

doi:10.3969/j.issn.1673-4807.2017.01.020

环介导等温扩增技术原理及其在农业中的应用

蒋涛^{1,2}, 曾光远³, 唐顺明^{1,2}, 沈兴家^{1,2*}

(1. 江苏科技大学 生物技术学院 江苏省蚕桑生物学与生物技术重点实验室, 镇江 212018)

(2. 中国农业科学院 蚕业研究所 农业部蚕桑遗传改良重点实验室, 镇江 212018)

(3. 杭州蚕种场, 杭州 310021)

摘要: 环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型的能在恒定温度条件下实现核酸序列快速扩增的技术。由于该技术具有快速、便捷、高效和低成本等优势,目前已被广泛应用于分子诊断方面。文中介绍了 LAMP 技术的原理、研究进展、分子检测方法,以及该技术在农业分子诊断与基因检测方面的应用。

关键词: 环介导等温扩增;检测;分子诊断;农业;应用

中图分类号: U661.44;O327

文献标志码: A

文章编号: 1673-4807(2017)01-0107-07

Principle of loop-mediated isothermal amplification and its application in agriculture

JIANG Tao^{1,2}, ZENG Guangyuan³, TANG Shunming^{1,2}, SHEN Xingjia^{1,2*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Sericultural Biology and Biotechnology, College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China)

(2. Key Laboratory of Silkworm and Mulberry Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

(3. Hangzhou Silkworm Egg Production Farm, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a new technique for rapid amplification of nucleic acid sequences under a constant temperature. Due to the advantages of the technique, such as rapidity, convenience, high efficiency and low cost, it has been widely used in molecular diagnosis. We introduce its principle, research advances, testing method and application of molecular diagnosis and gene detection in agriculture.

Key words: loop-mediated isothermal amplification, detection, molecular diagnosis, agriculture, application

依据反应条件的不同,核酸扩增技术(nucleic acid amplification technology)可分为核酸非等温扩增技术(non-isothermal nucleic acid amplification technology)与核酸等温扩增技术(isothermal nucleic acid amplification technology)。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术是核酸非等温扩增技术的代表,已成为分子生物学研究中最重

要的研究方法;LAMP 技术则是核酸等温扩增技术的典型代表。

LAMP 技术由 Notomi 等^[1]于 2000 年开发的一种新型的体外恒温扩增特异 DNA 片段的分子生物学技术,具有对设备要求低、反应迅速、灵敏度高、特异性强等优点,特别适合在实验条件不高的基层实验室或现场进行快速检测。自该技术问世以来,

收稿日期: 2015-11-17

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK20141285);江苏省高校自然科学研究重大项目(15KJA180001)

作者简介: 蒋涛(1991—),男,硕士研究生。

* 通信作者: 沈兴家(1963—),研究员,博士生导师,研究方向为生物化学与生物技术。E-mail: shenxjsrj@163.com

引文格式: 蒋涛,曾光远,唐顺明,等.环介导等温扩增技术的原理及其在农业中的应用[J].江苏科技大学学报(自然科学版),2017,31

(1):107-111.3. doi:10.3969/j.issn.1673-4807.2017.01.020.

各国科学家都对其进行了研究与改良,在医学、农学、生物学、食品科学等学科的分子诊断、基因检测、单核苷酸多态性(SNP)分型、转基因食品检测等领域显示出了极大的应用潜力,并得到越来越多的应用。

1 LAMP 技术原理

LAMP 技术依赖于针对 6 或 8 个独立靶基因序列的 4 或 6 条特异性引物及具有链置换活性的 DNA 聚合酶(*Bst*、*Gsp* 等),在等温(一般为 60 ~ 65 °C)条件下,利用能够产生环状结构的引物和链置换活性 DNA 聚合酶,在靶序列两端引物结合处通过不断循环产生环状单链结构,引发新链合成,实现靶基因的高效扩增。

