apple scar skin viroid, ASSVd)、南芥菜花叶病毒(arabis mosaic virus, ArMV)、悬钩子环斑病毒(raspberry ringspot virus, RpRSV)、番茄黑环病毒(tomato black ring virus, TBRV)和番茄环斑病毒(tomato ringspot virus, ToRSV)、柑橘裂皮类病毒(citrus exocortis viroid, CEVd)、柑橘类病毒 IV (citrus viroid IV, CVd-IV)、马铃薯卷叶病毒(potato leafroll virus, PLRV)、甘蔗黄叶病毒(sugarcane yellow leaf virus, SYLV)等植物病原^[17-22], 成功地建立起基于 NASBA 的病原一步

法恒温扩增检测技术。国内植物病毒的恒温扩增报道较少, 仅报道过张志宏等^[23]和王小明等^[24]研究并建立草莓斑驳病毒(strawberry mottle virus)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus)的 NASBA 检测技术。

在植物病原侵染过程中, 往往会出现两种及两种以上的病毒共同作用、复合侵染导致植物发病。因此, 建立能够平行检测几种病原多重检测技术更有重要性和实际应用价值。利用 NASBA 技术也可以同时检测多种病毒, 如 Klerks 等^[25]同时检测马铃薯卷叶病毒和马铃薯病毒 Y(potato virus Y, PVY), Szemes 等^[26]同时检测 PVY 的 3 个株系。

4 展望

NASBA 是在 PCR 基础上发展起来的一种新的扩增技术。该技术首先在 1990 年由 Guatelli^[27]提出。1991 年, Compton 等^[28]在 Nature 杂志上对此进行了系统详细的说明和介绍 NASBA 作为一种新型研究手段, 尤其适用于 RNA 的研究。由于其在便捷性、保守性、特异性、灵敏度、周期、兼容性上的优势, 该种检测技术的普及率得到了明显提高, 应用范围已覆盖到临床医学、食品安全、环境监测、动植物检疫、单核苷酸多态性(SNP)筛查等多个领域^[29-38]。检验检疫工作涉及生物检测及鉴定的领域包括多个领域, 食品微生物安全、媒介生物鉴定、动物检疫、植物检疫都离不开以核酸扩增或杂交为中心的分子生物学检测技术。目前, 这些领域的实际工作中, 大部分检测或检验项目的检测标准都写入了核酸检测的内容, 常规 PCR 扩增、实时荧光 PCR 及其他 PCR 衍生技术应用较多。与这些方法相比, 虽然对人员操作水平要求较高且试剂成本略贵, 但是 NASBA 技术在耗时、扩增效率、灵敏度、仪器成本等方面展现出了明显的优势, 具有便捷性强、保真性高、灵敏快速、开放性强的使用特点。作为 RNA 直接扩增技术, 与其他恒温扩增技术相比, NASBA 在 RNA 病毒扩增的领域具有自身的特点。近来, 由于梅里埃 NucliSens 读数仪等新仪器的不断问世, NASBA 实时监测成为一种现实, NASBA 技术正逐步走向成熟^[39,40]。在今后的实验室检测, 新型 NASBA 技术可利用荧光定量 PCR 仪等仪器, 通过向检测体系加入以分子信标、探针, 实现检测流程一体化和自动化, 届时实现升级后的 NASBA 检测技术, 可有助于实现口岸检验检疫工作中大规模进出境样品中食品微生物病原、动植物病原的同步高通量检测。

参考文献

- [1] 王太重, 刘剑雄, 王学东, 等. NASBA——一种新的核酸扩增方法[J]. 生命的化学. 1992, 12(5): 38-39.
Wang TC, Liu JX, Wang XD, et al. NASBA—The new nucleic acid amplification technique [J]. Chem Life, 1992, 12(5): 38-39.
- [2] Gore HM, Wakeman CA, Hull RM, et al. Real-time molecular beacon

