

环介导等温扩增检测技术的应用与方法改进

杨 粤, 付博宇, 张蕴哲, 马晓燕, 张 伟*

(河北农业大学食品科技学院, 保定 071000)

摘 要: 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是近些年发展起来的一种新型核酸扩增技术, 其原理是利用在线软件设计 4 条特异性引物, 在具有强链置换活性的 DNA 聚合酶作用下, 使模板两端引物的结合处循环出现环状单链结构, 以实现恒温条件下的连续快速扩增, 该方法具有特异性强、灵敏度高、耗时短且无需昂贵的热循环设备等优点。目前该技术在国内外已经广泛应用于细菌、病毒及寄生虫等病原体的检测以及鉴定胚胎性别。本文从 LAMP 技术的原理、方法改进、检测应用以及与其他检测方法的比较这 4 方面进行综述, 为今后 LAMP 技术的应用提供理论依据并对未来的发展进行了展望。

关键词: 环介导等温扩增技术; 核酸扩增; 检测方法; 应用

Application and improvement of loop mediated isothermal amplification

YANG Yue, FU Bo-Yu, ZHANG Yun-Zhe, MA Xiao-Yan, ZHANG Wei*

(Agricultural University of Hebei College of Food Science and Technology, Baoding 071000, China)

ABSTRACT: Loop mediated isothermal amplification (LAMP) is developed as a new type of nucleic acid amplification technology in recent years. Its principle is to use online software to design 4 specific primers, rely on DNA polymerase with strong chain replacement activity, and make the template primer on both ends of junction appear the recurring circular single structure, so as to realize the continuous rapid expansion under the condition of constant temperature. The method has the advantages of strong specificity, high sensitivity, taking short time, and without expensive thermal cycling equipment, etc. At present, this technology has been widely used in the detection of bacteria, viruses, parasites and other pathogens, as well as the identification of fetal sex. This paper summarized LAMP technology principle, method transformation, detection application and comparison with other detection methods, providing theoretical basis for the application of LAMP technique in the future and outlook for the future development.

KEY WORDS: loop mediated isothermal amplification; nucleic acid amplification; detection method; application

1 引言

环介导的等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是 2000 年由日本荣研株式会社发明的一种新型体外等温扩增核酸特异片段的技术^[1]。与传统的 PCR 技术相比^[2,3], 克服了 PCR 反应需要通过反复的热变

性过程获得单链模板的缺点, 节省了反复升降温的时间, 实现了在恒温条件下进行连续的快速扩增, 其灵敏度和扩增产物的量比 PCR 高出 1 个数量级。LAMP 技术主要是针对靶基因 6 个区域设计的 4 条特殊引物和具有链置换活性的 *Bst*(*Bacillus stearothermophilus*)DNA 聚合酶。在 *Bst* DNA 聚合酶最适温度 60~65 °C 恒温条件下, 利用可以产生环状

*通讯作者: 张伟, 教授, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: 1294202936@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Wei, Professor, Agricultural University of Hebei College of Food Science and Technology, Baoding 071000, China. E-mail: zhangwei631126@yahoo.com.cn

结构的引物和 *Bst*DNA 聚合酶链置换合成的活性, 在靶序列两端引物结合处循环不断地产生环状单链结构, 使得引物在等温条件下引发新链合成, 从而使靶基因高效扩增^[1]。LAMP 产物是由许多大小不一的 DNA 片段组成, 而产物的检测主要包括常规的核酸检测和直观检测。常规检测有电泳分析、荧光定量检测, 直观检测有副产物-焦磷酸镁浊度检测和荧光目测比色。当前该技术已经应用于病原微生物检测^[4-8]、转基因相关检测^[9]、食源性细菌检测、病毒核酸检测、RNA 病毒检测及胚胎性别鉴定^[10,11]等。

