

引用格式:

蒋金葵, 张白玉, 杨锐, 颜其贵. 大熊猫轮状病毒可视化 LAMP 检测技术的建立及应用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(1): 49–54 .

JIANG J Z, ZHANG B Y, YANG R, YAN Q G . Establishment and application of visual LAMP detection technology for giant panda rotavirus[J] .Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences) ,2021 ,47(1) : 49–54 .

投稿网址 : <http://xb.hunau.edu.cn>



大熊猫轮状病毒可视化 LAMP 检测技术的建立及应用

蒋金葵, 张白玉, 杨锐, 颜其贵*

(四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要 根据大熊猫轮状病毒 CH-1 株 VP4 基因设计 3 对引物, 建立大熊猫轮状病毒可视化环介导等温扩增(LAMP) 检测技术, 对其反应条件进行优化及特异性和灵敏度进行验证。结果表明: 用可视化 LAMP 方法检测大熊猫轮状病毒时, 在 62 °C 条件下, 反应体系中加入终浓度为 8 mmol/L Mg²⁺、0.6 mol/L 甜菜碱、12 U *Bst* DNA 聚合酶和 1×LAMP 可见光染料, 扩增 40 min 后, 阳性样本颜色由紫色变为蓝色, 电泳分析扩增产物可观察到明显的梯状条带; 用建立的 LAMP 方法对大熊猫轮状病毒进行扩增, 特异性好; 其批内及批间的变异系数均小于 1%, 重复性好; 其最低检测限为 5×10⁻⁵ ng/μL RNA, 灵敏度比常规 PCR 高约 100 倍; 采用该方法检测 50 份大熊猫粪便样的轮状病毒, 共检测到阳性样本 22 份, 比常规 PCR 方法检测到的阳性样本多 5 份, 与荧光定量 PCR 方法的吻合度为 100%。可见, 用 LAMP 方法检测大熊猫轮状病毒具有操作简便、反应时间短、特异性强、结果判定快速等特点, 可用于临床上大熊猫轮状病毒的快速检测。

关键词: 大熊猫; 轮状病毒; CH-1 株; VP4 基因; 病毒检测; 环介导等温扩增(LAMP); 特异性; 灵敏性

中图分类号: S858.93; S852.65⁺9.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2021)01-0049-06

Establishment and application of visual LAMP detection technology for giant panda rotavirus

JIANG Jinzhen, ZHANG Baiyu, YANG Rui, YAN Qigui*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: In this study, three pairs of primers were designed based on the VP4 gene of giant panda rotavirus strain CH-1. A loop-mediated isothermal amplification(LAMP) detection technique of giant panda rotavirus was developed to optimize the reaction conditions and verify its specificity and sensitivity. The results showed that under the condition of 62 °C, to join the final concentration of 8 mmol/L Mg²⁺, 0.6 mol/L betaine, 12 U DNA polymerase, ladder banding could be observed clearly after 40 min amplification. 1×LAMP visible light dye was added into the system to directly judge the amplification result by color change. When positive amplification occurred, the sample color changed from purple to blue. The LAMP detection was of high specificity and only amplified for giant panda rotavirus. The coefficient of variation within and between batches was less than 1%. With a sensitivity 100 times higher than that of conventional PCR and a minimum detection limit of 5×10⁻⁵ ng/μL RNA. The method was used to detect rotavirus in 50 samples of giant panda feces, and a total of 22 positive samples were detected, which was 100% consistent with the fluorescence quantitative PCR method. In summary, this method is simple to operate, short reaction time, strong specificity and fast result determination, and can be used for rapid detection of giant panda rotavirus in clinic.

收稿日期: 2020-01-03

修回日期: 2020-03-22

基金项目: 成都大熊猫繁育研究基金会项目(CPF 研 2012-12)

作者简介: 蒋金葵(1996—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事微生物与免疫研究, J_jinzen@163.com; *通信作者, 颜其贵, 主要从事动物传染病研究, yanqigui@126.com

Keywords: giant panda; rotavirus; CH-1; VP4 gene; virus detection; loop-mediated isothermal amplification(LAMP); specificity; sensitivity

