

实时逆转录环介导等温扩增法快速检测 甲型肝炎病毒

李雪梅, 李献刚, 刘思宁, 刘沙, 夏雯, 杨婷, 孙沛, 隋华嵩, 李辉*

(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 建立甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)实时逆转录环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)快速检测方法。**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、模拟样品检测应用, 进行甲型肝炎病毒实时 RT-LAMP 法检测体系建立。**结果** 针对甲型肝炎病毒特异性基因, 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、快速地检测到甲型肝炎病毒。最佳检测温度为 63 °C, 最小检测限为 10 拷贝/μL, 且只对甲型肝炎病毒靶基因特异, 检测应用结果可靠。**结论** 实时 RT-LAMP 技术可以用于食品中甲型肝炎病毒的高效特异性检测, 为食品中甲型肝炎病毒的检测工作提供更加有效的技术保障。

关键词: 甲型肝炎病毒; 实时; 逆转录环介导等温扩增法; 快速检测

Rapid determination of hepatitis A virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

LI Xue-Mei, LI Xian-Gang, LIU Si-Ning, LIU Sha, XIA Wen, YANG Ting,
SUN Pei, SUI Hua-Song, LI Hui*

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

ABSTRACT: Objective To establish a rapid detection method for hepatitis A virus (HAV) by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **Methods** The real-time RT-LAMP detection system for hepatitis A virus was established by screening reaction primers, optimizing the detection temperature, studying the sensitivity and specificity, and detecting the application of simulated samples. **Results** Aiming at the hepatitis A virus specific gene, the optimal real-time RT-LAMP primer group was screened out by design, and the hepatitis A virus was detected specifically, sensitively and rapidly by using the primer group. The optimal detection temperature was 63 °C, and the minimum detection limit was 10 copies/μL, moreover, it was specific only for the target gene of hepatitis A virus, so the detection application result was reliable. **Conclusion** Real-time RT-LAMP technology can be used for efficient and specific detection of hepatitis A virus in food, which provides more effective technical support for the detection of hepatitis A virus in food.

KEY WORDS: hepatitis A virus; real-time; reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; rapid

基金项目: 辽宁出入境检验检疫局科研项目(LK17-2015)

Fund: Supported by the Scientific Research Project of Liaoning Entry-exit Inspection Quarantine Bureau (LK17-2015)

*通信作者: 李辉, 硕士, 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

*Corresponding author: LI Hui, Master, Agronomist, 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: hui87mr_li@163.com

detection

0 引言

甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)是急性病毒性肝炎的主要病因,该病毒属于小核糖核酸科肝病毒属,基因组由一个 7.5 千碱基的无包膜单股正链 RNA 分子组成,其开放阅读框(open reading frame, ORF)两侧有 3'和 5'非翻译区(untranslated region, UTRs)^[1-2]。甲型肝炎病毒的传播途径为粪口传播,主要通过摄入受污染的食物或水,或直接在人与人之间传播。与甲型肝炎病毒相关的食物包括牡蛎和蛤蜊、草莓、覆盆子、蓝莓、枣、绿叶蔬菜和半干番茄等^[3-6]。

目前,我国食品检测标准 GB/T 22287—2008《贝类中甲型肝炎病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法》和 SN/T 4784—2017《出口食品中诺如病毒和甲肝病毒检测方法 实时 RT-PCR 方法》中,用于甲型肝炎病毒检测的方法主要为实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time fluorescent 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。实时 RT-LAMP 技术利用链置换 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^[5-7]。本研究利用实时 RT-LAMP 技术,使用筛选的特异性基因 *VPI* 设计特异性引物组^[7],建立甲型肝炎病毒的快速检测体系,同时与 RT-PCR 检测方法进行灵敏性比对,旨在为食品中甲型肝炎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