目前国内外的分子学检测方法主要包括聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[12]、实时荧光定量 PCR、核酸探针技术、基因芯片技术及 LAMP 技术。PCR 检测法操作比较复杂且对仪器设备要求较高, 检测的成本相对较高, 因此并不适合基层检测; 实时荧光定量 PCR 法检测快速准确, 但是需要昂贵的荧光检测仪和荧光分子标记探针, 通常在实验室不能得到广泛开展^[13]; 核酸探针检测技术的优点是特异性好, 缺点是灵敏度低, 检测每种菌都需要制备相应的探针, 且需要昂贵的分析仪, 所以很难在食品检测实验室得到应用^[14]; 基因芯片技术可对样品的基因表达信息做快速的定性和定量分析^[15,16], 但是若将其用于食品微生物的检测, 还需要解决诸如建立标准化程序、降低检测的费用、简化样品的制备及进一步提高检测的特异性等问题^[17,18]。而 LAMP 检测技术并不需要昂贵的 PCR 仪和昂贵的检测试剂, 检测结果可直接肉眼观察, 因此在一些基层机构能够得到广泛的应用。

2 环介导等温扩增技术引物设计与扩增原理

引物设计^[19]是 LAMP 方法实现扩增的关键, LAMP 方法的 4 个条引物是针对靶基因上的 6 个区域进行设计的, 这 6 个区域分别是位于 3' 端的 F_{3c}、F_{2c}、F_{1c} 区段和位于 5' 端的 B₁、B₂、B₃ 区段(如图 1 所示)。LAMP 的扩增过程可分为 3 个阶段, 即循环模板合成阶段、循环扩增阶段和伸长再循环阶段^[1]。在循环模板合成阶段, 内引物 FIP 因为 T_m 值和浓度都大于外部引物 F₃, 所以 FIP 的 F₂ 序列先于 F₃ 结合到模板 DNA 的 F_{2c} 上引导合成互补的 DNA 链。在循环扩增阶段, 哑铃式的单链 DNA 结构通过自我引导延伸反应迅速生成双链茎环结构, 引物 FIP 结合到茎环结构的环状结构上, 引导合成新的 DNA 双链, 同时置换出与之相同序列的链。随后通过自我引导的链置换反应, 合成一条填补好缺口、含有反向重复靶序列的茎环 DNA 链。在伸长和再循环阶段, 内引物引导链置换延伸反应, 茎环个数逐渐增加, 最后的扩增产物是一系列大小不一的由反向重复的靶序列构成的茎环结构和多环花椰菜结构的 DNA 片段混合物。逆转录 LAMP(RT-LAMP)是在 LAMP 基础上建立起来的可实现对特异 RNA 分子的快速等温扩增的技术^[20]。其扩增原理与 LAMP 相同, 只是在反应体系中增加

了逆转录试剂(逆转录酶), 使 RNA 的逆转录和 cDNA 的 LAMP 扩增在同一试管中完成而不需要分步进行。RT-LAMP 扩增的灵敏度比常规的 RT-PCR 检测高 10 倍^[21]。

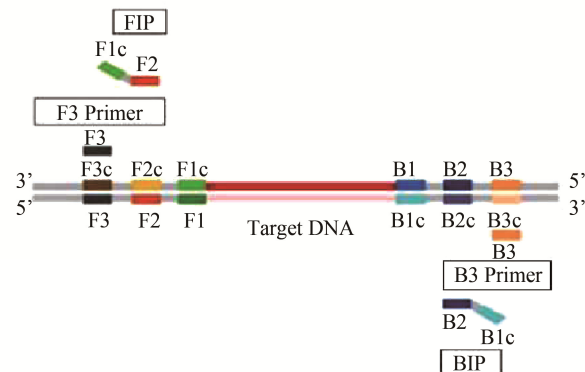


图 1 LAMP 引物设计^[21]

Fig. 1 Primer design for LAMP

3 LAMP 技术检测方法改进

最初报道 LAMP 扩增是需要 95 °C 对模板进行预变性, 2001 年 Nagamine 等^[22]发现 LAMP 扩增反应可以省略预变性步骤, 减少了操作的时间, 且免除了使用热循环仪。2002 年, Nagamine 又添加了 2 条环形的引物在 LAMP 反应中, 降低了反应的时间, 提升了扩增的效率^[23]。2012 年 Xu 等^[24]基于 LAMP 原理而对引物设计发明了 CPA(cross priming amplification)新型的扩增方法, 此方法设计了一对交叉扩增的引物与一对剥离的引物, 在扩增时两端会引入交叉引物的杂交位点, 通过线性结构与颈环状的结构进行扩增。此种扩增不但速度快, 而且最低可以检测出 4 个菌体的阳性样本。LAMP 扩增使用的是具有链置换活性的 *Bst*DNA 聚合酶, 此酶对模板中一部分抑制成分不敏感。因此基于此酶具有良好的耐受性, 可以适当简化模板核酸的提取过程, 既节约成本又减少操作步骤。Paris 等^[25]对恙虫病进行检测时, 把待测血液直接 99 °C 加热 3 min, 13000 r/min 离心 3 min 获得上清液, 直接作为检测的模板, 简化了提模板的操作。近些年人们一直在对 LAMP 检测方法做不断的改进, 为今后 LAMP 技术平台提供基础的创新。