经典 LAMP 技术中,4 条引物可以分为 1 对外部引物和 1 对内部引物。外部引物包含上游外部引物(F3)和下游外部引物(B3),内部引物包含上游内部引物(FIP)和下游内部引物(BIP)。靶基因 6 个特异区域依次分别为 F3、F2、F1、B1c、B2c 和 B3c,相应的靶基因互补序列的 6 个特异序列分别为 B3、B2、B1、F1c、F2c 和 F3c,即 F3 序列与 F3c 序列互补,B3 序列与 B3c 序列互补,F1c、F2 序列分别与 F1、F2c 序列互补,B1c、B2 序列分别与 B1、B2c 序列互补。

2002 年,Nagamine 等^[2]对经典 LAMP 技术进行了改进,在 4 条引物的基础上增加了 2 条靶向扩增反应中形成的环状结构的环引物,以此来提高 LAMP 反应的速度。环引物 F(loop F)与环引物 B(loop B)的靶区域分别在 F1 ~ F2 和 B1 ~ B2 之间(图 1)。

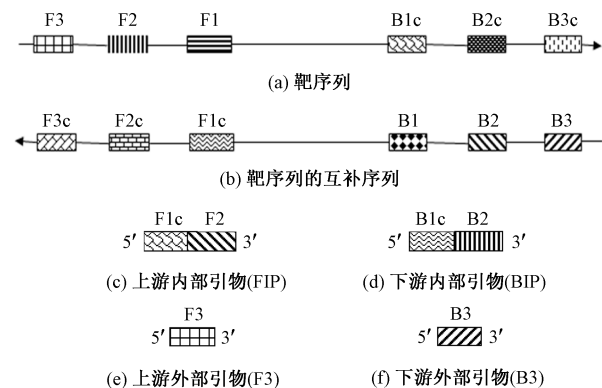


图 1 经典 LAMP 反应中的引物及靶区域的结构

Fig.1 Structure scheme of primer and target domain in classic LAMP

LAMP 技术的扩增过程一般可分为循环模板合成、循环扩增和延伸再循环 3 个阶段。

循环模板合成阶段:由于引物 FIP 的 T_m 值与

浓度都大于引物 F3,所以 FIP 中的 F2 序列优先结合到模板 DNA 的 F2c 区域,并引导从此区域开始的互补链的形成;然后引物 F3 与模板 DNA 链上的 F3c 区域结合,引导模板 DNA 互补链的形成,同时在链置换活性 DNA 聚合酶的作用下置换出由引物 FIP 引导合成的互补链。这条置换出来的互补链的 5' 端中 F1c 序列与 F1 序列互补配对形成环状结构,该条互补链 3' 端与引物 BIP 结合后,再合成互补链,并打开环状结构。与 F3 相似,外引物 B3 从引物 BIP 外侧与 B3c 序列结合形成一条互补链,并置换出由引物 BIP 引导合成的互补链。BIP 引导的互补链两端的 B1c 与 B1、F1 与 F1c 可发生碱基互补配对形成两端环状的哑铃形单链。这种结构是 LAMP 扩增循环的起始结构,且是后续扩增的模板。

循环扩增阶段:哑铃形单链 DNA 通过自我引导延伸反应迅速生成双链茎环结构;同时,引物 FIP 结合到茎环结构的环状区域,引导新生 DNA 双链的合成,并置换出与之序列相同的链。置换出的单链的 3' 端可自动环化,形成新的茎环结构,再通过 BIP 引物进行相似地延伸与链置换反应(图 2)。在该阶段中,由于 F3 引物与 B3 引物的耗尽,延伸反应将全部由 FIP 与 BIP 引物引导进行。



图 2 BIP 引导的互补链两端形成的环状的哑铃形单链

Fig.2 Circularity dumbbell-shaped single chain in two terminal of complementary chain by BIP leading

延长再循环阶段:在引物 BIP 与 FIP 的引导下连续进行链置换与延伸反应,产物中形成大量的茎环结构,最终呈现大小不一的由反向重复靶序列构成的多环花椰菜样结构的 DNA 片段混合物。

