

仙台病毒 RT-LAMP 可视化检测方法的建立

周洁¹, 赵丽娟^{1,2}, 陶凌云¹, 倪丽菊¹, 高诚^{1*}, 陈洪岩^{3*}

(1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009;
3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 建立一种快捷、灵敏的检测方法, 即反转录-环介导等温扩增方 (RT-LAMP) 用于仙台病毒 (SeV) 的检测。**方法** 根据 GenBank 公布的 SeV 序列 (DQ219803.1), 在其保守区域设计了六套 LAMP 引物, 利用 LAMP Real-Time Turbidimeter LA-320C 仪监测反应进程并筛选最佳引物、反应条件, 建立对 SeV 核酸进行特异性扩增的 RT-LAMP 检测方法, 并可通过加入目测荧光检测试剂肉眼判断结果。对所建立的方法进行了敏感性、特异性评估并对 92 份样品进行了检测。**结果** 该方法在 63℃ 恒温下作用 60 min, SeV RNA 获得了高效率的特异性扩增, 与其余常见小鼠病毒无交叉反应; 最低检出量为 2.1 TCID₅₀ SeV, 比 RT-PCR 方法高 10² 倍; 肉眼判断结果与 Real-Time Turbidimeter LA-320 仪监测结果一致; 通过对 92 份样品的 RT-LAMP, RT-PCR 和间接 ELISA 方法的检测比对, 三者符合率为 100%。**结论** 建立的 SV RT-LAMP 检测方法具有快速、特异、灵敏, 操作简单的特点, 具有良好的应用前景。

【关键词】 仙台病毒; RT-LAMP; 实时监控; 快速检测

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0293-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.015

Establishment of a visualized detection method of Sendai virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

ZHOU Jie¹, ZHAO Li-juan^{1,2}, TAO Ling-yun¹, NI Li-ju¹, GAO Cheng^{1*}, CHEN Hong-yan^{3*}

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009; 3. Experimental Animal Center, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001)

【Abstract】 Objective To establish a simple and sensitive detection method of Sendai virus (SeV) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technique. **Methods** According to the published GenBank sequences (DQ219803.1), six pairs of primers were designed targeting the conserved region of SeV. The amplification products were detected with a LAMP real-time Turbidimeter. (LA-302). Through optimizing the LAMP primers and reaction conditions, a rapid and specific detection method of SeV was established. Meanwhile, the amplified products were colored by fluorescence detection reagent after completion of the reaction, so that the amplification could be visualized and detected by naked eyes. Then, methodological evaluation of the RT-LAMP was tested. **Results** The method of RT-LAMP showed a highly efficient amplification for SeV viral target gene which was performed at 63℃ for 60 min with the LAMP real-time Turbidimeter (LA-302). The detection limit was 2.1 TCID₅₀, 100 times higher than that of RT-PCR, and no cross-reaction with other RNA and DNA viruses of mice was observed. The results of SeV LAMP reaction was visualized and the tube could be directly observed by naked eyes with the addition of fluorescence detection reagent. The results were consistent with the results detected by real-time turbidimeter. 92 clinical samples were detected by RT-LAMP, RT-PCR and indi-

【基金项目】 上海市科委科技创新行动计划 (11140901000); 上海市科委研发平台专项 (15DZ2292400)。

【作者简介】 周洁 (1978 -), 女, 博士, 副研究员, 主要从事动物病毒分子生物学及免疫学方面的研究。Email: zhoujie0526@163.com。

【通讯作者】 高诚 (1961 -), 男, 研究员。Email: gaochengdgb@126.com。陈洪岩 (1963 -), 男, 研究员。Email: chenhongyan@caas.cn。

rect ELISA, and the coincidence rate was 100%. **Conclusions** This established SeV RT-LAMP detection method is fast, specific, highly sensitive, easy to perform under simple conditions, and is suitable for rapid detection of Sendai virus.

