

实时逆转录环介导等温扩增法快速检测 GI型诺如病毒

李 辉, 李雪梅, 刘 沙, 刘思宁, 钟晓男, 邹 瑜, 孙 沛, 杨 婷, 夏 雯, 李献刚*

(东港海关综合技术服务中心, 国家级农兽药残留及海洋生物毒素检测重点实验室, 东港 118300)

摘 要: **目的** 建立实时逆转录环介导等温扩增法(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)快速检测 GI 型诺如病毒的分析方法。**方法** 通过反应引物的筛选、检测温度的优化、灵敏度和特异性研究、样品检测应用等, 进行 GI 型诺如病毒实时 RT-LAMP 法检测关键技术的研究。**结果** 针对 GI 型诺如病毒特异性基因, 通过设计筛选出最佳实时 RT-LAMP 引物组, 并使用该组引物特异、灵敏、快速地检测到 GI 型诺如病毒。最佳检测温度为 65 °C, 最小检测限为 22.6 拷贝/μL, 且只对 GI 型诺如病毒靶基因特异, 检测应用结果可靠。**结论** 本研究建立了 GI 型诺如病毒的实时 RT-LAMP 检测方法, 可用于 GI 型诺如病毒的样品检测。

关键词: GI 型诺如病毒; 实时; 逆转录环介导等温扩增法

Rapid determination of norovirus genogroup I by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

LI Hui, LI Xue-Mei, LIU Sha, LIU Si-Ning, ZHONG Xiao-Nan, ZOU Yu, SUN Pei, YANG Ting, XIA Wen, LI Xian-Gang*

(National Level Key Laboratory of Veterinary Drug, Pesticide Residue & Marine Life's Toxin Detection, Integrated Technical Service Center of Donggang Customs, Donggang 118300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid determination of norovirus genogroup I by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method. **Methods** Through the selection of reaction primers, optimization of detection temperature, study of sensitivity and specificity, and application of sample detection, the key technology of real-time rt-lamp for detection of norovirus genogroup I was studied. **Results** Aiming at the specific gene of norovirus genogroup I, the best primer group was selected by LAMP method, and the primer group was used to detect norovirus genogroup I specifically, sensitively and quickly. The optimum detection temperature was 65 °C, the minimum detection limit was 22.6 copies/μL, it was only specific to norovirus genogroup I, and the test results were reliable. **Conclusion** A real-time RT-LAMP method for rapid detecting norovirus genogroup I is established, which can be used for clinical detection of norovirus genogroup I.

基金项目: 大连海关科研项目(2020DK12)、辽宁出入境检验检疫局科研项目(LK02-2015)

Fund: Supported by the Scientific Research Project of Dalian Customs (2020DK12), and the Scientific Research Project of Liaoning Entry-Exit Inspection Quarantine Bureau (LK02-2015)

*通信作者: 李献刚, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: lixiangang07@126.com

*Corresponding author: LI Xian-Gang, Engineer, Integrated Technical Service Center of Donggang Customs, National Level Key Laboratory of Veterinary Drug, Pesticide Residue & Marine Life's Toxin Detection, Donggang 118300, China. E-mail: lixiangang07@126.com

KEY WORDS: norovirus genogroup I; real-time; reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

0 引言

诺如病毒(Norovirus, NV)是急性病毒性胃肠炎爆发的主要病原之一,主要通过粪-口途径传播,具有发病急、传播速度快、涉及范围广等特点,可导致严重的公共卫生问题^[1-2]。该疾病的传播与食品的污染密切相关,尤其是贝类和小浆果,因此加强食品中诺如病毒检测方法的研究,显得尤为重要。

目前,国家检测标准(GB 4789.42—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验》)中用于食品中诺如病毒检测的方法,主要为实时荧光逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术,但 RT-PCR 技术存在对硬件设备的要求高,检测程序复杂,检测时间相对较长等问题^[3]。实时逆转录环介导等温扩增法(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)利用链置换 DNA 聚合酶在等温条件下对靶序列进行核酸扩增,整个检测反应过程只需 1~2 h,且可实时判定检测结果,能够有效解决 RT-PCR 技术存在的问题^[4]。陈宗峰等^[5]将该技术应用于粪便中诺如病毒的检测,阳性检测率与 RT-PCR 法无明显差异;魏海燕等^[6]针对贝类中 GII 型诺如病毒进行了 RT-LAMP 技术研究,灵敏度为 10 拷贝/ μL RNA 分子水平,与常规检测 RT-PCR 方法相当。本研究针对食品中 GI 型诺如病毒,采用实时 RT-LAMP 技术,选择 GI 型诺如病毒的特异性基因进行扩增引物组筛选,建立快速检测体系,同时与 RT-PCR 检测方法进行灵敏性比对,旨在为食品中 GI 型诺如病毒的检测工作提供更加有效的技术保障体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