2 LAMP 的技术进展与检测方法

LAMP 技术自 2000 年问世,经过十多年的发展与改良,目前已被广泛应用于多个领域,成为一种有效的检测鉴定手段,并且在美国、日本等国已经作为一种检测的标准。目前,对 LAMP 技术的改良主要集中在检测对象的拓展、检测过程的简化、检测方法的改进、假阳性的避免等方面。

传统 LAMP 法仅能对以 DNA 为遗传物质的检测对象进行检测,而通过将逆转录酶与 *Bst* DNA 聚合酶进行混合与改造,可实现对以 RNA 为遗传物质的检测对象进行一步法检测,简化了实验流程。

有研究者通过整合 LAMP 技术与微流控芯片,

实现对样品的高通量检测^[3];也有研究者将核酸提取、LAMP 技术与微流控整合以形成集成式的芯片,大大提高了检测效率^[4];还有研究者设计了可应用于核酸等温扩增的无电加热器,满足了实际条件较为落后的现场与基层检测的需求,使等温扩增反应的设备更为简化^[5].

LAMP 技术区别于其他核酸扩增方法的一个显著特征是其检测方法的多样性^[6]. 按照对反应结果监测的时间不同,检测方法可分为终点检测法与实时监测法. 常用的检测方法主要包括沉淀物观察法、DNA 结合染料法、色彩指示剂法、凝胶电泳法、实时浊度法、实时荧光法,以及属于电化学范畴的电化学传感器/芯片法、电化学生物传感器法、横向流动试纸法、酶联免疫吸附法等. 另外,还有一些不常用的方法,如纳米金探针法、场效应传感器法^[7]、表面等离子体共振传感器法^[8]、生物荧光法^[9]和巨磁阻传感器法^[10]等. 由于传统的检测方法在灵敏度与特异性方面存在一定缺陷,因此,有研究者对传统 LAMP 反应体系进行了改良,通过在反应体系中添加一定量的二甲基亚砜(DMSO)或使用 Touchdown LAMP 技术后,检测的灵敏度与特异性较商用试剂盒提高了 10 倍,较传统方法提高了 100 倍^[11]. 下文介绍了几种常见的检测方法并对其原理进行了简要阐释.

2.1 沉淀物观测法

本方法为所有 LAMP 检测方法中成本最低、结果最为直观的方法. 其主要原理是:脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)在成链反应过程中释放焦磷酸根,焦磷酸根与镁离子结合形成肉眼可见的白色焦磷酸镁沉淀^[12]. 通过观察白色沉淀的生成与否,即可判断是否进行了 LAMP 反应. 该方法的优点在于反应在密闭体系中进行,不用暴露在空气中而引起污染,检测无设备成本;其缺点在于检测限较高,无法体现反应的敏感性,无法观察反应过程中的变化.

2.2 DNA 结合染料法

DNA 结合染料通常都具有特殊的分子结构,能够选择性地与双链 DNA 分子结合. 通过实验发现, DNA 结合染料法的敏感性显著高于沉淀物观测法^[13]. 目前已有多种 DNA 结合荧光染料被用于 LAMP 的定性检测. 常用试剂有 SYBR Green I、GeneFinder^[14]、溴化乙锭(EB)^[15]和 Quant-iT Pico Green^[15]等. 以 SYBR Green I 为例,在与双链 DNA(dsDNA)结合后,其颜色会从橙红色转变为绿色,且在自然光与紫外光下都可观察到. 这种方法的缺点之一是大部分与 DNA 结合的荧光染料耐热

性较差,若在反应开始前加入染料则会失去作用,而在反应结束后再加入染料又可能引入污染,以致造成假阳性结果. 因此,有研究人员通过在反应管中悬挂用锡箔纸包裹荧光染料,再于反应结束后进行离心以释放染料的方法来克服原先两步法的缺点^[16]. 最近,也有研究人员使用新型染料如 Gel Green^[17],直接在反应前加入反应管中再进行反应,也能取得良好效果. DNA 结合染料法的另一个缺点是 DNA 结合染料的添加增加了检测成本,同时部分染料的观察需要在特殊光波长如紫外光下进行,需要特殊设备,又增加了检测成本. 此外,有些染料(如 EB)还可能存在潜在的致癌、致畸风险.