本研究所用到的阳性样本甲型肝炎病毒的靶基因核酸质粒采用人工合成的方式,核酸序列 GenBank 编号为:KF233561.1,由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒核酸由中国人民解放军军事医学科学院保存并提供;模拟样本检测实验使用的 4 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(分子生物学级,美国 Sigma 公司);三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)[分子生物学级,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)(分子生物学级,北京美莱博医学科技有限公司);脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)(分子生物学级,美国 Pharmacia 公司);2×Taq 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);MS2 过程控制试剂盒(MS2 Process Control LR73141)(北京良润生物科技有限公司)。

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 实时 RT-LAMP 反应引物的设计

选择甲型肝炎病毒编码外壳蛋白 VP1 的基因为特异靶基因,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(<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)^[8-11]。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.2 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 (pH 8.8)、1.4 mmol/L dNTP、10 mmol/L KCl、10 mmol/L (NH₄)₂SO₄、8 mmol/L MgSO₄、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、8 U Bst DNA 聚合酶和逆转录酶。将混合物置于 65 °C 恒温反应 60 min 左右,以双蒸水为阴性对照。

1.2.3 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^[12]。

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。

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×Taq Mix。扩增循环条件为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s;55 °C 退火 30 s;72 °C 延伸

30 s, 共 40 个循环, 最后 72 °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, 在凝胶成像系统下检测^[13]。

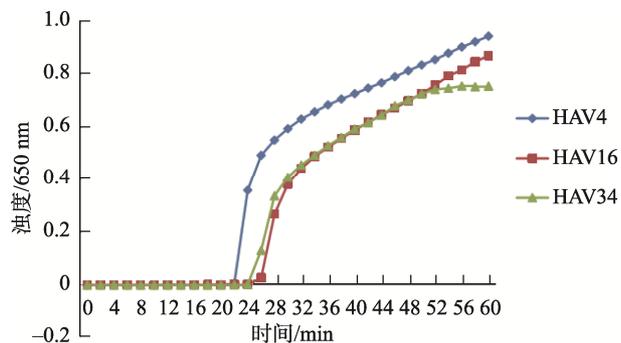
1.2.5 模拟样本检测实验

选择 4 份未污染甲型肝炎病毒的贝类样本, 分别取 1 g 贝类消化器官均质液, 样本 1 和 2 中添加 5 μL 浓度为 1×10⁵ 拷贝/μL 的甲型肝炎病毒靶基因核酸质粒, 样本 3 和 4 作为阴性对照, 分别提取 4 份样品的甲型肝炎病毒基因组 RNA, 具体提取方法详见 RNA 提取试剂盒使用说明书, 使用 MS2 噬菌体作为核酸提取的过程质控品, 保证核酸提取效率大于 1%, 具体质控方法详见 MS2 过程控制试剂盒使用说明书^[14]。

2 结果与分析

2.1 最佳实时 RT-LAMP 引物的筛选

按上述 25 μL 体系配制反应液, 以甲型肝炎病毒靶基因核酸作为模板, 使用网站设计的评分较高的 3 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, 与 HAV16 引物和 HAV34 引物相比, HAV4 引物的扩增效率最高, 说明 HAV4 引物为扩增靶基因的最佳实时 RT-LAMP 引物^[10]。HAV4 引物组合的序列和设计图示如表 1 和图 2 所示。



注: 650 nm 表示实时浊度仪检测焦磷酸镁沉淀浊度的波长, 下同。

图 1 最佳实时 RT-LAMP 引物的筛选结果

Fig.1 Screening results of the best primers for real-time RT-LAMP

表 1 最佳引物组合序列
Table 1 Optimal primer combination sequences

引物	序列(5'-3')
HAV4-F3	TTGCTATTTGTCTGTCACAG
HAV4-B3	GTTTCCCAACTTCTAATCTCAA
HAV4-FIP	TGATTCAGTGGATAACATGGCAT+CAATCAGAG TTTTATTTCCAG
HAV4-BIP	GACTTGGAGTCATCAGTGGATGAT+TTTATATG GCTTCCTGCATTC
HAV4-LB	CCTAGATCAGAGGAGGACAAAAGA