- NASBA reveals hblC expression from *Bacillus* spp. in milk [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(2): 386–390.
- [3] 张雷, 卫广森. NASBA 技术研究进展[J]. *现代畜牧兽医*, 2010, 6: 67–70.
- Zhang L, Wei GS. Progress of study of NASBA technology [J]. *Mod J Animal Husbandry Vet Med*, 2010, 6: 67–70.
- [4] Simpkins SA, Chan AB, Hays JP, *et al.* An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enteric* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2000, 30: 75–79.
- [5] 颜进. NASBA 及其在医学上的应用[J]. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, 1997, 18(2): 66–69.
- Yan J. NASBA and its application in medicine [J]. *Foreign Med Sci: Sect Clin Biochem Lab Med*, 1997, 18(2): 66–69.
- [6] Birch K, Dawson CE, Cornett JH, *et al.* A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 33: 296–301.
- [7] Jean J, Burton Blais B, Darveau A. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 5593–5600.
- [8] 秦胜利, 王建广. 溶藻弧菌的依赖于核酸序列恒温扩增检测方法的建立[J]. *青岛科技大学学报(自然科学版)*, 2012, 33(1): 38–41.
- Qin SL, Wang JG. Establishment of the nucleic acid sequence-based amplification method for detecting *Vibrio alginolyticus* [J]. *J Qingdao Univ Sci Technol (Nat Sci Ed)*, 2012, 33(1): 38–42.
- [9] 陈守义, 宋榴艳, 张颖, 等. 沙门菌 NASBA 快速检测试剂的研制[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(12): 3297–3298.
- Chen SY, Song LY, Zhang Y, *et al.* NASBA for the rapid and sensitive detection of *Salmonella* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 30(12): 3297–3298.
- [10] Collins RA, Ko LS, So KL, *et al.* Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5(Eurasian lineage) using NASBA [J]. *J Virol Methods*, 2002, 103(2): 213–225.
- [11] Collins RA, Ko IS, So KL, *et al.* A NASBA method to detect high and low pathogenicity H5 avian influenza viruses[J]. *Avian Dis*, 2003, 47(Suppl): 1069–1074.
- [12] Cui SJ, Fung YW, Lau LT, *et al.* Detection of Newcastle disease virus using nucleic acid sequence based amplification [J]. *Biologicals*, 2007, 35(1): 13–18.
- [13] Collins RA, Ko LS, Fung KY, *et al.* A method to detect major serotypes of foot and mouth disease virus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297: 267–274.
- [14] Lau IT, Scott MR, Donald PK. Detection of foot and mouth disease virus by nucleic acid sequence based amplification(NASBA) [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 126(3): 101–110.
- [15] 梁海霞, 薛青红, 高金源, 等. 高致病性猪生殖与呼吸综合征病毒 NASBA-EILSA 检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(5): 401–404.
- Liang HX, Xue QH, Gao JY, *et al.* Development of an NASBA—ELISA for detection of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Chin Vet Sci*, 2009, 39(5): 401–404.
- [16] Vaskova D, Spak J, Taborsky V, *et al.* The use of PCR and NASBA for detection of strawberry vein banding virus (SVBV) [J]. *Plant Prot Sci*, 2002, 38: 24–27.
- [17] Lair SV, Mirkov TE, Dodds JA, *et al.* A single temperature amplification technique applied to the detection of citrus tristeza viral RNA in plant nucleic acid extracts [J]. *J Virol Methods*, 1994, 47: 141–151.
- [18] Klerks MM, Leone G, Lindner JL, *et al.* Rapid and sensitive detection of Apple stem pitting virus in apple trees through RNA amplification and probing with fluorescent molecular beacons [J]. *Phytopathology*, 2001, 91(11): 1085–1091.
- [19] KlerksMM, Lindner JL, Vaskova D. Detection and tentative grouping of Strawberry crinkle virus isolates [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2004, 110: 45–52.
- [20] Klerks MM, Heuvel JF, Van den Heuvel JF, *et al.* Detection of nematode-transmitted nepoviruses by the novel, one-tube amplidnet RNA assay [J]. *Acta Horticult*, 2001, 550: 53–58.
- [21] Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. Inosine 5'-triphosphate can dramatically increase the yield of NASBA products targeting GC-rich and intramolecular base-paired viroid RNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 1854–1855.
- [22] Goncalves MC, Klerks MM, Verbeek M, *et al.* The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of Sugarcane yellow leaf virus [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2002, 108: 401–407.
- [23] 张志宏, 李丽丽, 杨洪一. 利用 NASBA 技术检测草莓斑驳病毒[J]. *果树学报*. 2007, 24(6): 858–862.
- Zhang ZH, Li LL, Yang HY. Detection of Strawberry mottle virus by NASBA technology [J]. *J Fruit Sci*, 2007, 24(6): 858–862.
- [24] 王小明, 王建华, 冯团诚, 等. 黄瓜花叶病毒 NASBA 检测技术的建立[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(2): 139–145.
- Wang XM, Wang JH, Feng TC, *et al.* Establishment of nucleic acid sequence based amplification system for detection of Cucumber mosaic virus [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2011, 41(2): 139–145.
- [25] Klerks MM, Leone M, Verbeek JF, *et al.* Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers [J]. *J Virol Methods*, 2001, 93: 115–125.
- [26] Szemes M, Klerks MM, Van den Heuvel JF, *et al.* Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection and typing of potato virus Y isolates [J]. *J Virol Methods*, 2002, 100: 83–96.
- [27] Guatelli JC, Whitfield KM, Kwok DY, *et al.* Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by multienzyme reaction modeled after retroviral replication [J]. *PNAS*, 1990, 87: 1874–1878.
- [28] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Nature*, 1991, 350(6313): 91–92.
- [29] Collins RA, Ko LS, Fung KY, *et al.* Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 300(2): 507–515.
- [30] D'Souza DH, Jaykus LA. Nucleic acid sequence based amplification for the rapid and sensitive detection of *Salmonella enterica* from foods [J]. *J Appl Microbiol*, 2003, 95(6): 1343–1350.
- [31] Shipitsyna E, Guschin A, Maximova A, *et al.* Comparison of microscopy, culture and in-house PCR and NASBA assays for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* in Russia [J]. *APMIS*, 2008, 116(2): 133–138.
- [32] van der Meide WF, Peekel I, van Thiel PP, *et al.* Treatment assessment by monitoring parasite load in skin biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis, using quantitative nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2008, 33(4): 394–399