本实验所用到的对照样本 GII 型诺如病毒(NV GII)、轮状病毒(duovirus, RV)、星状病毒(astrovirus, AV)和札如病毒(sapovirus, SV)的核酸模板均由沈阳市疾病预防控制中心保存并提供,材料收集后 24 h 内冷冻保存运到本中心;GI 型诺如病毒靶基因核酸质粒采用人工合成的方式,由宝生物工程(大连)有限公司完成;35 份贝类检测样本由本中心保存并提供。

RNA-LAMP 扩增反应试剂盒(LAMP RNA Amplification Kit)、LAMP PCR 反应管(LAMP PCR Reaction Tube)、荧光染料(fluorescent detection reagent, FD)(北京蓝谱生物科技有限公司);弱阳离子螯合树脂 Chelex-100、

1VL 甜菜碱(美国 Sigma 公司);三羟甲基氨基甲烷盐酸盐[Tris-HCl, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司];聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100, 北京美莱博医学科技有限公司);脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP, 美国 Pharmacia 公司);2 $\times$ Tap MIX 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];RNA 提取试剂盒(SureFast PREP DNA/RNA Virus Art. No.F1051)(德国 R-Biopharm 公司)^[7-10]。

1.1.2 主要仪器

La-500 实时浊度仪(日本荣研化学株式会社);HCM100 恒温振荡金属浴[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司];Nano Drop one 微量核酸测定仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];UVP BioDoc-IT 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 的提取

取 1 g 贝类消化器官均质液,提取 GI 型诺如病毒基因组 RNA,具体提取方法详见试剂盒使用说明书。病毒基因组 RNA 提取试剂盒购自德国 R-Biopharm 公司。

1.2.2 实时 RT-LAMP 反应引物的设计

选择 GI 型诺如病毒编码结构蛋白的基因为特异靶基因(GenBank: AY502016.1),根据特异基因序列的 6 个独立区域,在实时 RT-LAMP 引物专业设计网站(网址: <http://primerexplorer.jp/e/>)进行引物参数设置,分别设计实时 RT-LAMP 反应所需的 6 条特异性引物(内引物 BIP 和 FIP、外引物 B3 和 F3、环引物 LB 和 LF)^[11-16]。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.3 实时 RT-LAMP 反应体系

25 μL 反应混合物体系各组分: 1 μL RNA 模板、20 mmol/L Tris-HCl(pH8.8)、1.4 mmol/L dNTP、10 mmol/L KCl、10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、8 mmol/L MgSO_4 、0.1% Triton X-100、0.8 mol/L 甜菜碱、40 pmol/L FIP 和 BIP、5 pmol/L F3 和 B3、20 pmol/L LB 和 LF、8 U Bst DNA 聚合酶和逆转录酶。将混合物置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 60 min 左右,以双蒸水为阴性对照^[13-14]。

1.2.4 RT-PCR 反应体系

25 μL PCR 反应混合物体系各组分: 1 μL 模板、10 pmol/L B3 和 F3、12.5 μL 2 $\times$ Taq MIX。扩增循环条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μL , 加在 1% 含 GoldView 琼脂糖凝胶上,120 V 电泳 35 min,在凝胶成像系统下照相检测^[17]。

1.2.5 实时 RT-LAMP 反应结果检测

实时浊度仪检测: 在 Bst DNA 聚合酶的作用下,实时

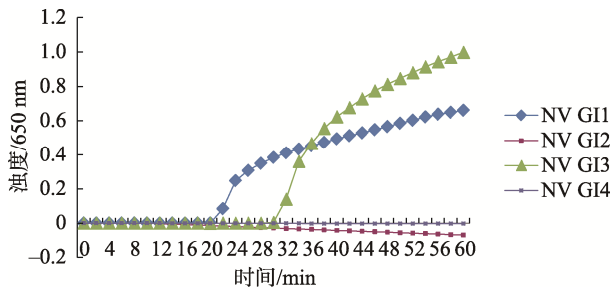
RT-LAMP 反应会产生焦磷酸根, 焦磷酸根与反应液中的二价镁离子发生化学反应产生焦磷酸镁沉淀, 为白色沉淀。据此, 利用实时浊度仪 LA-500 测定反应管中焦磷酸镁的浊度, 并绘制成曲线来判断检测反应结果^[18]。