【Key words】 Sendai Virus; RT-LAMP; Real time; Rapid detection

Corresponding author: GAO Cheng, E-mail: gaochengdgb@126.com; CHEN Hong-yan, Email: chenhongyan@caas.cn

仙台病毒(Sendai virus, SeV)又名 hemagglutinating virus of Japan(HVJ),是引起啮齿类动物呼吸系统疾病的主要病原之一,一年四季均可发病,但以春季多发,具有传染性强等特点,在多数情况下呈隐性感染,难以从群体中清除。鼠群感染后可导致孕鼠繁殖率下降,新生仔死亡率增加。SeV 是清洁级及以上等级实验用鼠的必检项目,同时它也可感染灵长类动物^[1,2]。目前 SeV 项目的检测普遍采用国标推荐的间接 ELISA 方法检测血清抗体,ELISA 方法具有快捷、方便、敏感、易于大批量检测和标准化等优点,无疑是较为理想的检测方法,在今后相当长一段时间内,间接 ELISA 方法还将是实验动物病毒检测的主流。但该方法不适用于裸小鼠和转基因小鼠的检测。裸小鼠即无胸腺的免疫缺陷小鼠,是医学生物学研究领域不可缺少的实验动物模型,特别是在肿瘤学、免疫学、药品与生物制品的安全性评价及有效药品的筛选等实验方面有着特殊的价值^[3]。因裸小鼠有免疫缺陷,因此感染病毒后不易产生抗体,用 ELISA 方法检测裸鼠的病毒抗体易产生假阴性。在我们日常检测工作中还发现转基因小鼠存在非特异性抗体增高的现象,即特异性抗原孔 A 值增高的同时,对照孔的 A 值也同时增高,说明用间接 ELISA 方法检测转基因小鼠病毒抗体的本底值较高,易产生假阳性。因此亟需建立一种高效、便捷、稳定的直接检测抗原的方法,以便应用于所有类型小鼠的检测。

环介导恒温扩增法(即 LAMP 法)是日本学者 Notomi 等^[4]在 2000 年发明一种新型的核酸扩增新技术。其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4~6 条特异引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶在等温条件(63℃左右)下作用 30~60 min,即可完成核酸的扩增反应。其扩增效率可达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个拷贝数量级。与常规 PCR 相比,不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程。LAMP 技术自开发以来已广泛应用于细菌、病毒的定性定量检测,临床疾病的诊断,动植物中致病微生物的检测,胚胎性别鉴定等相关领域^[5-8],由于 LAMP 反应产生副产物焦磷酸镁白色沉淀,其浊度与所含的 DNA 量成正比,根据这一特性,日本研制出专门用于 LAMP 检测

的实时监控浊度仪,可以实现对 LAMP 扩增过程的全程实时监控^[9]。本研究利用 LAMP Real Time Turbidimeter LA-320 仪实时监测 RT-LAMP 反应进程,筛选到最佳反应体系,建立了针对 SeV 的 RT-LAMP 检测方法。所建立反应体系具有良好的特异性,敏感快捷,其结果分析与肉眼可视化判定的一致性,具有推广应用的前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒及待检材料

BHK-21 细胞、SeV 病毒天津株、小鼠细小病毒(MVM)、鼠痘病毒(Ect)、小鼠肺炎病毒(PVM)、呼肠孤病毒 3 型(Reo-3)和小鼠肝炎病毒(MHV)种毒均购自中国药品生物制品检定所,由上海实验动物研究中心增殖保存;现地试验样品为上海实验动物质量监督检验站检测的客户送检样品,采样在上海实验动物质量监督检验站屏障动物实验设施进行【SYXK(沪)2013-0056】。

1.1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清(Gibco)、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen);Loopamp RNA Amplification Kit、Loopamp® Fluorescence Detection Reagent、Loopamp® Reaction Tube Detection Reagent、LAMP real-time turbidimeter (LA-302)仪(日本荣研株式会社)。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒核酸的提取

用 QIAamp Viral RNA Kit 试剂盒提取总 RNA, QIAamp® DNA Mini Kit 试剂盒提取总 DNA,具体操作方法参照说明书。

1.2.2 引物设计与合成

参照 GenBank 中 SeV 的全基因组序列(DQ219803.1),用 BioEdit 软件进行分析后选择 120nt-1694nt 的 NP 基因保守区,利用在线软件 Primer Explorer V4 设计六套引物(包括外引物 F3/B3 和内引物 FIP 和 BIP),利用 LAMP real time turbidimeter LA-302 对不同引物对的反应进程和结果进行监测、筛选,并确定引物混合液的反应比例。

1.2.3 SeVRT-LAMP 检测反应体系的建立

根据 Loopamp RNA Amplification Kit 说明书,摸索 SeVRT-LAMP 的反应体系中各组分的浓度及比例,将含有反应液的反应管至于 LAMP real-time turbidimeter LA-302 仪器中进行等温扩增,根据该仪器预设的参考标准,设定反应速度曲线峰值超过 0.1 时判为阳性。