王成东等^[1]从大熊猫粪便中分离出1株A组轮状病毒(rotavirus, RV),命名为大熊猫轮状病毒(GPRV)CH-1株。GPRV主要感染幼龄大熊猫(5~11月龄),引起幼龄大熊猫腹泻甚至死亡。由于成年动物感染RV多为隐性经过,并持久地向外界排毒,RV对环境因子和许多常见消毒剂有较强抵抗力,导致某一地方发病,随后每年会连续发生^[2],这对大熊猫的繁育、健康及野化放归带来重大威胁。

目前,针对GPRV已建立常规PCR^[3]及荧光定量PCR^[4]检测方法,具有特异、敏感、高通量等特点。曾杨茹等^[5]使用上述2种方法对2011、2012、2013、2015年的共227份大熊猫粪便GPRV携带情况进行检测,利用荧光定量PCR检出阳性率为11%,而常规PCR检出阳性率仅为6.6%。及早发现GPRV感染,更早接受治疗,可降低病毒传播和死亡风险^[6]。荧光定量PCR对设备及实验条件要求过高,不能广泛推广;因此,加强对GPRV感染的监测和开发简单、快速、高灵敏度的实验室诊断方法是当务之急。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是在等温(60~65℃)条件下,由2对特异性引物针对靶基因的6个不同区域进行特异性识别,在DNA聚合酶的作用下,短时间(通常少于1h)内进行核酸扩增,其结果可直接肉眼观察^[7-8]。研究^[9]发现,在LAMP反应中加入环引物,能明显加快扩增速度,提高检测效率。本研究中,笔者根据GPRV CH-1株VP4基因设计引物,建立GPRV可视化LAMP方法,并对其反应条件进行优化,以期利用LAMP方法快速、有效的诊断GPRV的早期感染和隐性感染。

1 材料与方法

1.1 供试病毒株

供试的GPRV CH-1株、大熊猫犬瘟热病毒(CDV)、犬细小病毒(CPV)均由四川农业大学动物医学院动物微生物与免疫研究室分离和保存。

1.2 引物设计与合成

参照GenBank中GPRV VP4基因保守区域序列

(登录号为HQ641296),使用Primer Explorer V4(<http://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>)设计3对LAMP引物。具体引物信息列于表1。选取VP4基因上的2段高度保守序列设计常规PCR引物。上游引物为5'-TGGCTTCGCTCATTATAGACA-3',下游引物为5'-TTGTGTCTGTGACGTATTCT-3',产物长度为409 bp。引物由成都擎科生物技术有限公司合成。

表1 LAMP扩增引物序列

Table 1 The primers for LAMP

引物	序列(5'-3')
F3	CATTTCGCACAAACAGGTTA
B3	GCCAACCATCTATCGGTAT
FIP	TATGGACCATCTAATAACGGCTCG-GCACCAGTT-AATTGGGGA
BIP	CCACTTTCAATCCACCAACAAGC-TTCCTTGAAT-AATTACGCCCTC
Loop F	AGTTGTGGAGTCATTAGTCTCACCT
Loop B	TATTGGGTACTACTTGCGCCAACTG

1.3 病毒基因组RNA的提取和反转录

按照MAGEN病毒RNA提取试剂盒操作说明书,提取GPRV的总RNA,置于-80℃保存。按照宝生物(Takara)反转录试剂盒说明书制备cDNA。

1.4 LAMP方法的建立

采用25 μL体系扩增,其组分和终浓度分别为1×Isothermal Amplification Buffer(纽英伦)、1×LAMP可见光染料(天恩泽)、0.2 μmol/L F3和B3,1.6 μmol/L FIP和BIP、0.4 μmol/L Loop F和Loop B、8.0 mmol/L MgSO₄(纽英伦)、1.6 mmol/L dNTPs(纽英伦)、8 U *Bst* DNA聚合酶(纽英伦)、0.4 mol/L甜菜碱、1 μL cDNA模板,加ddH₂O至25 μL。以MA104细胞RNA为阴性对照和ddH₂O为空白对照同时进行反应。反应温度为65℃,反应时间为40 min。反应结束后,80℃加热2 min终止反应。同时,用2%琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

1.5 LAMP反应条件的优化

在其他条件不变的情况下,分别调整LAMP反应体系中Mg²⁺终浓度为2、4、6、8、10 mmol/L,或甜菜碱终浓度为0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L,