基于颜色变化检测: 钙黄绿素是一种金属离子指示剂, 根据反应液中镁离子含量的变化而表现出不同的颜色, 从而判定检测结果阴阳性, 其中阴性时为橙色, 阳性时为绿色。

2 结果与分析

2.1 最佳实时 RT-LAMP 引物的筛选

按上述 25 μ L 体系配制反应液, 以 GI 型诺如病毒靶基因核酸作为模板, 使用设计的 4 组引物进行实时 RT-LAMP 扩增, 比较其扩增效率, 找出最佳引物组合。由图 1 可知, GI2 引物和 GI4 引物未发生扩增反应, 与 GI3 引物相比, GI1 引物的扩增效率最高, 说明 GI1 引物为扩增靶基因的最佳实时 RT-LAMP 引物^[12]。由此设计得到最佳引物组合序列见表 1。



注: 650 nm 表示实时浊度仪检测焦磷酸镁沉淀浊度的波长。
图 1 最佳实时 RT-LAMP 引物的筛选结果
Fig.1 Screening results of the best real-time RT-LAMP primers

表 1 最佳引物组合序列 Table 1 Optimal primer combination sequence	
引物	序列(5'-3')
GI1-F3	TGTGGACAGGAGATCGCA
GI1-B3	TTTACTTGCCAGCAGTCG
GI1-FIP	CACTGGCGCCATCCACGTTTATCTCCTGCCGAATTCGTA
GI1-BIP	GCGCTGGTCAGTTGGTACCGCCGCTACAGGATCCATTGC
GI1-LF	CGTCCTTAGACGCCATCATCATT
GI1-LB	GAGGCTAACACTTCTGACCCC

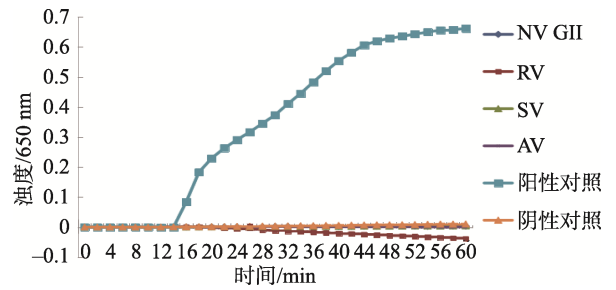
2.2 最佳实时 RT-LAMP 反应温度筛选实验

使用筛选出来的最佳引物组合 GI1 引物, 进行最佳实时 RT-LAMP 反应温度筛选, 温度筛选范围从 60~67 $^{\circ}$ C, 梯

度为 1 $^{\circ}$ C^[19], 结果表明 64~67 $^{\circ}$ C 时发生了 LAMP 反应, 且 65 $^{\circ}$ C 时扩增效率最高, 所以最佳温度定位为 65 $^{\circ}$ C。

2.3 特异性检测实验

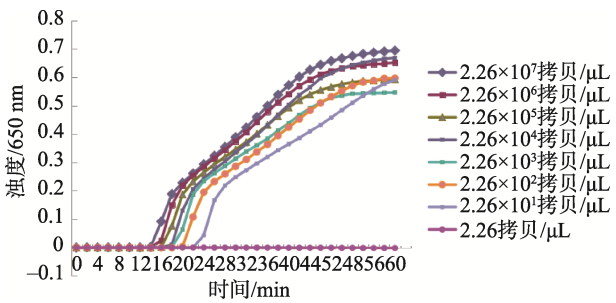
以 GI 型诺如病毒为阳性对照, 使用最佳引物组 GI1 对 GII 型诺如病毒(NV GII)、轮状病毒(RV)、星状病毒(AV)、札如病毒(SV)等对照样本核酸进行实时 RT-LAMP 实验, 由图 2 的实验结果发现: 除阳性对照外, 其他所有对照样本均未发生实时 RT-LAMP 反应, 说明 GI1 引物具有较好的特异性, 可以特异性的检测 GI 型诺如病毒。