- [33] Liu ZX, Pan JS, Zheng XQ. Establishment of SPAELISA method for detecting CMV causing banana mosaic and heart rot diseases [J]. Chin J Trop Crops, 1994, 15 (Suppl): 19-26.
- [34] Tauriainen S, Dadu E, Oikarinen M, *et al.* Amplifying control RNA for RT-PCR applications by nucleic acid sequence based amplification (NASBA) [J]. J Virol Methods, 2006, 132(1-2): 222-226.
- [35] Gao SD, Chang HY, Cong GZ, *et al.* Nucleic acid sequence-based amplification and its applications in viral diagnosis [J]. China Biotechnol, 2009, 29(1): 80-85.
- [36] Anna N, Anna C, Nigel C, *et al.* A molecular beacon-based real time NASBA assay for detection of *Listeria monocytogenes* in food products: role of target mRNA secondary structure on NASBA design [J]. J Micro Meth, 2007, 68(1): 623-632.
- [37] Collins RA, Ko LS, So KL, *et al.* A NASBA method to detect high and low-pathogenicity H5N1 avian influenza viruses [J]. Avian Dis, 2003, 47(S3): S1069-S1074.
- [38] Gaichon A, Chiparelli H, Martinez A, *et al.* Evaluation of a new NASBA assay for the qualitative detection of hepatitis based on the nucleic acid sequence based amplification (NASBA) [J]. J Clin Virol, 2004, 29(2): 284-291.
- [39] 王虹, 陈金华, 曾位森, 等. NASBA 荧光分子信标技术定量检测丙型肝炎病毒[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 111-113.
- Wang H, Chen JH, Zeng WS, *et al.* HCV quantity detection with NASBA fluorescent molecular beacon technique [J]. China Biotechnol, 2003, 23(12): 111-113.
- [40] 郭秋艳, 黄晓婕, 代丽丽, 等. bDNA 和 NASBA 法定量检测 HIV-1 病毒载量的比较研究[J]. 中国病原生物杂志, 2007, 2(5): 326-328.
- Guo QY, Huang XJ, Dai LL, *et al.* A comparative study on testing methods for HIV-1 viral load by bDNA and NASBA [J]. J Pathog Biol, 2007, 2(5): 326-328.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



王英超, 高级农艺师, 主要研究方向为植物病原检测的研究。

E-mail: yingchaowang@sina.com



吴兴海, 副教授, 主要研究方向为食品农产品安全检测。

E-mail: wuxinghaiciq@163.com