1.2.4 SeV RT-LAMP 反应产物的鉴定

(1)SeV RT-LAMP 产物的 LAMP real-time turbidimeter LA-302 仪鉴定:提取 SeV 细胞培养物总 RNA,用已建立的 SeV RT-LAMP 检测,同时提取 BHK-21 正常细胞作为阴性对照。利用 LAMP real-time turbidimeter LA-302 仪实时监测反应情况,以图文的形式显示反应过程中各反应速率和时间。设定有效反应时间为 1 h,即在 1 h 内当 LAMP real-time turbidimeter LA-302 仪分析线形图的线形峰值超过预定标准 0.1 时,柱形图底部显示为红色,即反应判为阳性,其中蓝色部分代表反应产物的量,数值越高表示产物的量越大。

(2)SeV RT-LAMP 产物的可视化鉴定:在反应管中预先加入荧光目视检测试剂(fluorescence detection reagent),待反应结束后用肉眼观察反应液颜色变化。阳性样品的反应液颜色呈绿色荧光,阴性无色透明。

1.2.5 SeV RT-LAMP 的特异性试验

取 SeV、MHV、Ect、PVM、MVM 和 Reo-3 等几种小鼠常见病毒的细胞培养物,用 1.2.1 的方法提取各自核酸,采用所建立的 SeV RT-LAMP 方法的引物进行特异性实验。

1.2.6 SeV RT-LAMP 的敏感度试验

将提取的 SeV RNA 进行 10 倍比稀释为 10⁰ ~

10⁻⁶的 7 个稀释度,用所建立的方法进行扩增,监测实时扩增曲线。同时针对仙台病毒保守基因 NP 蛋白序列设计 PCR 引物如下(产物长度为 766 bp):

F: 5'-GGAGTAAACGCCGATGTCAAA-3'
R: 5'-GCTGCATTGCCTTGTCTCTGTA-3'

将倍比稀释 7 个样本进行 RT-PCR 扩增,对两种方法的结果进行比较。

1.2.7 SeV RT-LAMP 的现地试验

对本站送检的 92 份小鼠样品采集全血,提取核酸用所建立的 RT-LAMP 方法、RT-PCR 以及间接 ELISA 诊断试剂盒进行检测,比较三种方法的试验结果。

2 结果

2.1 SeV RT-LAMP 引物的筛选及反应体系建立

用在线软件 Primer Explorer V4 设计 6 套引物,按照 Loopamp RNA

Amplification Kit 设定 25 μL 反应体系:2 × 反应缓冲液(RM) 12.5 μL、FIP(40 pmol/L) 1 μL、BIP(40 pmol/L) 1 μL、F3(5 pmol/L) 1 μL、B3(5 pmol/L) 1 μL、酶溶液(EM) 1 μL、去离子水 2.5 μL、SeV-A RNA 模板 5 μL。LAMP real-time Turbidimeter LA-302 仪 63℃ 扩增时间 1 h。浊度仪实时跟踪结果柱状图(见图 1)显示 Block A 中的 1、2 和 3 号孔扩增反应明显,4、5 和 6 号孔有不同程度的扩增,阴性对照无扩增反应。而浊度仪实时跟踪结果曲线图显示仅 1、2 和 3 号孔在 60 min 内出现了阳性峰值,且以 1 号孔扩增效率最高,因此选定 1 号孔对应引物为本方法的工作引物(表 1)。

表 1 SeV RT-LAMP 引物序列
Tab.1 Sequences of the primers used for RT-LAMP detection of SeV

引物 Primers	序列 Sequences
F3	5'-CATCTTAATAACGGGTGCTG-3'
B3	5'-CCAATAGGTCATGTCAACTGTA-3'
FIP	5'-TGTGATTTCCAAATCCAAAGTGGATATAATGGAATCTCCACAGGA-3'
BIP	5'-ACAAATTGATCTATGATCCCGATCCGACATCTCTGACCTTGCTAA-3'

2.2 SeV RT-LAMP 的可视化鉴定比较

从仪器监控的反应进程(见图 2)可见,SeV 反应体系在 32 min 左右启动,峰值超过 0.1,阴性对照无反应,结果与预期相符。反应结束后用肉眼观察,SeV 的反应颜色呈绿色荧光,阴性对照无色透明(见图 3),与 real-time turbidimeter LA-302 仪监测结果一致,