注: 650 nm 表示实时浊度仪检测焦磷酸镁沉淀浊度的波长。
图 2 实时 RT-LAMP 特异性检测实验结果
Fig.2 Specific detection of real-time RT-LAMP experimental results

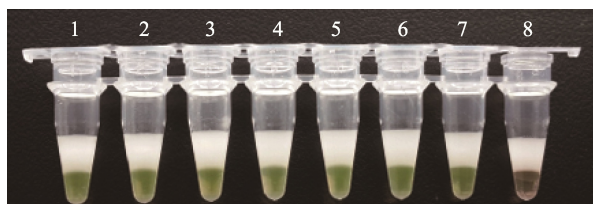
2.4 敏感性检测实验及与 RT-PCR 法的比较

将质粒模板 10 倍梯度稀释, 用于实时 RT-LAMP 反应^[20], 结果见图 3, 检测结果表明, 实时 RT-LAMP 浊度法与染色法实验结果(见图 4)一致, 对 GI 型诺如病毒的最低检测浓度为 22.6 拷贝/ μ L。



注: 650 nm 表示实时浊度仪检测焦磷酸镁沉淀浊度的波长。
图 3 实时 RT-LAMP 浊度法敏感性检测实验结果
Fig.3 Sensitivity test results of real-time RT-LAMP turbidimetric method

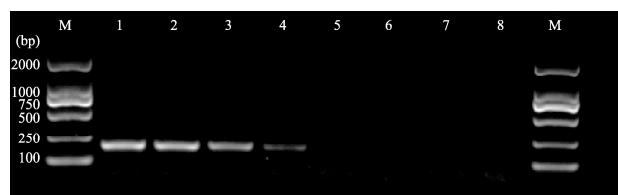
将 10 倍梯度稀释的质粒用于 RT-PCR 反应, 检测结果见图 5。引物为 GI1-F3、GI1-B3, RT-PCR 法中引物应用的就是最佳实时 RT-LAMP 引物的 F3 和 B3, 这样才能更准确的比较二者的敏感性。结果显示, RT-PCR 法最低检测浓度为 2.26 $\times$ 10³拷贝/ μ L, 远低于实时 RT-LAMP 法的检测灵敏度。



注: 1: 2.26×10^7 拷贝/ μL (+); 2: 2.26×10^6 拷贝/ μL (+); 3: 2.26×10^5 拷贝/ μL (+); 4: 2.26×10^4 拷贝/ μL (+); 5: 2.26×10^3 拷贝/ μL (+); 6: 2.26×10^2 拷贝/ μL (+); 7: 2.26×10^1 拷贝/ μL (+); 8: 2.26 拷贝/ μL (-).

图4 实时 RT-LAMP 染色法敏感性检测实验结果

Fig.4 Sensitivity test results of real-time RT-LAMP staining method



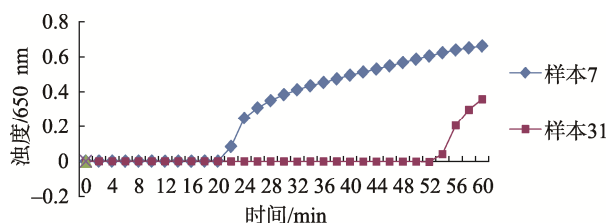
注: M: D2000 DNA Marker; 1: 2.26×10^7 拷贝/ μL ; 2: 2.26×10^6 拷贝/ μL ; 3: 2.26×10^5 拷贝/ μL ; 4: 2.26×10^4 拷贝/ μL ; 5: 2.26×10^3 拷贝/ μL ; 6: 2.26×10^2 拷贝/ μL ; 7: 2.26×10^1 拷贝/ μL ; 8: 2.26 拷贝/ μL .