或 *Bst* DNA 聚合酶终浓度为 4、8、12、16 U，或反应温度为 60、61、62、63、64、65 °C 进行扩增。反应结束后，各取 5 μ L 进行电泳鉴定，依据条带的清晰度确定 Mg^{2+} 、甜菜碱和 *Bst* DNA 聚合酶的最佳反应浓度及最佳反应温度。

1.6 特异性和重复性检测

分别以 GPRV、CDV、CPV 为模板，采用建立并优化的 LAMP 方法进行检测，检验其对 GPRV 的特异性。选择高(50 ng/ μ L)、中(5 ng/ μ L)、低(0.5 ng/ μ L) 3 个不同浓度的病毒 RNA 为模板，进行批内及批间试验，评估该方法检测 GPRV 试验的重复性和稳定性。每个样品重复 10 次。

1.7 灵敏性检测

为确定 LAMP 的最低检测限度，先用分光光度计测定 GPRV 的 RNA 浓度，再通过 10 倍倍比稀释，将 RNA 稀释成 50、5、 5×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 5×10^{-7} ng/ μ L 共 9 个梯度浓度；按优化的 LAMP 体系进行反转录；扩增结束后，分别进行可见光染料颜色变化观察及 2% 琼脂糖凝胶电泳扩增产物。

用分光光度计测定 GPRV 的 cDNA 浓度，再通过 10 倍倍比稀释，将 cDNA 稀释 10 个梯度浓度。按优化的 LAMP 体系，对 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 的 5 个梯度浓度的 GPRV cDNA 进行 LAMP 扩增。同时，利用常规 PCR 引物，对 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 的 5 个梯度浓度的 GPRV cDNA 进行常规 PCR 检测。常规 PCR 检测采用 25 μ L 体系进行扩增，其组分和用量为 1 \times T3 PCR Mix 22 μ L(擎科)、上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、cDNA 模板 1 μ L。常规 PCR 检测扩增程序为：98 °C 预变性 2 min；98 °C 循环变性 10 s，55 °C 退火 15 s，72 °C 延伸 15 s，34 个循环；72 °C 未延伸 2 min；4 °C 保存。扩增结束后，各取 5 μ L 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，观察结果。

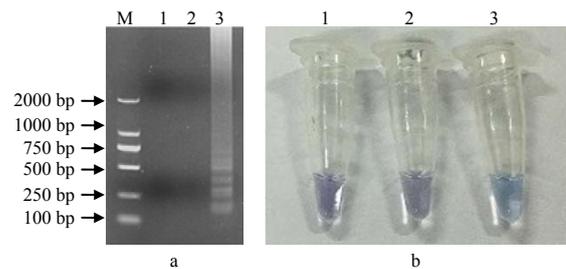
1.8 临床样品检测

利用优化好的 LAMP 方法及常规 PCR 方法，对 50 份大熊猫腹泻粪便样本进行 GPRV 病原检测，以 GPRV CH-1 株作为阳性对照，ddH₂O 作为阴性对照。采用荧光定量 PCR 方法^[6]验证。

2 结果与分析

2.1 采用 LAMP 方法检测 GPRV 的结果

图 1-a 所示，以 GPRV CH-1 株 cDNA 为模板的扩增结果出现大小不同的梯状条带，而阴性对照(MA104 细胞)和空白对照(ddH₂O)没有任何条带。图 1-b 所示，以 GPRV CH-1 株 cDNA 为模板的阳性扩增样品的颜色从紫色变为蓝色，而阴性对照和空白对照未见颜色变化。



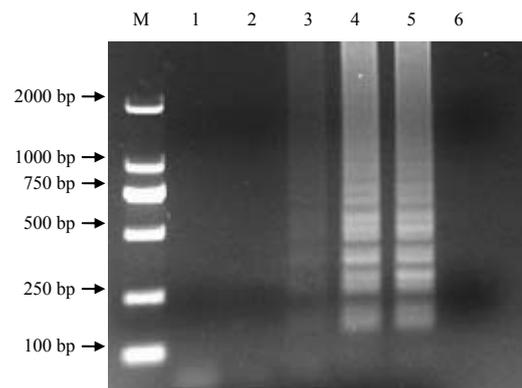
M DNA Marker；1 阴性对照；2 空白对照；3 CH-1。

图 1 LAMP 方法检测 GPRV 的结果

Fig.1 The results of GPRV detected by LAMP

2.2 LAMP 反应条件的优化结果

图 2 所示，当 Mg^{2+} 浓度为 2、4 mmol/L 时，无法实现目的基因的扩增；当 Mg^{2+} 浓度为 6 mmol/L 时，梯状条带不清晰，扩增效率较低；当 Mg^{2+} 浓度为 8、10 mmol/L 时，条带清晰，扩增效果达到最佳。可见，最适 Mg^{2+} 浓度为 8.0 mmol/L。