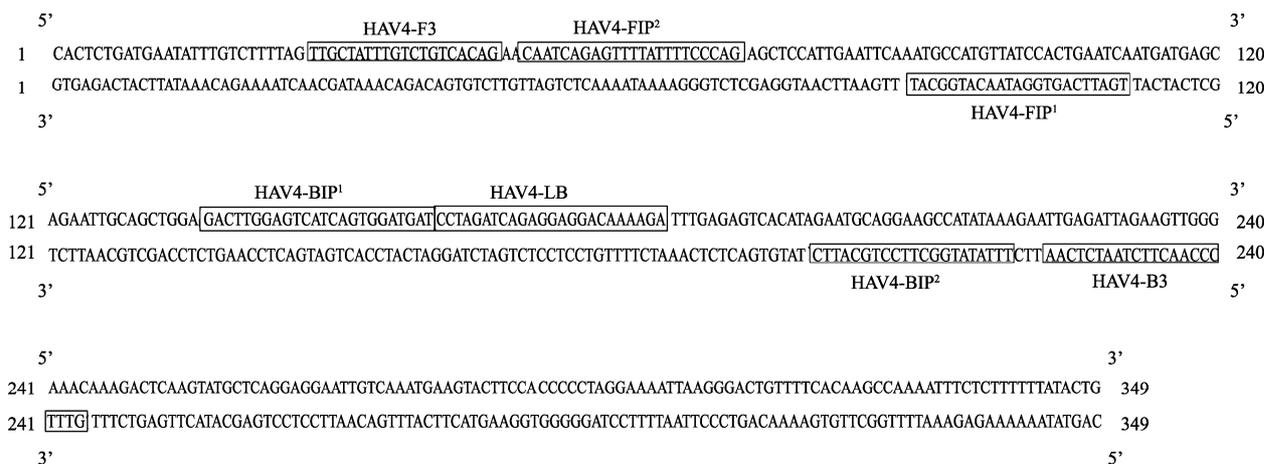


图 2 最佳引物组合设计的图示说明

Fig.2 Graphical description of optimal primer combination design

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 HAV4 引物, 进行最佳实时 RT-LAMP 反应温度筛选, 温度筛选范围为 60~67 °C, 梯度为 1 °C^[15], 如图 3 所示, 实验结果表明 60~67 °C 时均发生了 LAMP 反应, 且 63 °C 时最早发生扩增反应, 浊度值较高, 扩增效率最高, 所以最佳温度定位为 63 °C。

2.3 特异性检测实验

以甲型肝炎病毒为阳性对照, 使用最佳引物组 HAV4 对乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒等对照样本核酸进行实时 RT-LAMP 实验, 由图 4 的实验结果可知: 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 HAV4 引物具有较好的特异性, 可以特异性地检测甲型肝炎病毒。