图5 RT-PCR 法敏感性检测实验结果

Fig.5 Sensitivity test results of RT-PCR method

2.5 实际样本检测实验

分别对 35 份贝类样本的消化器官均质液提取 RNA 模板, 使用最佳引物组合 GI1 引物, 在 65°C 条件下进行 GI 型诺如病毒的实时 RT-LAMP 检测实验, 检测结果如图 6, 其中样本 7 的检测结果为 GI 型诺如病毒阳性, 同时使用外引物 GI1-F3 和 GI1-B3 对病毒核酸样本进行扩增测序, 将测序结果在 NCBI 网站上进行碱基局部对准检索(basic local alignment search tool, BLAST), 比对表明与 NCBI 基因库中的 GI 型诺如病毒同源, 说明实时 RT-LAMP 技术能够用于 GI 型诺如病毒的检测。



注: 650 nm 表示实时浊度仪检测焦磷酸镁沉淀浊度的波长。

图6 样本检测实验结果

Fig.6 Experimental results of sample detection

3 结论与讨论

本研究针对 GI 型诺如病毒特异基因, 设计筛选出最

佳引物组 GI1, 能够在 65°C 条件下快速灵敏的检测 GI 型诺如病毒, 最小检测限量值为 22.6 拷贝/ μL , 远高于 RT-PCR 法的检测灵敏度, 且只对 GI 型诺如病毒靶基因特异。

本研究通过靶序列上的 6 个独立区域设计 4 条引物 GI1-FIP、GI1-BIP、GI1-F3、GI1-B3, 能特异性的检测 GI 型诺如病毒, 相对于 RT-PCR 引物只能识别靶序列的 2 个独立区域而言, 实时 RT-LAMP 法的特异性大大提高, 假阴性出现的概率也会随之降低, 同时增加了 2 条环引物 GI1-LB 和 GI1-LF, 可以大大提高反应速率和检测灵敏度。

相较于 RT-PCR 法来说, 实时 RT-LAMP 法最大的优点是实现了在 65°C 条件下恒温扩增, 使 GI 型诺如病毒的检测摆脱了对热循环仪器的依赖, 同时实时 RT-LAMP 法可通过肉眼观察钙黄绿素显色判定结果, 也可以用浊度仪直接读取结果, 节省了凝胶电泳的结果判定时间, 所以实时 RT-LAMP 方法虽然扩增原理复杂, 但是其操作简便、费时少、灵敏度高、特异性强, 再加上其恒温条件下扩增的优势, 比 RT-PCR 方法更适合于 GI 型诺如病毒样本的现场快速检测, 并有望成为常规检测手段。

参考文献

- [1] 杨爱青, 汪洋, 武玉平, 等. 2016 年淄博市一起送餐致医院内诺如病毒感染性腹泻爆发的调查[J]. 现代预防医学, 2018, 45(14): 2538-2541.
- [2] 寇晓霞, 吴爱武, 范宏英, 等. 广东省市售牡蛎中诺如病毒污染调查[J]. 现代预防医学, 2018, 45(24): 4439-4442.
- [3] 姚丽锋, 王小玉, 蔡教英, 等. 贝类中 GII 型诺如病毒的微滴式数字 PCR 定量检测方法[J]. 农产品质量与安全, 2019, (4): 20-25.
- [4] 姚丽锋, 王小玉, 蔡教英, 等. 贝类中 GII 型诺如病毒的微滴式数字 PCR 定量检测方法[J]. 农产品质量与安全, 2019, (4): 20-25.
- [5] 陈宗峰, 王滔, 黄祖新, 等. 逆转录环介导等温扩增技术在诺如病毒基因检测中的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(4): 340-343.
- [6] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [7] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [8] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [9] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [10] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [11] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [12] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [13] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [14] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [15] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [16] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [17] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [18] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [19] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [20] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [21] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [22] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [23] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [24] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [25] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [26] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [27] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [28] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [29] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [30] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [31] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [32] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [33] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [34] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [35] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [36] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [37] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [38] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [39] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [40] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [41] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [42] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [43] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [44] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [45] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [46] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [47] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [48] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [49] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [50] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [51] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [52] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [53] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [54] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [55] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [56] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [57] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [58] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [59] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [60] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [61] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [62] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [63] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [64] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [65] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [66] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [67] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [68] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [69] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [70] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [71] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [72] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [73] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [74] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [75] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [76] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [77] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [78] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [79] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [80] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [81] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [82] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [83] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [84] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [85] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [86] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [87] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [88] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [89] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [90] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [91] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [92] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [93] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [94] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [95] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [96] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [97] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [98] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [99] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.
- [100] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII 型诺如病毒的研究[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 49-53.