4 LAMP 技术的应用

相比于传统的 PCR 技术^[26], LAMP 技术具有快速高效、灵敏度高、特异性强、检测直观以及设备要求低等优势。自 LAMP 技术发明以来, 被广泛地应用于病原微生物检测、临床医学疾病诊断、转基因食品以及胚胎的性别鉴定, 具有很高的应用价值。

4.1 细菌核酸的检测

近几年对 LAMP 技术用于检测细菌的报道很多, 2012

年 Song 等^[27]采用环介导等温扩增技术对牛奶和血液中的布鲁氏菌检测,对4种布鲁氏菌和29非布鲁氏菌进行了检测,优化条件为温度 65 °C,反应时间 60 min, Mg²⁺浓度 8.0 mmol/L, 聚合酶含量 *Bst*DNA 0.5 μL, dNTPs 浓度 1.6 mmol/L, 内外引物比例 1: 8。LAMP 法最低检测限是 3.81 CFU/mL。结果表明, LAMP 法检测牛奶和血液中的布鲁氏菌是一种快速、特异性强、灵敏度高、价格低廉的方法。2015年 Roche^[28]等人采用 LAMP 法快速检测血清而诊断大肠杆菌。结果表明 LAMP 法扩增靶基因 DNA 具有高效性与特异性。

2014年 Wu 等^[29]以普通 LAMP 为基础,利用双回路环介导等温扩增技术(dLAMP)基于两个靶基因 *hlyA* 和 *IAP* 而对 450 个食物样中的单增李斯特菌进行快速检测。检测结果表明, dLAMP 检测单增李斯特菌的时间与温度分别是 15 min 和 63 °C, 每管单核细胞增生李斯特菌的敏感度为 10 fg/mL DNA。基于 *hlyA* 和 *IAP* 普通 LAMP 检测的时间为 45 min, 温度为 63 °C, 敏感度为 100 fg/mL, 降低了检测的时间, 提高了检测的灵敏度。另外, 选用矿物油和 GoldViewII 核酸染色, 阳性结果可直接进行肉眼观察。研究证实 dLAMP 检测与传统微生物培养检测精确度完全一致。因此, dLAMP 检测方法能够成为检测食品中单增李斯特菌重要的方法。除此之外, 有很多的学者采用 LAMP 技术对镰刀菌^[30]、杆菌^[31]等细菌分别进行检测, 结果表明 LAMP 法在检测细菌核酸方面具有简便、快速、灵敏度高、特异性强的优势。

4.2 病毒核酸检测

4.2.1 DNA 病毒检测

环介导等温扩增技术在检测 DNA 病毒方面已经得到了应用。2015年 Odari 等^[32]建立了对 HIV-1 型病毒的检测方法, 在 HIV-1 整合区域设计了具有特异性的引物进行半定量检测。试验证实 HIV-1 最低检测限(LOD)为 1200 拷贝/mL, 定量的下限(LOQ)为 9800 拷贝/mL, 敏感性为 82%和 86%(肯尼亚的 135 和 99 份血浆样品), 93%(从德国获得 112 份血浆样品), 特异性为 99%和 100%。而 HIV-10 型和 HIV-2 病毒样本没有检测到。同时, 要想检测到艾滋 1 组 Mnon-B 病毒仍需要对引物做进一步的细化。结果表明 LAMP 技术在检测病毒方面对引物的要求比较高。