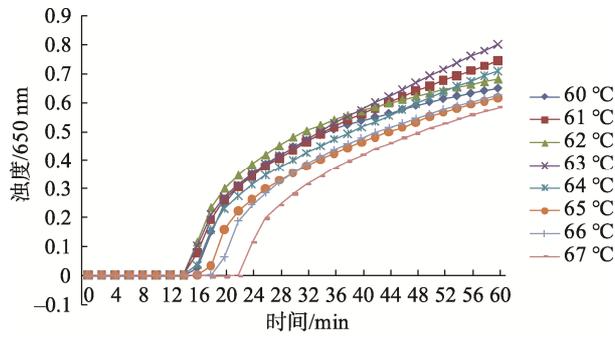


图3 最佳实时 RT-LAMP 反应温度的筛选结果

Fig.3 Screening results of the best real-time RT-LAMP reaction temperature

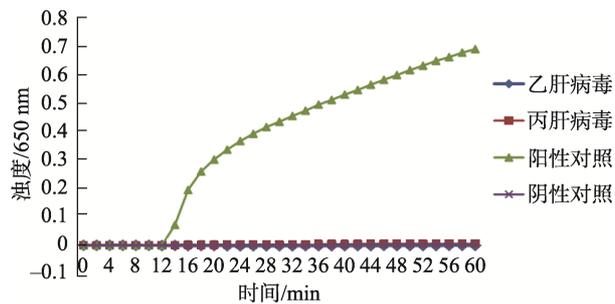
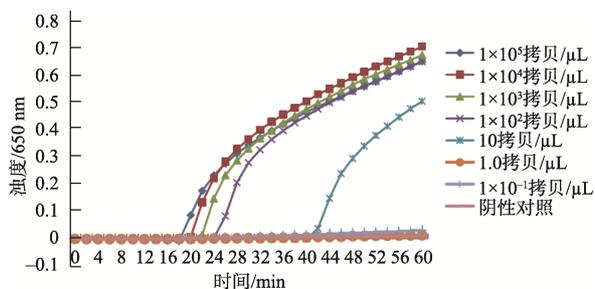


图4 实时 RT-LAMP 特异性检测实验结果

Fig.4 Experimental results of specific detection of real-time RT-LAMP

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^[16], 检测结果如图 5 和图 6 所示, 表明实时 RT-LAMP 浊度法与染色法实验结果一致, 对甲型肝炎病毒的最低检测浓度为 10 拷贝/ μL 。

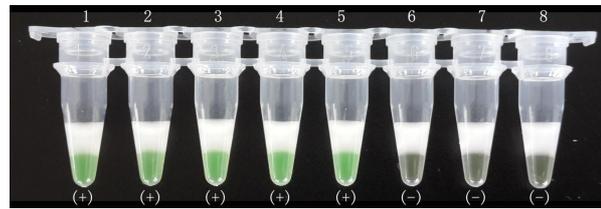


注: 650 nm 表示实时浊度仪检测焦磷酸镁沉淀浊度的波长, 下同。

图5 实时 RT-LAMP 浊度法敏感性检测实验结果

Fig.5 Sensitivity test results of real-time RT-LAMP turbidimetric method

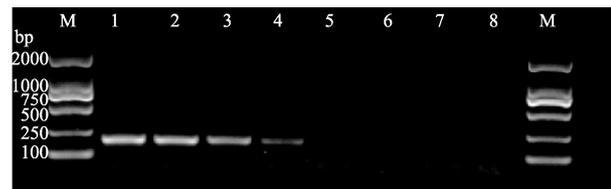
将 10 倍梯度稀释的质粒用于 RT-PCR 反应, 结果见图 7。引物为 HAV4-F3、HAV4-B3, RT-PCR 法的引物应用的为最佳实时 RT-LAMP 引物的 F3 和 B3, 这样才能更准确地比较二者的敏感性。结果显示, RT-PCR 法最低检测浓度为 100 拷贝/ μL , 远低于实时 RT-LAMP 法的检测灵敏度。



注: 1: 1×10^5 拷贝/ μL ; 2: 1×10^4 拷贝/ μL ; 3: 1×10^3 拷贝/ μL ; 4: 1×10^2 拷贝/ μL ; 5: 10 拷贝/ μL ; 6: 1.0 拷贝/ μL ; 7: 1×10^{-1} 拷贝/ μL ; 8: 阴性对照; (+)为有反应; (-)为无反应。

图6 实时 RT-LAMP 染色法敏感性检测实验结果

Fig.6 Sensitivity test results of real-time RT-LAMP staining method



注: M: D2000 DNA Marker; 1: 1×10^5 拷贝/ μL ; 2: 1×10^4 拷贝/ μL ; 3: 1×10^3 拷贝/ μL ; 4: 1×10^2 拷贝/ μL ; 5: 10 拷贝/ μL ; 6: 1.0 拷贝/ μL ; 7: 1×10^{-1} 拷贝/ μL ; 8: 阴性对照。