- 病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4692-4697.
- YANG LX, ZENG SS, ZHONG FF. Detection of 4 kinds of food-borne pathogenic bacteria by real-time loop-mediated isothermal amplification method [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(14): 4692-4697.
- [8] 郑兰, 高飞, 曹进, 等. 环介导等温扩增法检测动植物源性单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 550-555.
- ZHENG L, GAO F, CAO J, *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* in animal and plant derived food by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(2): 550-555.
- [9] 姜萌. 鹅细小病毒的分离鉴定及 LAMP 快速检测方法的建立[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- JIANG M. Separation and identification of GPV and establishment of rapid detection method for LAMP [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018.
- [10] 李环. RT-LAMP 检测扎伊尔型埃博拉病毒的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- LI H. Study on detection of Zaire Ebola virus by RT-LAMP [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2017.
- [11] 刘威, 李环, 邹大阳, 等. 用环介导等温扩增技术快速检测粪便样本中的沙门菌[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(2): 237-241.
- LIU W, LI H, ZOU DY, *et al.* Sensitive and rapid detection of *Salmonella* in stool samples by loop-mediated isothermal amplification [J]. Lett Biot, 2014, 25(2): 237-241.
- [12] 赵剑虹, 张登城, 高艳, 等. 基实时逆转录环介导等温扩增检测 GII.4 型诺如病毒的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(8): 945-948, 960.
- ZHAO JH, ZHANG DC, GAO Y, *et al.* Rapid detection of Norovirus genogroup II.4 by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Chin J Health Lab Technol, 2018, 28(8): 945-948, 960.
- [13] 田国宁, 张金玲, 李凯, 等. 水貂阿留申病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(6): 79-82.
- TIAN GN, ZHANG JL, LI K, *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of aleutian disease virus (ADV) [J]. Chin Anim Health Inspect, 2015, 32(6): 79-82.
- [14] 钟响, 刘鹏, 高娟娟, 等. 环介导恒温扩增法快速检测寨卡病毒[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2018, 41(5): 309-313.
- ZHONG X, LIU P, GAO JJ, *et al.* Rapid detection of Zika virus by using loop-mediated isothermal amplification [J]. Chin J Front Health Quarant, 2018, 41(5): 309-313.
- [15] 李巍, 杨卓, 陈明非, 等. LAMP 法鸟类性别鉴定的研究与应用[J]. 现代畜牧兽医, 2017, (3): 12-18.
- LI W, YANG Z, CHEN MF, *et al.* Research and application of LAMP in bird sex identification [J]. Mod J Anim Husb Vet Med, 2017, (3): 12-18.
- [16] 田瑶, 李佳昕, 杨莹, 等. 猪圆环病毒 1 型 LAMP 检测方法的建立及初步应用[J]. 山东农业科学, 2021, 53(3): 127-131.
- TIAN Y, LI JX, YANG Y, *et al.* Establishment and preliminary application of LAMP for detection of porcine circovirus type 1 [J]. Shandong Agr Sci, 2021, 53(3): 127-131.
- [17] 陈宇飞, 杨柳, 杜德伟, 等. 宠物食品中肉毒杆菌 LAMP 检测方法的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(4): 127-130, 143.
- CHEN YF, YANG L, DU DW, *et al.* Study on detection method for LAMP technique in clostridium botulinum of pet food [J]. Chin J Anim Sci, 2017, 53(4): 127-130, 143.
- [18] 白丹. 环介导等温扩增法对痰标本中结核分枝杆菌的检测效果评估[J]. 中国实用医药, 2021, 16(8): 201-203.
- BAI D. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples [J]. Chin Pract Med, 2021, 16(8): 201-203.
- [19] 曹科峰. 环介导等温扩增技术检测铜绿假单胞菌方法的建立及其应用[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2017.
- CAO KF. Rapid detections of *Pseudomonas aeruginosa* by loop-mediated isothermal amplification [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2017.
- [20] 杨柳, 陈宇飞, 王磊. 调味品中罂粟碱 LAMP 检测方法建立及试剂盒研制[J]. 中国调味品, 2017, 42(12): 158-161.
- YANG L, CHEN YF, WANG L. Construction of LAMP detection method for papaverine in seasoning powders and development of kit [J]. Chin Cond, 2017, 42(12): 158-161.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李 辉, 农艺师, 主要研究方向为分子生物学与植物检疫。
E-mail: hui87mr_li@163.com



李献刚, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: lixiangang07@126.com