4.2.2 RNA 病毒检测

LAMP 法不但可以扩增 DNA, 还可以扩增 RNA, 只需要在原有的体系中添加适量的 RNA 反转录酶即可。2014年 Gou 等^[33]采用逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP)与垂直流检测相结合建立了猪 II 型繁殖与呼吸综合征病毒的检测方法。该方法不但具有快速、准确、成本低的优势, 而且与传统的逆转录 PCR 技术相比敏感性更高。试验通过对 43 个临床样本进行测试, 检测出 14 个样本呈阳性, 具有很高的特异性。基于以上各种优势, RT-LAMP 检测猪 II 型

繁殖与呼吸综合征病毒在农村具有很高的实用价值。RT-LAMP 技术除了在动物检测上有了广泛的应用, 在植物检测上也有了很好的发展。2015年 Keizerweerd 等^[34]通过 RT-LAMP 技术检测甘蔗花叶病毒(SCMV)与高粱花叶病毒(SrMV)。在 RT-LAMP 试验中, 依据每个病毒保守大外壳蛋白基因而设计了 6 组引物, 3 组引物用于检测 SCMV, 3 组引物用于检测检测 SrMV。结果证明, RT-LAMP 法检测 SCMV 和 SrMV, 最低检测限为 5 mmol/L, 其灵敏度要远远高于常规检测和实时荧光定量 PCR 检测方法。

4.3 寄生虫检测

LAMP 技术日趋成熟, 在检测寄生虫也得到了广泛的应用。现有很多关于 LAMP 法用于锥虫、肝吸虫和血吸虫等多种寄生虫检测的文章报道。Qu 等^[35]利用逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP)用于猪肉中的弓形虫的检测。试验通过对弓形虫的 18S rRNA 保守序列设计 6 个引物, 于 63 °C、60 min 完成引物扩增, 并以 SYBR greenI 作为反映指示剂对本试验进行实时监控, 通过对扩增产物的验证与测序分析, 证实 RT-LAMP 技术具有很高的特异性。另外, 试验对 RNA 样品做 10 倍系列的稀释与 RT-PCR 技术比较敏感性与特异性, 结果显示 RT-LAMP 技术的敏感性与特异性是 RT-PCR 技术的 100 倍。目前 RT-LAMP 技术已经在诊断猪肉安全上有了广泛的应用。2014年 Mugasa 等^[36]以普通 LAMP 为基础, 对核酸序列扩增(NASBA)-oligochromatography(OC)与 LAMP 结合两种简单的测试方法进行比较。对 181 个患者的血液进行测试, 结果显示 NASBA 与 LAMP 结合其敏感性和特异性分别为 93.9%(95% CI=84.9~98.3%)和 100%(95% CI=94.9~100%)。结果表明, NASBA-OC-LAMP 在检测非洲锥虫病具有很高的特异性与灵敏性。Yongkiettrakul 等^[37]应用 LAMP 法与侧流试纸(LFD)检测恶性疟原虫与间日疟原虫。试验选用生物素标记特异性引物与 FITC 标记探针杂交, 结果在 LFD 色谱可视化。整个试验仅需要 1.5 h 检测时间, 而检测限要比传统 PCR 技术低 10 倍。由此证明 LAMP-LFD 法检测 dhfr-ts 基因在检测时间与试验操作上都具有优势。Tong 等^[38]使用 LAMP 法对感染期和潜伏期的螺血吸虫进行检测, 通过对多个地区的螺血吸虫的检测, 依据检测结果建立了战略性的指南, 并建立了螺血吸虫传播风险图。另外, Arimatsu 等^[39]运用 LAMP 法对泰国肝吸虫、棘带吸虫和麝猫后睾吸虫进行了检测。LAMP 在检测寄生虫的特异性、敏感性、廉价性, 特别适合临床标本中一些寄生虫的检测。

4.4 LAMP 技术在胚胎性别的鉴定

近几年, 国内外采用 LAMP 法进行胚胎鉴定的发展还是比较迅速的, 而准确率也很高。2015年 Khamlor 等^[40]利用 LAMP 技术检测牛胚胎性别, 此试验对牛胚胎 2 个染色体区域, 一个特定的男性(Y 染色体, S₄区)和其他常见的男性女性(1.715 卫星 DNA)使其在同一反应管中扩增, S₄环