图7 RT-PCR 法敏感性检测实验结果

Fig.7 Sensitivity test results of RT-PCR method

2.5 模拟样本检测实验

将提取的 4 份样本 RNA 作为检测模板, 使用最佳引物组合 HAV4, 在 63 °C 条件下进行 2 次重复实验, 检测结果如图 8 所示, 添加甲型肝炎病毒毒基因核酸质粒的样本 1 和 2 发生实时 RT-LAMP 反应, 而对对照样本 3 和 4 未发生实时 RT-LAMP 反应, 表明实时 RT-LAMP 法能够用于食品中甲型肝炎病毒的检测。

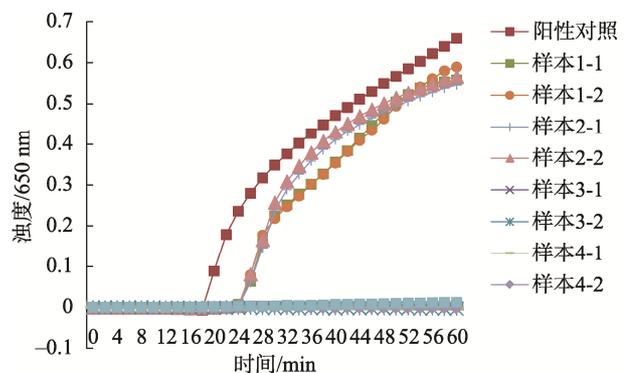


图8 模拟样本检测实验结果

Fig.8 Experimental results of simulated sample detection

3 结论与讨论

近年来, LAMP 已被应用于病原的检测中, 如 GI 型诺

如病毒^[17]、1 型鸭甲型肝炎病毒、3 型鸭甲型肝炎病毒^[18]、戊型肝炎病毒^[19]等, 海关系统也制定发布了多种常见致病菌的 LAMP 检测行业标准^[20], 本研究针对食源性甲型肝炎病毒特异基因, 设计筛选出最佳引物组 HAV4, 能够在 63 °C 条件下快速灵敏地检测甲型肝炎病毒, 最小检测限量值为 10 拷贝/ μ L, 检测灵敏度比 RT-PCR 法高 10 倍, 且只对甲型肝炎病毒靶基因特异。

本研究通过靶序列上的 6 个独立区域设计 4 条引物 HAV4-FIP、HAV4-BIP、HAV4-F3、HAV4-B3, 能特异性地检测甲型肝炎病毒, 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, 假阳性出现的概率也随之降低, 同时增加了 1 条环引物 HAV4-LB, 可以大大提高反应速率和检测灵敏度^[21-22]。相较于 RT-PCR 法来说, 实时 RT-LAMP 法最大的优点是实现了在 63 °C 条件下恒温扩增, 使甲型肝炎病毒的检测摆脱了对热循环仪器的依赖, 同时可通过肉眼观察钙黄绿素显色或浊度仪直接读取结果, 省去了凝胶电泳分析的步骤, 所以实时 RT-LAMP 方法虽然扩增原理复杂, 但其实现了从扩增到检测的一管式反应体系, 简化了操作及结果判定的时间, 降低了实验室污染的风险, 再加上其恒温条件下扩增的优势, 相对于传统 RT-PCR 体系应用门槛更低, 为食源性甲型肝炎病毒样本的检测推广和普及提供了更加便捷的技术手段。