表明添加 FD 后所呈现的颜色反应具有特异性。

2.3 SeV RT-LAMP 的特异性试验

以 SeV 为阳性对照,RNA 洗脱液为阴性对照,检测 PVM、Reo-3、MHV、MVM 和 Ect 等病毒,结果(见图 4)显示只有 SeV 检测结果为阳性,其余病毒均为阴性,表明所选引物对 SeV 具有强特异性。

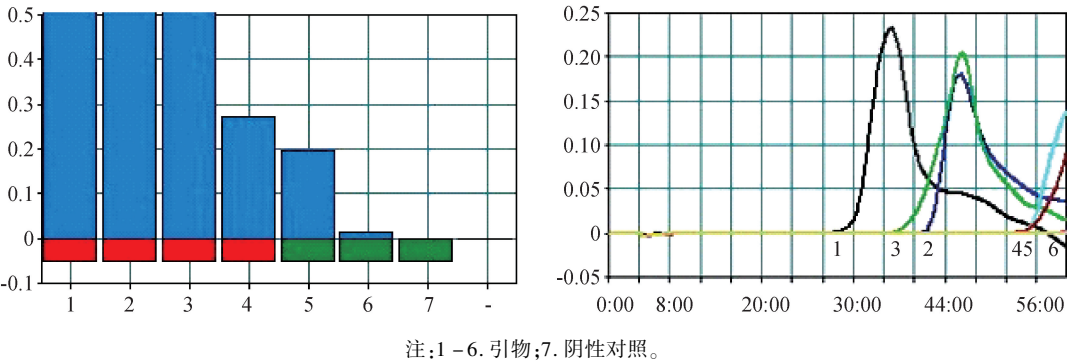


图 1 SeV RT-LAMP 引物的 Real Time Turbidimeter LA-302 仪筛选结果

Note: 1-6. Primers; 7. Negative control.

Fig. 1 Screening results of SeV RT-LAMP primers by real-time turbidimeter LA-302

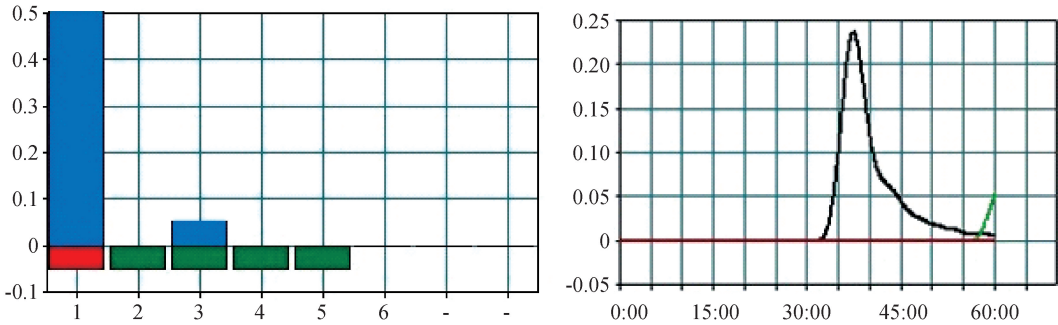


图 2 SeV RT-LAMP 产物的 real-timeLA-320 Turbidimeter 仪鉴定分析

Note. 1. SeV strains; 2. Negative control; 2. BHK-21 cell lines.

Fig. 2 Analysis of the SeV RT-LAMP products identified by real-time turbidimeter



注: 1. SeV 细胞培养物; 2. BHK-21 正常细胞对照; 3. 阴性对照。

图 3 RT-LAMP 反应体系加入目测荧光染料显色

Note. 1. SeV strains; 2. BHK-21 cell lines; 3. Negative control.

Fig. 3 Visualization of the RT-LAMP reaction products by fluorescence detection reagent