2.3 色彩指示剂法

相对于要进行两步法的 DNA 结合染料法,使用肉眼可见的色彩指示剂由于不需要打开反应管,从而减少了交叉污染的风险. 常用的色彩指示剂有钙黄绿素(calcein)和羟基萘酚蓝(hydroxyl naphthol blue, HNB),它们都属于金属离子指示剂. 使用钙黄绿素时,在反应开始前,因为游离镁离子的存在,溶液显橙色;反应开始后,游离镁离子与焦磷酸根结合,镁离子数量减少,溶液显绿色. 若使用 HNB,当有游离镁离子存在时,溶液显紫色;当反应开始后,由于镁离子数量减少,溶液显蓝色. HNB 相对于钙黄绿素的检测限更低,因此,目前已被广泛用于 LAMP 的检测中,其不足之处在于每个人对颜色的感受不同,从而导致对检测结果的判断存在一定偏差.

3 LAMP 技术的农业应用

LAMP 技术在农业方面的应用主要集中于动物胚胎性别检测、细菌检测、病毒检测、真菌检测、寄生虫检测与转基因植物检测等方面.

3.1 动物性别鉴定

在动物繁育过程中,鉴定动物尤其是其胚胎性别是一件非常重要的工作,对家畜家禽的养殖具有重要意义. 例如在鸡类养殖中,人们都希望养殖的是雌鸡,但刚孵化出的鸡仔仅凭肉眼几乎无法分辨雌雄. 传统的性别检测方法不仅准确度较低,时间成本也相对较大. 因此,有研究者利用雌鸡 *PKCIW* 基因中的性别特异序列 HUR0417 设计 LAMP 引物,通过 LAMP 方法检测鸡仔性别,从而实现性别选择性养殖^[18]. 在牛的养殖中,胚胎性别鉴定同样重要. 牛胚胎性别鉴定的主要原理是利用雄性胚胎中特有的 Y 染色体 S4 区域与雌雄共有的 1.715 卫

星 DNA 序列进行引物设计,然后分别进行 LAMP 反应,如对两种序列的结果都为阳性则判定胚胎为雄性,如仅对 1.715 序列的反应结果为阳性则判定胚胎为雌性^[19].利用该方法可在最低仅需一个胚胎细胞的情况下实现鉴定结果的百分之百准确.还有研究者利用雄性奶牛睾丸特异蛋白基因(*TSPY*)建立了奶牛早期胚胎的 LAMP 性别鉴定方法^[20].利用 LAMP 技术进行性别鉴定,不但具有灵敏度高、准确率高、节约时间与成本等优点,同时也最大限度地减少了胚胎样品的损耗,在胚胎性别鉴定方面具有广阔的应用前景.

3.2 动植物病毒检测

病毒是危害动植物生长与其经济产量的重要因素,由于检测难度大,很长一段时间内都是困扰着农业生产与进出口检验检疫的难题.相较于传统检测技术,LAMP 技术具有无可比拟的优势,目前有很多关于使用 LAMP 方法检测动植物病毒的应用.根据遗传物质的类型,病毒可分为 DNA 病毒与 RNA 病毒.对于 RNA 病毒,仅需在传统 LAMP 反应体系中添加 RNA 模板与逆转录酶,即可实现逆转录-LAMP(RT-LAMP)检测.

草鱼呼肠孤病毒(*grass carp reovirus*, GCRV)属于 RNA 病毒,是呼肠孤病毒科水生呼肠孤病毒属的成员^[21].该病毒会导致草鱼发生出血性疾病,从而引起草鱼死亡,严重危害草鱼的养殖.有研究者通过 GCRV 病毒中 VP7 基因的高度保守序列设计了 LAMP 引物进行检测,并与 RT-PCR 技术的检测结果进行了比较^[22].结果表明,RT-LAMP 检测的灵敏度比 RT-PCR 高 10 倍.