引物使用荧光染料异硫氰酸光素标记。63 °C 下反应 1 h 即可以完成扩增。若试管中出现绿色沉淀物则表明有 Y 染色体 DNA, 而橙色沉淀则表明没有 Y 染色体 DNA, 进而确定其为男性和女性, 准确性达到了 100%。未来 LAMP 技术鉴定胚胎性别具有广阔的市场。

5 结 论

LAMP 法的原理虽然很复杂, 但检测时在实际操作时却十分的简单。只需要将检测样品和试剂混合, 在合适的温度和时间条件就可以保证核酸扩增。LAMP 和 RT-LAMP 方法具有操作简单、结果容易判断等优点, 因此此方法在人类、动物和植物致病微生物检测方面得到了广泛的应用。但是目前有关 LAMP 技术的报道主要集中在检测各种食源性致病菌, 在检测环境方面的应用比较少。可以考虑利用检测分子水平的生态毒理学的生物标志物而确定环境污染的情况^[41], 所以有望通过 LAMP 技术检测环境污染的情况, 及时反映生物体受到的污染, 最终可以为监测环境污染提供一种简便而快速的检测方法。

参考文献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): 63.
- [2] Wang ZL, Cai R, Yuan YH, *et al.* An immunomagnetic separation-Real-time PCR system for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit products [J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 175: 30–35.
- [3] Connor CJ, Luo HL, Gardener BB, *et al.* Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products [J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 99: 229–235.
- [4] Hara-Kudo Y, Konishi N, Ohtsuka K, *et al.* Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 122(1/2): 156–161.
- [5] Scheel CM, Zhou Y, Theodoro RC, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(2): 483–488.
- [6] Sharma K, Bansal R, Sharma A, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification for rapid diagnosis of tubercular uveitis [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2014, 132(6): 777–778.
- [7] Chu YN, Cheng SJ, Liang C, *et al.* Visual isothermal amplification for rapid detection and genotyping of avian influenza virus [J]. *J Chin Pract Diagn Therapy*, 2011, 25(7): 670–673.
- [8] Liu M, Luo Y, Tao R, *et al.* Sensitive and rapid detection of genetic modified soybean (roundup ready) by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(11): 2365–2369.
- [9] Zhang L, Huang CH, Huang H, *et al.* Application of LAMP in sex identification on embryos [J]. *Mod J Anim Husband Vet Med*, 2006, (6): 9–11.
- [10] Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis [J]. *Human Reprod Update*, 2009, 15(1): 139–151.
- [11] Whyte P, Gill K M, Collins J D, *et al.* The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry [J]. *Vet Microbiol*, 2002, 89: 53–60.
- [12] Aparecidade OM, Abeid REG, Morato BAM, *et al.* Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR [J]. *Food Microbiol*, 2010, 27(1): 19–23.
- [13] Hein I, Klein D, Lehner A, *et al.* Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay [J]. *Res Microbiol*, 2001, 152(1): 37–46.
- [14] 田长冬. 环介导等温扩增(LAMP)技术检测贝类中副溶血弧菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2011.
Tian CD. Study on the detection of *Vibrio* in shellfish by loop mediated isothermal amplification(LAMP) [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2011.
- [15] 王润鑫. 环介导等温扩增技术快速检测肉中沙门氏菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
Wang RX. Loop mediated isothermal amplification technique for rapid detection of meat *Salmonella* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2010.
- [16] Martinis D, Duvall RE, Hitchins AD, *et al.* Real time PCR detection of 16SrRNA genes speeds most-probable-number enumeration of foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. *J Food Protec*, 2007, 70(7): 1650–1655.
- [17] Oliveira MA, Ribeiro EG, Bergamini AM, *et al.* Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR [J]. *Food Microbiol*, 2010, 27(1): 19–23.
- [18] 匡燕云, 李思光, 罗玉萍. 环介导等温扩增核酸技术及其应用[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(3): 557–560.
Kuang YY, Li SG, Luo YP. Loop mediated isothermal amplification of nucleic acid technology and its application [J]. *Microbiol Bull*, 2007, 34(3): 560–557.
- [19] Eiken Chemical Co. Ltd. The principles of LAMP method [EB/OL]. (2016-03-01) <http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/index/html.2003-10>.
- [20] Soliman H, El-Matbouli M. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS) [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 114(3–4): 205–213.
- [21] Gunimaladevi, I Savan R, Sakai M, *et al.* A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Arch Virol*, 2005, 150(5): 899–909.
- [22] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template [J]. *Clin Chem*, 2001, 47(9): 1742–1743.
- [23] Iseki H, Alhassan A, Ohta N, *et al.* Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 71(3): 281–287.
- [24] Xu G, Hu L, Zhong H, *et al.* Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification [J]. *Sci Rep*, 2012, (2): 246.