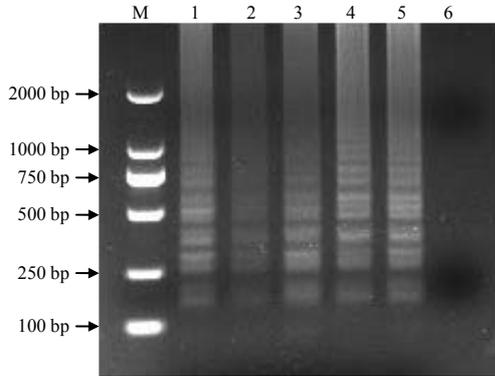
M DNA Marker；1~5 分别为反应体系中 Mg^{2+} 终浓度为 2、4、6、8、10 mmol/L 的处理；6 空白对照。

图 2 LAMP 方法的反应体系中不同 Mg^{2+} 浓度的电泳结果

Fig.2 The electrophoresis results of different concentrations of Mg^{2+} in the LAMP reaction system

图 3 所示，不添加甜菜碱时也能出现较明显的扩增条带。当甜菜碱浓度为 0.2、0.4 mol/L 时，其梯状条带比不添加甜菜碱更弱，其扩增效率更低，

这可能是低浓度甜菜碱对 LAMP 反应有一定的抑制作用；随后，随着甜菜碱浓度的增加，扩增效率提高，条带清楚明亮，在甜菜碱浓度为 0.6 mol/L 时，比甜菜碱浓度为 0.8 mol/L 和不添加时更清晰，但无法说明高浓度甜菜碱对 LAMP 反应有影响。可见，最适甜菜碱浓度为 0.6 mol/L。

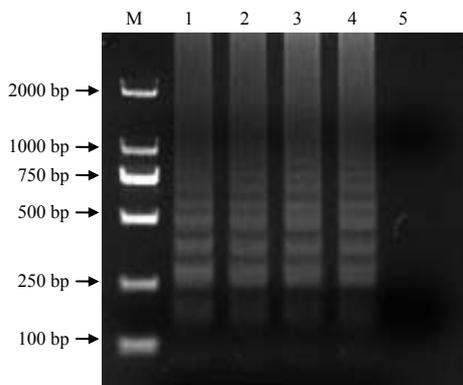


M DNA Marker ; 1~5 分别为反应体系中甜菜碱终浓度为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L 的处理；6 空白对照。

图3 LAMP 方法的反应体系中不同甜菜碱浓度的电泳结果

Fig.3 The electrophoresis results of different concentrations of betaine in the LAMP reaction system

图 4 所示，*Bst* DNA 聚合酶对 LAMP 扩增的影响不大，低浓度酶扩增的条带与高浓度酶扩增的条带相差不大，但为了保证扩增效率，选择终浓度 12 U 为最适 *Bst* DNA 聚合酶浓度。

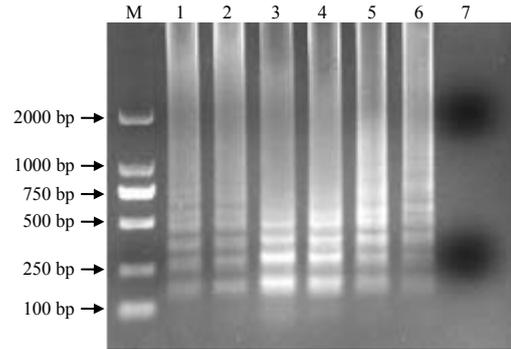


M DNA Marker ; 1~4 分别为反应体系中 *Bst* DNA 聚合酶终浓度为 4、8、12、16 U 的处理；5 空白对照。

图 4 LAMP 方法的反应体系中不同 *Bst* DNA 聚合酶浓度的电泳结果

Fig.4 The electrophoresis results of different concentrations of *Bst* polymerase in the LAMP reaction system