南方菜豆花叶病毒(*southern bean mosaic virus*, SBMV)是南方菜豆花叶病毒属(*Sobemovirus*)的典型成员.该病毒主要通过豆科作物的种子进行远距离传播,目前该病毒已被列入我国入境植物检疫性有害生物名录.科技人员根据 SBMV 外壳蛋白基因序列设计并合成了 4 组 RT-LAMP 引物进行 LAMP 检测^[23].结果表明,RT-LAMP 检测的灵敏度比 RT-PCR 法高 10 倍,且检测时间明显缩短,整个反应过程只需 40 min.

有研究者通过 RT-LAMP 法设计了能有效区分野生型来源与免疫来源的犬瘟热病毒(*canine distemper virus*)的方法,结果表明,该方法的灵敏度比传统 PCR 法高 100 倍^[24].

家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus*, BmNPV)是一种严重危害蚕业生产的传染性疾病.有研究者根据 BmNPV 极早期表达

基因设计了 LAMP 引物进行早期疾病的筛查与检测,最快可在染病后的 12 h 检测出,这与只有在染病后 36 h 才能得出检测结果的传统 PCR 法相比具有明显的优势,因此,该方法对该病毒的早发现、早预防有重要帮助^[25-27].

3.3 动植物细菌病检测

创伤弧菌(*ViBrio vulnificus*)是一种革兰氏阴性嗜盐弧菌,主要易感水生动物,如鱼类、虾类、贝类等,同时也是一种重要的人兽共患病病原.有研究者通过 LAMP 联合发光二极管照明(LED)技术建立了一种快速检测水产品中创伤弧菌的方法^[28].该方法使用创伤弧菌外膜蛋白 TolC 基因设计了 6 条特异引物与 1 条异硫氰酸荧光素(FITC)标记的探针,扩增后含生物素标记的扩增产物与 FITC 探针特异性杂交,即可被 LED 检测.该方法对创伤弧菌检测的灵敏度是传统 PCR 法的 100 倍.

木薯细菌性萎蔫病是危害木薯种植的重要病害,具有风险高、分布广、可种传等特点,是我国及世界上重要的植物检疫对象.有研究者根据木薯细菌性萎蔫病菌致病质粒 Pbsf2 上的 TAL 效应器蛋白(*pthBXam*)保守基因设计引物,进行了 LAMP 检测^[29].结果表明,应用 LAMP 法后检测限可低至 1 pg/ μ L,其灵敏度比传统 PCR 法高 100 倍.

有研究者建立了通过实时 LAMP 法检测广泛流行于蔷薇科植物中的核果树细菌性斑点病(*Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni*),在 15 min 内即可观察到检测结果^[30];还有研究者通过微流控芯片整合实时荧光 LAMP 的方法,能同时检测 10 种水生动物的致病细菌,极大地提高了检测效率^[31].

3.4 动植物真菌病检测

鹰嘴豆是全球栽培规模第二大的豆科植物,枯萎尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*, Foc)是鹰嘴豆萎蔫病的主要病原,会导致鹰嘴豆的大规模减产.根据 Foc 延伸因子 1 α (EF-1 α)设计引物进行 LAMP 检测^[14],结果表明,LAMP 法的检测限可低至每个反应 10 fg,远低于 PCR 法的 100 pg,具有极高的灵敏度.

3.5 动植物寄生虫检测

有研究者利用弓形虫(*Toxoplasma gondii*)特异性基因 RE 基因与 B1 基因分别设计了针对 LAMP 与巢式 PCR 的检测方法^[32].结果表明,RE-LAMP、B1-LAMP、RE-巢式 PCR 和 B1-巢式 PCR 对弓形虫 DNA 的浓度要求分别为 1 fg、100 fg、1 pg、10 pg, LAMP 反应表现出极高的灵敏度.