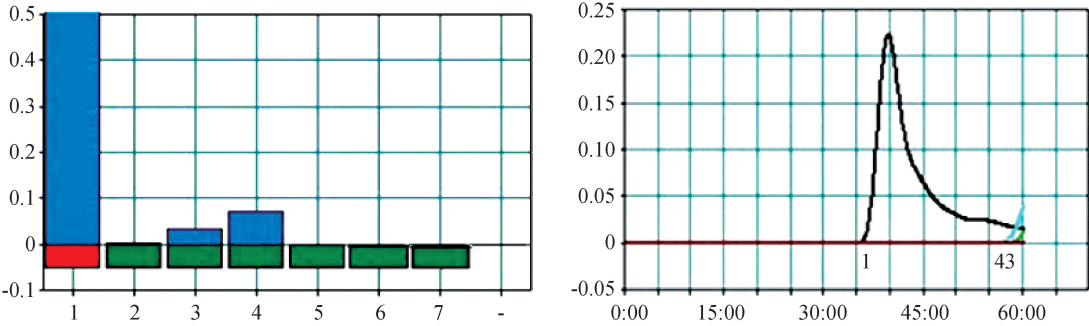
2.4 SeV RT-LAMP 的灵敏度试验

提取病毒滴度为 0.21×10^5 TCID₅₀ 的 SeV 细胞培养物中总 RNA,测定其浓度为 86 ng/μL,进行 10 倍比稀释为 $10^0 \sim 10^{-6}$ 的 7 个稀释度,用所建立的 SeV RT-LAMP 方法进行扩增,LAMP Real Time Tur-

bidimeter (LA-302) 的监测曲线(见图 5)显示,1 号孔到 3 号孔都有显著的扩增,4 号孔有一定程度的扩增。在 1 h 时间内,随着模板浓度的降低,扩增时间逐渐延后,但扩增斜率基本保持不变,4 号孔相对较为滞后,在 68 min 左右峰值超过 0.1。结果显示 4 号孔即 8.6×10^{-3} ng/μL 为其最低检出量。上述 7 份样品的 RT-PCR 检测结果(见图 6),当 RNA 浓度稀释至 0.86 ng/μL 时 RT-PCR 方法能检出,经测序证实检出片段正确。由此可见 RT-LAMP 方法的敏感性明显高于 RT-PCR 方法。

2.5 SeV RT-LAMP 的现地试验

上海实验动物质量监督检验站送检的 92 份小鼠样品采集全血,提取核酸用所建立的 RT-LAMP 方法、RT-PCR 进行检测,血清用间接 ELISA 诊断试剂盒进行检测,其中 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法各检出阳性 4 份,二者符合率 100%;间接 ELISA 方法根据 EBI 试剂盒说明书判定标准检出阳性 4 份,弱阳性 1 份(判为疑似),用中国生物药品鉴定所小鼠仙台病毒试剂盒重复检测检出阳性样品为 4 份,与其

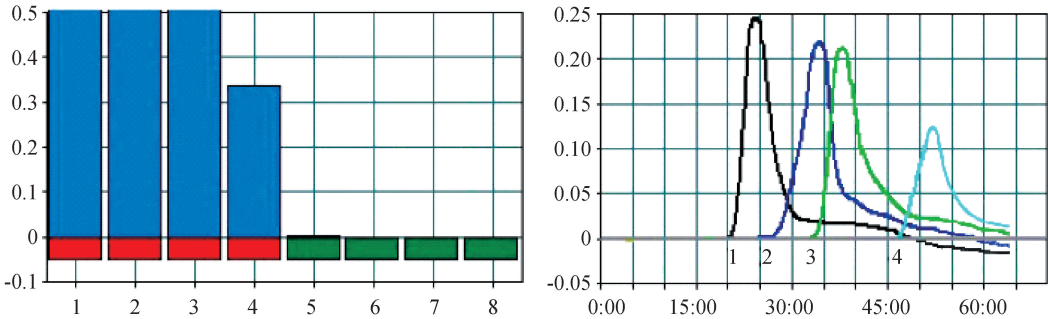


注：1. SeV；2. MHV；3. Ect；4. PVM；5. MVM；6. Reo-3；7. 阴性对照。

图 4 特异性试验 SeV LAMP 的 Real Time TurbidimeterLA-302 分析

Note. 1: SeV;2: MHV;3: Ect;4: PVM;5: MVM;6: Reo-3;7: Negative control.