图 5 所示，在 60~65 °C 时，均能发生扩增，62 °C 时，扩增出的梯状条带较其他温度的扩增条带更清晰明亮。选择 62 °C 为最适反应温度。



M DNA Marker ; 1~6 分别为反应温度为 60、61、62、63、64、65 °C 的处理；6 空白对照。

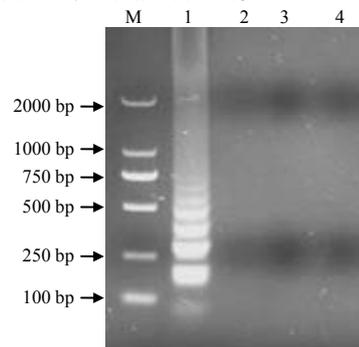
图 5 LAMP 方法的不同反应温度的电泳结果

Fig.5 The electrophoresis results of different temperature in the LAMP reaction system

经过对 LAMP 反应体系的条件优化，其最佳反应条件为：25 μL 体系的组分和终浓度分别为 1×Isothermal Amplification Buffer、1×LAMP 可见光染料、0.2 μmol/L F3 和 B3、1.6 μmol/L FIP 和 BIP、0.4 μmol/L Loop F 和 Loop B、1.6 mmol/L dNTPs、8.0 mmol/L MgSO₄、0.6 mol/L 甜菜碱、12 U *Bst* DNA 聚合酶、1 μL cDNA 模板，加 ddH₂O 至 25 μL；反应温度为 62 °C；反应时间为 40 min；反应结束后 80 °C 加热 2 min 终止反应。

2.3 供试方法的特异性和重复性

由图 6 可知，只有在 GPRV cDNA 为模板时，才会出现有梯状条带的阳性扩增。可见，所建立的 LAMP 方法特异性良好。重复性试验显示，批内及批间的变异系数均小于 1%，说明该方法的重复性好，可进行稳定、可靠的检测。



M DNA Marker ; 1 GPRV ; 2 CDV ; 3 CPV ; 4 空白对照。

图 6 LAMP 方法的特异性检测结果

Fig.6 The result of specific detection of LAMP

2.4 供试方法的灵敏性

从图 7 可知，LAMP 方法能检测到的最低 RNA

浓度为 5×10^{-5} ng/ μ L, 管中颜色变化明显, 与凝胶电泳结果一致(图 8)。图 9 所示, LAMP 方法能扩增稀释到 10^{-9} 梯度浓度的 cDNA, 而常规 PCR 方法

仅能扩增稀释到 10^{-7} 梯度浓度的 cDNA。该结果表明, LAMP 方法的灵敏性较常规 PCR 方法高约 100 倍。

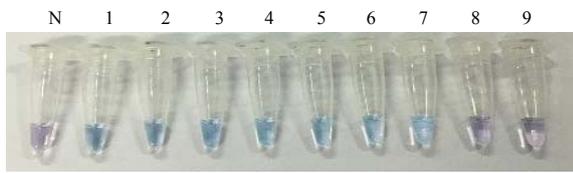
2.5 LAMP 方法的应用

对 50 份大熊猫粪便样本进行 RV 检测, 常规 PCR 检测到阳性样本 17 份, 阳性率为 34%; LAMP 检测到阳性样本 22 份, 阳性率为 44%; LAMP 方法比常规 PCR 方法多检出 5 份阳性样本。荧光定量 PCR 方法检测到阳性样本 22 份, LAMP 方法的检测结果与其吻合度为 100%。