家蚕微粒子病是另一种严重制约蚕丝业发展的传染性病害,尤其是其特有的垂直传播特点对蚕种的生产具有毁灭性危害.传统的检测家蚕微粒子病的方法是镜检,即通过显微镜观察家蚕组织研磨液来判定是否存在微粒子孢子,但该方法对操作者的技术及经验要求较高.因此,有研究者利用家蚕微孢子虫中与孢子繁殖复制相关的基因设计引物,开发了基于 LAMP 技术的家蚕微孢子虫快速检测技术,具有极高的灵敏度与特异性^[33-35].

3.6 转基因植物的检测

自从转基因技术建立以来,转基因作物已被越来越多地应用于商品化生产中.转基因植物带来巨大经济效益同时,也可能带来的环境和健康问题正引起人们的广泛关注.出于安全性评价的需要,各国相继制定了严格的转基因生物的管理法规,由此对转基因成分的检测更加重要.目前,作为世界重要的粮食作物——玉米,已有 138 种转基因玉米被批准用于商业化种植,其中 6 种主要的转基因玉米 Bt11、GA21、MON810、MON89034、NK603 和 TC1507 约占所有转基因玉米种植的 89%.有研究者根据这 6 种转基因玉米的特异基因设计了可视化、实时 LAMP 检测技术,能够高效、快速、方便地检测转基因玉米^[36].我国于 2009 年审放了转基因耐除草剂水稻“Bt 汕优 63”等 3 个转基因农作物的生产应用安全证书.有研究者根据 Bt63 转化体特异性序列设计特异引物,建立了 LAMP 法快速检测转基因水稻的技术,其灵敏度可达 0.01%^[37].

4 展望

LAMP 技术发展至今已经有十多年时间,各国的科学家和科技人员对该技术进行了大量地改良与完善.如今 LAMP 技术已成为较普遍的快速检测诊断方法,并且开发出了许多商用试剂盒.在美国、日本等国,该技术已被作为一种标准检测技术而得到广泛使用.近年来,一些高通量、多重 LAMP 检测方法得到开发,这又为大规模运用该技术提供了基础.如有研究者开发的基于 LAMP 技术的高通量检测疟疾的方法,就大大缩短了检测时间,简化了实验流程^[38].在利用 LAMP 技术检测人类锥虫病时,可以不需要提取 DNA 样本,而直接采集患者血液样本进行检测^[14].

目前,对 LAMP 的应用基本局限于定性检测,开发可用于定量检测的 LAMP 技术能够更大地拓展其应用空间.LAMP 技术对进行扩增的靶基因要求较高,一般长度不能超过 300 bp,这也一定程度

限制了它在更大范围内的应用.通过改进 DNA 聚合酶而适当延伸待扩增序列的长度,不仅能扩大检测范围,更能在一定程度上取代传统 PCR 技术实现目的基因的高效扩增.由于反应产物中存在大量 DNA 片段,因此改良 LAMP 反应的设备,最大限度减少气溶胶污染而避免假阳性的产生是 LAMP 检测中的技术重点.随着对 LAMP 研究的进一步深入,其缺点将逐步得到解决,应用领域将更加广泛,发挥的作用也将更大.

参考文献 (References)