- [25] Paris DH, Blacksell SD, Newton PN, *et al.* Simple, rapid and sensitive detection of *Orientia tsutsugamushi* by loop-isothermal DNA amplification [J]. *Trans Royal Society Trop Med Hyg*, 2008, 102(12): 1239–1246.
- [26] Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes of *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(3): 820–828.
- [27] Song LY, Li JT, Hou SP, *et al.* Establishment of loop-mediated isothermal amplification(LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp. and application to milk and blood samples [J]. *Sci Verse Sci Direct*, 2012, 90(3): 292–297.
- [28] Roche ML, Najih PJR, Paliouras M, *et al.* A rapid diagnostic method for *E.coli* serogroups responsible for gastro-intestinal diseases using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Aanl Methods*, 2015, 7: 287–295.
- [29] Wu RN, Liu X, Guo BC, *et al.* Development of double loop-mediated isothermal amplification to detect *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Curr Microbiol*, 2014, 69: 839–845.
- [30] Denschlag C, Rieder J, Vogel R, *et al.* Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for group specific detection of important trichothecene producing *Fusarium* species in wheat [J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 177: 117–127.
- [31] Pérez-Sancho M, Garcia-Seco T, Garcia LaN, *et al.* Development and evaluation of an IS711-based loop mediated isothermal amplification method(LAMP) for detection of *Brucella* spp. on clinical samples [J]. *Vet Sci*, 2013, 95: 489–494.
- [32] Odari EO, Maiyo A, Lwembe R, *et al.* Establishment and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay for the semi-quantitative detection of HIV-1 group M virus [J]. *Viol Methods*, 2015, 212: 30–38.
- [33] Gou HC, Deng JR, Pei JJ, *et al.* Rapid and sensitive detection of typeII porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated Isothermal amplification combined with a vertical flow visualization strip [J]. *Viol Methods*, 2014, 209: 86–94.
- [34] Keizerweerd AT, Chandra A, Grisham MP. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of *Sugarcane* mosaic virus and *Sorghum* mosaic virus in sugarcane [J]. *Viol Methods*, 2015, 212: 23–29.
- [35] Qu DF, Zhou HY, Han JZ, *et al.* Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a diagnostic tool of *Toxoplasma gondii* in Pork [J]. *Vet Parasitol*, 2013, 192: 98–103.
- [36] Mugasa CM, Katiti D, Boobo A, *et al.* Comparison of nucleic acid sequence-based amplification and loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human African trypanosomiasis [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 78: 144–148.
- [37] Yongkiettrakul S, Jaroenram W, Arunrut N, *et al.* Application of loop-mediated isothermal amplification assay combined with lateral flow dipstick for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* [J]. *Parasitol Int*, 2014, 63: 777–784.
- [38] Tong QB, Chen R, Zhang Y, *et al.* A new surveillance and response tool: risk map of infected *Oncomelania hupensis* detected by Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) from pooled samples [J]. *Acta Trop*, 2015, 141: 170–177.
- [39] Arimatsu Y, Kaewkes S, Laha T, *et al.* Specific diagnosis of *Opisthorchis viverrini* using loop-mediated isothermal amplification(LAMP) targeting parasite microsatellites [J]. *Acta Trop*, 2015, 141: 368–371.
- [40] Khamlor T, Pongpiachan P, Pampai R, *et al.* Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification [J]. *Theriogenology*, 2015, 83: 891–896.
- [41] 姜元臻. 生物标志物检测环境污染研究新进展[J]. *广东化工*, 2010, 37(4): 150–152.
- Jiang YZ. Research progress on biological marker detection of environmental pollution [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2010, 37(4): 150–152.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



杨 粤, 硕士研究生, 主要研究方向为有害微生物检测与控制。

E-mail: 1294202936@qq.com

张 伟, 教授, 主要研究方向为食品加工与安全。

E-mail: zhangwei631126@yahoo.com.cn.