3 结论与讨论

本研究中, 在优化 LAMP 方法检测 GPRV RNA 的 4 个反应因素中, Mg^{2+} 浓度对该方法的影响最大。当 Mg^{2+} 浓度小于 6 mmol/L 时, 靶基因无法扩增。这主要是由于 Mg^{2+} 在反应中的作用是形成 dNTP-Mg 络合物与核酸骨架相互作用, 稳定碱基形成中的中间体, 影响 *Bst* 聚合体^[10-11]。甜菜碱在 LAMP 反应中不是绝对必要的, 不添加甜菜碱的扩增带比添加低浓度甜菜碱的扩增带更清晰, 但随着甜菜碱浓度的增加, 当浓度达到 0.6 mol/L 时得到了合适的扩增。然而, 由于甜菜碱对酶的活性有稳定作用, 这也增强了反应的特异性^[12], 所以在 LAMP 反应体系中加入 0.6 mol/L 甜菜碱。*Bst* DNA 聚合酶的浓度对反应影响不大, 低浓度的酶也能扩增出清晰的条带, 与高浓度时的条带无明显差异。为保证加样的准确性和扩增效率, 在 LAMP 反应体系中加入 12 U *Bst* DNA 聚合酶。与常规 PCR 不同, 温度对 LAMP 的影响不是对核酸的影响, 而是对 *Bst* 聚合酶的影响^[13]。在 60~65 °C 时均可产生扩增条带, 适用于温度控制较差的地区。

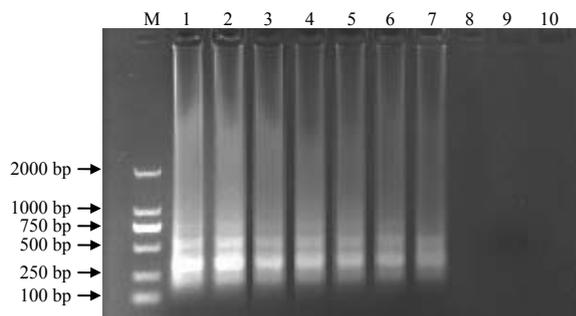
本研究建立的 LAMP 反应对大熊猫感染的犬瘟热病毒、细小病毒等无交叉反应, 只能扩增出 RV。可见, LAMP 方法对 RV 基因组有高度特异性。LAMP 反应灵敏度高, RV RNA 的检测限为 5×10^{-5} ng/ μ L, 其灵敏度是常规 PCR 的 100 倍。虽然 LAMP 的高灵敏度使其易受气溶胶诱导的假阳性, 但为了避免二次开盖污染的风险, 选择 LAMP 可见光染料, 可直接添加到反应体系中, 颜色的变化可直接用肉眼观察。对 50 份大熊猫粪便样本的 RV 携带情况检测发现, 常规 PCR 和 LAMP 均检测到的阳性样本 17 份, 另有 5 份样本仅使用 LAMP 检测到阳



1~9 示 50 、 5 、 5×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 5×10^{-7} ng/ μ L RNA 的处理; N 空白对照。

图 7 LAMP 方法的最低检测限测定可视化结果

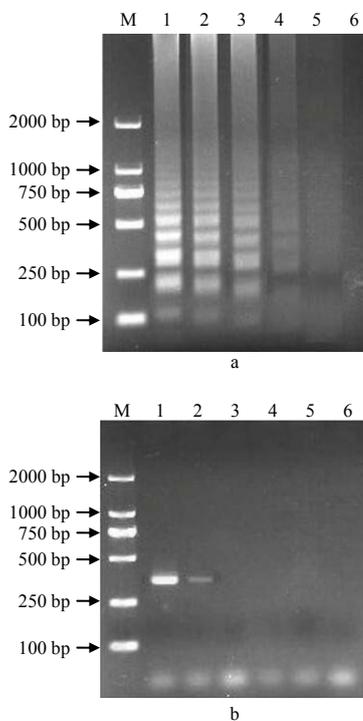
Fig.7 The visual results of the minimum detection of LAMP



M DNA Marker; 1~9 分别示 50 、 5 、 5×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 5×10^{-7} ng/ μ L RNA 的处理; 10 空白对照。

图 8 LAMP 方法的最低检测限测定电泳结果

Fig.8 The electrophoresis results of the minimum detection of LAMP



M DNA Marker; 1~5 分别示 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} cDNA 的处理; 6 空白对照。a LAMP 方法; b 常规 PCR 方法。

图 9 LAMP 方法和常规 PCR 方法的灵敏度检测结果

Fig.9 The result of sensitivity of LAMP and PCR

性;使用荧光定量 PCR 对样本进行验证, LAMP 方法与其阳性吻合度为 100%。可见, LAMP 方法比常规 PCR 方法更适合 GPRV 的初步诊断和监测。