- [1] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research* 2000,28(12):E63.
- [2] 沈海滢,蒋兴宇,张伟.用于环介导等温扩增的微流控芯片、其制备方法和应用:CN103667011A[P]. 2014-03-26.
- [3] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Molecular & Cellular Probes*, 2002, 16(3):223-9.
- [4] 吴青青,周超,杨文秀,等.集核酸提取、环介导等温扩增及检测为一体的微流控整合芯片[C]//第一届国际微纳尺度生物医学分离和分析技术学术会议暨第六届全国微全分析学术会议论文集.上海:[出版者不详],2010.
- [5] 姜毓君,满朝新,曲艳艳,等.一种用于核酸等温扩增的无电加热器:CN204824862U[P]. 2015-12-02.
- [6] ZHANG X, LOWE S B, GOODING J J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Biosensors Bioelectronics*, 2014,61C(20):491-499.
- [7] VEIGAS B, BRANQUINHO R, PINTO J V, et al. Ion sensing (EIS) real-time quantitative monitorization of isothermal DNA amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014,52(4):50-55.
- [8] CHUANG T L, WEI S C, LEE S Y, et al. A polycarbonate based surface plasmon resonance sensing cartridge for high sensitivity HBV loop-mediated isothermal amplification [J]. *Biosensors Bioelectronics*, 2012,32(1):89-95.
- [9] KIDDLE G, HARDINGE P, BUTTIGIEG N, et al. GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use[J]. *BMC Biotechnol*, 2012,12(1):15.
- [10] XIAO Z, DENG M, YANG H, et al. A novel HBV

- genotypes detecting system combined with microfluidic chip, loop-mediated isothermal amplification and GMR sensors [J]. *Biosensors Bioelectronics*, 2014, 54 (54C):372–378.
- [11] WANG D G, BREWSTER J D, PAUL M, et al. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification [J]. *Molecules*, 2015, 20(4):6048–6059.
- [12] MORI Y, NAGAMINE K, TOMITA N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289(1):150–154.
- [13] LE T H, NGUYEN N T, TRUONG N H, et al. Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* (opisthorchiidae, trematoda, platyhelminthes) [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(4):1178–1184.
- [14] ALMASI A, MORADI A, DEHABADI S M H, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of fusarium oxysporum f. Sp. lycopersici[J]. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 2013, 4(177). Doi:10.4172/2157–7471.1000177
- [15] WASTLING S L, PICOZZI K, KAKEMBO A S, et al. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats [J]. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2010, 4(11):945–948.
- [16] HONG M, ZHA L, FU W, et al. A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(2):523–531.
- [17] HAYASHIDA K, KAJINO K, HACHAAMBWA L, et al. Direct blood dry LAMP: a rapid, stable, and easy diagnostic tool for human African trypanosomiasis[J]. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2015, 9(3):e0003578.
- [18] KIM S W, CHOI J S, SHARMA N, et al. A novel approach for determination of chicken sexing at an early stage of development by using loop-mediated isothermal amplification method[J]. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2015, 39(5):583–588.
- [19] KHAMLOR T, PONGPIACHAN P, PARNPAI R, et al. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification [J]. *Theriogenology*, 2015, 83(5):891–896.
- [20] 黄金明, 王长法, 李建斌, 等. 睾丸特异蛋白 Y 基因(TSPY)对奶牛早期胚胎性别的鉴定. *农业生物技术学报*, 2009, 17(3):433–438.
- HUANG Jinming, WANG Changfa, LI Jianbin, et al. Sex determination of preimplantation bovine embryos using testis-specific protein Y gene(TSPY) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, 17(3):433–438. (in Chinese)
- [21] MA J, WANG W, ZENG L, et al. Inhibition of the replication of grass carp reovirus in CIK cells with plasmid-transcribed shRNAs[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 175(2):182–187.
- [22] YANG S, WANG K Y, YANG Z. Comparison of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification and reverse-transcription polymerase chain reaction for grass carp reovirus[J]. *Acta Veterinaria Brno*, 2015, 84(3):215–223.
- [23] 郭立新, 段维军, 徐亚飞, 等. 逆转录环介导等温扩增技术检测南方菜豆花叶病毒. *植物病理学报*, 2014, 44(4):349–356.
- GUO Lixin, DUAN Weijun, XU Yafei, et al. Detection of Southern bean mosaic virus by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2014, 44(4):349–356. (in Chinese)
- [24] LIU D F, LIU C G, TIAN J, et al. Establishment of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection and differentiation of canine distemper virus infected and vaccinated animals [J]. *Infection Genetics & Evolution Journal of Molecular Epidemiology & Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2015, 32:102–106.
- [25] 唐芬芬, 杨伟克, 邵榆岚, 等. 应用环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测家蚕核型多角体病毒的研究[J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50(4):1013–1019.
- TANG Fenfen, YANG Weike, SHAO Yulan, et al. Prompt diagnosis of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50(4):1013–1019. (in Chinese)
- [26] 覃玥, 杨梦歌, 朱青, 等. 家蚕核型多角体病毒可视化快速核酸检测方法[J]. *基因组学与应用生物学* 2015, 34(5):1007–1012.
- QIN Yue, YANG Mengge, ZHU Qing, et al. Visual LAMP detection of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(5):1007–1012. (in Chinese)
- [27] 周阳, 施海峰, 高力, 等. 一种家蚕核型多角体病毒快速检测试剂盒及检测方法: CN104450957A [P].