参考文献

- [1] SOFIA P, ERIK A, MANS K, *et al.* A new assay for quantitative detection of hepatitis A virus [J]. *J Vir Meth*, 2021, 288: 114010.
- [2] D'ANDREA L, P'EREZ-RODRI'GUEZ FJ, CASTELLAMAU MD, *et al.* Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 6842-6854.
- [3] MACALUSO G, GUERCIO A, GUCCIARDI F, *et al.* Occurrence of human enteric viruses in shellfish along the production and distribution chain in Sicily, Italy [J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1384.
- [4] ENKIRCH T, ERIKSSON R, PERSSON S, *et al.* Hepatitis A outbreak linked to imported frozen strawberries by sequencing, Sweden and Austria, June to September 2018 [J]. *Eurosurveillance*, 2018, 23(41): 1800528.
- [5] SCAVIA G, ALFONSI V, TAFFON S, *et al.* A large prolonged outbreak of hepatitis A associated with consumption of frozen berries, Italy, 2013-14 [J]. *J Med Microbiol*, 2017, 66(3): 342-349.
- [6] HERMAN K, HALL A, GOULD L. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012 [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(14): 3011-3021.
- [7] 林盈池, 李辉. 甲型肝炎病毒特异性结构蛋白 VP1 生物信息学分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(4): 423-425.
LIN YC, LI H. Bioinformatics analysis of specific structural protein VP1 of hepatitis A virus [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2021, 31(4): 423-425.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 尹志涛, 李娜, 袁静, 等. 基于颜色判定的环介导恒温扩增法快速检测结核分枝杆菌[J]. *军事医学*, 2013, 37(8): 619-623.
YIN ZT, LI N, YUAN J, *et al.* Colorimetric detection of mycobacterium tuberculosis by loop mediated isothermal amplification method [J]. *Military Med Sci*, 2013, 37(8): 619-623.
- [13] 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.
- [14] 徐蕾蕊, 魏海燕, 马丹, 等. MS2 噬菌体在贝类食源性病毒检测中过程质控应用[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(11): 1584-1590.
XU LR, WEI HY, MA D, *et al.* Application of MS2 phage in process control in detection of food borne virus in shellfishes [J]. *Chin J Public Health*, 2016, 32(11): 1584-1590.
- [15] 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.
- [16] 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]. *China Cond*, 2017, 42(12): 158-161.
- [17] 李辉, 李雪梅, 刘沙, 等. 实时逆转录环介导等温扩增法快速检测 GI 型诺如病毒[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(9): 3739-3743.
LI H, LI XM, LIU S, *et al.* Rapid determination of norovirus genogroup I by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(9): 3739-3743.
- [18] 张映. 1 型和 3 型鸭甲型肝炎病毒逆转录环介导等温扩增检测研究[D]. 北京: 中国兽医药品监察所, 2016.
ZHANG Y. Study on detection of duck hepatitis A virus types 1 and 3 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [D]. Beijing: China Institute of Veterinary Drugs Control, 2016.
- [19] 付红伟. 戊型肝炎规范化实验室诊断模式的建立[D]. 天津: 天津医科大学, 2016.
FU HW. The establishment of standardization diagnostic procedure for

- hepatitis E [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2016.
- [20] 谢进维, 张雪峰, 辛玉璇, 等. 构建染料显色 RT-LAMP 方法检测食源性 HAV 和 HEV 病毒的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(6): 686-690, 709.
- XIE JW, ZHANG XF, XIN YX, *et al.* Creating a dye-based RT-LAMP technique to detect foodborne HAV and HEV [J]. *J Pathog Biol*, 2019, 14(6): 686-690, 709.
- [21] 袁桂清. 临床检验诊断研究的科研设计及其评价[A]. 中国人民解放军医学检验学会. 第十届全军检验医学学术会议论文汇编[C]. 中国人民解放军医学检验学会: 中国人民解放军医学科学技术委员会医学检验专业委员会, 2005.
- YUAN GQ. Scientific research design and evaluation of clinical laboratory diagnosis research [A]. Medical laboratory society of the Chinese people's Liberation Army. Compilation of papers of the 10th military Laboratory Medicine Academic Conference [C]. Medical laboratory society of the Chinese people's Liberation Army: Medical Laboratory Professional Committee of the Medical Science and Technology Committee of the Chinese People's Liberation Army, 2005.
- [22] 李琳, 周蓉, 李冰, 等. 环介导恒温核酸扩增法在病原微生物快速检测

领域的应用[J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 301-307.

LI L, ZHOU R, LI B, *et al.* Application of loop-mediated isothermal amplification on pathogens rapid detection [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, 30(6): 301-307.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介

李雪梅, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: lxmcq@163.com

李 辉, 硕士, 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