LAMP 方法加热过程简单,不需要热循环器,使用传统的水浴锅即可完成扩增;可直接观察反应结果,不需要电泳,不需要紫外线,检测时间大大缩短,且用于检测的仪器和试剂价格低廉。虽然荧光定量 PCR 技术的敏感性高于 LAMP 技术,但由于荧光定量 PCR 技术的设备和试剂成本较高,在大规模疾病暴发中难以推广。在野生大熊猫轮状病毒监测中, LAMP 技术由于其设备要求低、灵敏度高,可更快速、方便地投入使用。

综上所述,本研究开发的检测 GPRV 的 LAMP 方法较常规 PCR 方法灵敏度更高,检测时间更短;较荧光定量 PCR 方法成本低廉,设备简单,可通过肉眼直接观察结果。基于此, LAMP 方法可作为快速检测大熊猫轮状病毒的有效工具,甚至可用于野生大熊猫轮状病毒的监测。

参考文献:

- [1] 王成东, 颜其贵, 张志和, 等. 大熊猫幼兽腹泻粪便分离出的轮状病毒鉴定[J]. 兽类学报, 2008, 28(1): 87-91.
WANG C D, YAN Q G, ZHANG Z H, et al. Isolation and identification of rotavirus from giant panda cubs[J]. Acta Theriologica Sinica, 2008, 28(1): 87-91.
- [2] 王成东, 罗婵, 张志和, 等. 幼龄大熊猫轮状病毒感染性腹泻的防治[J]. 动物医学进展, 2009, 30(7): 120-122.
WANG C D, LUO L, ZHANG Z H, et al. Prevention and treatment of giant panda cubs infected with rotavirus[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(7): 120-122.
- [3] 雷燕, 颜其贵, 张志和, 等. 大熊猫轮状病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(5): 490-493.
LEI Y, YAN Q G, ZHANG Z H, et al. Establishment of RT-PCR for detection of giant panda rotavirus[J]. Chinese Veterinary Science, 2010, 40(5): 490-493.
- [4] 陈珍容, 廖红, 郝中香, 等. 大熊猫轮状病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 兽类学报, 2016, 36(4): 445-451.
CHEN Z R, LIAO H, HAO Z X, et al. Establishment of fluorescent quantitative RT-PCR assay for detection of the giant panda rotavirus[J]. Acta Theriologica Sinica, 2016, 36(4): 445-451.
- [5] 曾杨茹, 颜其贵, 杨锐, 等. SYBR Green 实时荧光定量 RT-PCR 与常规 RT-PCR 检测大熊猫轮状病毒的比较研究[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(10): 1248-1252.
ZENG Y R, YAN Q G, YANG R, et al. Comparative study of SYBR Green real time RT-PCR and conventional RT-PCR for detecting giant panda rotavirus[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(10): 1248-1252.
- [6] 杨锐, 王成东, 颜其贵. 大熊猫轮状病毒 CH-1 株研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(11): 1040-1043.
YANG R, WANG C D, YAN Q G. Research progress of giant panda rotavirus strain CH-1[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2018, 34(11): 1040-1043.
- [7] KANEKO H, IIDA T, AOKI K, et al. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(7): 3290-3296.
- [8] 李亚兰, 袁晓民, 湛洋, 等. 猪流行性腹泻病毒检测方法的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(3): 347-354.
LI Y L, YUAN X M, ZHAN Y, et al. Progress in detection methods for porcine epidemic diarrhea virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(3): 347-354.
- [9] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [10] NAKANE S, ISHIKAWA H, NAKAGAWA N, et al. The structural basis of the kinetic mechanism of a gap-filling X-family DNA polymerase that binds Mg²⁺-dNTP before binding to DNA[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 417(3): 179-196.
- [11] KOU X, FAN H, WU Q, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay on rapid and sensitive detection of rotavirus in fecal samples and artificially seeded oysters[J]. Food Control, 2014, 41: 151-157.
- [12] CHAUDHARY A A, HEMANT, MOHSIN M, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based technology for authentication of *Catharanthus roseus*(L.) G. Don[J]. Protoplasma, 2012, 249(2): 417-422.
- [13] 申世川, 王一成, 袁秀芳, 等. 猪圆环病毒 2 型 LAMP 检测方法的建立[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(1): 21-26.
SHEN S C, WANG Y C, YUAN X F, et al. Establishment of LAMP for detection of porcine circovirus type 2[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2013, 25(1): 21-26.

责任编辑: 邹慧玲
英文编辑: 柳正