- 2015-03-25.
- [28] 王耀焕,王瑞娜,周前进,等. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条快速检测创伤弧菌检测方法的建立[J]. 生物技术通报,2014(6):81-87.
WANG Yaohuan, WANG Ruina, ZHOU Qianjin, et al. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick assay[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(6):81-87. (in Chinese)
- [29] 封立平,李洪林,倪新,等. 木薯细菌性萎蔫病菌的 LAMP 快速检测方法[J]. 植物保护,2015,41(3):93-99.
FENG Liping, LI Honglin, NI Xin, et al. Loop mediated isothermal amplification(LAMP) for rapid detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*[J]. Plant Protection, 2015, 41(3):93-99. (in Chinese)
- [30] PALACIO-BIELSA A, LÓPEZ-SORIANO P, BÜHLMANN A, et al. Evaluation of a real-time PCR and a loop-mediated isothermal amplification for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in plant tissue samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 112(10):36-39.
- [31] ZHOU Q J, WANG L, CHEN J, et al. Development and evaluation of a real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification assay integrated on a microfluidic disc chip (on-chip LAMP) for rapid and simultaneous detection of ten pathogenic bacteria in aquatic animals[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 104:26-35.
- [32] FALLAHI S, MAZAR ZA, GHASEMIAN M, et al. Challenging loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for molecular detection of *Toxoplasma gondii*[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2015, 8:366-372.
- [33] 刘吉平,程伟,晏育伟,等. 基于 EB1 基因的环介导等温扩增(LAMP)法检测感染家蚕微粒子病的蚕卵. 昆虫学报,2015,58(8):846-855.
LIU Jiping, CHENG Wei, YAN Yuwei, et al. Detection of pebrine disease in *Bombyx mori* eggs with the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on EB1 gene[J]. Acta Entomologica Sinica, 2015, 58(8):846-855. (in Chinese)
- [34] 刘吉平,魏建影. 一组引物及其在家蚕微孢子虫的快速检测方面的应用:CN102260737A[P]. 2011-11-30
- [35] 刘吉平,杨吉龙. 一种家蚕病原微孢子虫 LAMP 可视化快速检测试剂盒及其检测方法:CN103131773A[P]. 2013-06-05.
- [36] BHOGE RK, CHHABRA R, RANDHAWA G, et al. Event-specific analytical methods for six genetically modified maize events using visual and real-time loop-mediated isothermal amplification[J]. Food Control, 2015, 55:18-30.
- [37] 张明哲,陈曦,徐俊锋,等. 环介导等温扩增技术在转基因水稻 Bt63 检测中的应用[J]. 生物技术通报, 2014(2):69-74.
ZHANG Mingzhe, CHEN Xi, XU Junfeng, et al. Specific detection of genetically modified rice Bt63 using Loop-mediated isothermal amplification[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(2):69-74. (in Chinese)
- [38] BRITTON S, CHENG Q, SUTHERLAND CJ, et al. A simple, high-throughput, colourimetric, field applicable loop-mediated isothermal amplification (HtLAMP) assay for malaria elimination[J]. Malar Journal, 2015, 14(1):1-12.

(责任编辑:缪文桦)