Fig. 4 Specific test of SeV LAMP with a LA-320 real-time turbidimeter

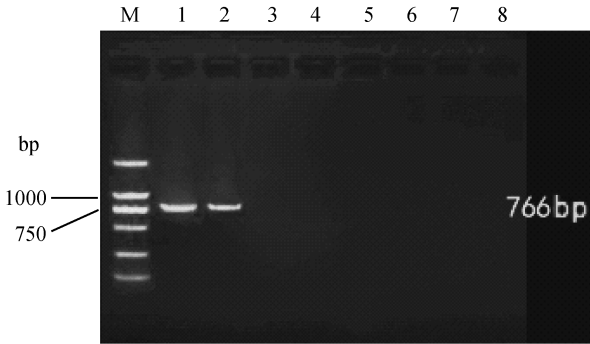


注：1 ~ 7. $10^0 \sim 10^{-6}$ 稀释度的 SeV；8. 阴性对照。

图 5 不同稀释度的 SeV RT-LAMP Real Time Turbidimeter (LA-302) 分析

Note. 1 ~ 7: $10^0 - 10^{-6}$ serial dilutions of SeV; 8: Negative control.

Fig. 5 Validation of SeV RT-LAMP assay by serial dilutions of virus with a turbidimeter (LA-320)



注：M. DL2000 marker;1 ~ 7. $10^0 - 10^{-6}$ 稀释度的 SeV；8. 阴性对照。

图 6 不同稀释度 SeV 的 RT-PCR 检测

Note. M. DL2000 marker;1 ~ 7. $10^0 - 10^{-6}$ serial dilutions of SeV;8. Negative control.

Fig. 6 RT-PCR detection of of SeV in different dilutions

余两种方法符合率 100%，经过对样品编号核实，EBI 试剂盒检出弱阳性样品为转基因小鼠，其弱阳性结果可能为非特异性本底增高。从反应时间看，所建 RT-LAMP 方法全程反应仅 1 h，其效率远远超过其余两种方法。

3 讨论

核酸检测对于仙台病毒早期检测以及转基因小鼠、免疫缺陷小鼠的检测等有着重要的意义，本研究旨在通过建立一种新型的核酸检测方法，从而让仙台病毒在实验动物质量监控领域的检测变得更为精准便捷。LAMP 方法相比较传统 PCR 而言有着检测更迅速、灵敏，适用于各种实验条件（尤其是县市基层）的快速检测使用等优点，因而有很大潜力。

由于 LAMP 反应高效的特点，一般在较低的反应速率下仍可产生大量的产物，而低反应速率和 LAMP 反应的原理矛盾，属于假阳性反应。目前多数建立的 LAMP 反应方法多采用琼脂糖凝胶电泳紫外线分析显像来判定结果，只能分析 LAMP 反应的最终结果，且存在气溶胶污染实验室的危险，由于缺乏对反应的实时监控很难排除这些干扰因素，不能对检测结果做出准确的判定^[10]。而本研究在建立方法的过程中采用 real-time Turbidimeter (LA-320) 混浊仪进行实时监控。其原理是通过加热使 LAMP

反应进行,同时在反应管一侧装有 650 nm 的发光二极管(LED),控制入射光强度,在其相对一侧装有光电二极管(photodiode,PD),检测射光强度,由于 LAMP 反应中生成副产物白色硫酸镁沉淀,造成光强度差异。在计算机联机软件上,通过调整反应基线和每 6 s 检测一次浊度,用自动设定临界值的方式由 LAMP real-time turbidimeter (LA-302) 仪给出的 Ct 值与 RNA 的拷贝数之间存在较好的线性关系。当实时浊度判断曲线超过阈值时即判断为阳性,否则为阴性,因此,这种方式不但可以实时监控,也可以进行模板核酸的定量^[9,11,12]。使用该仪器可以直观、实时的观察反应的进行情况,并通过设置分析标准可以排除假阳性和非特异反应等干扰因素,同时也可避免 LAMP 产物开盖电泳检测对实验室污染的威胁。

与早期核酸检测方法相比,RT-LAMP 可通过一步法完成且反应在等温条件下进行,没有核酸的变复性过程,既节省了时间又减少了 RNA 酶和扩增核酸的污染机会^[13]。更重要的是,扩增反应只有在六条引物完全与识别的靶序列中八个结合区匹配的情况下才能顺利进行,所有这些特性在很大程度上减少了扩增反应背景,使检测特异性得到改善^[14]。

引物的设计及筛选是成功建立 RT-LAMP 方法的关键,本实验针对仙台病毒 N 基因的保守序列设计了 6 组引物,扩增结果显示其中 4 组引物均可用于检测,根据实时监控曲线最终确定了启动时间最早峰值最高的 1 号引物组为最优引物。敏感性与特异性实验结果显示对于仙台病毒的检测,RT-LAMP 扩增敏感性比 RT-PCR 扩增技术提高了 2 个数量级,且特异性良好,与常见的几种小鼠病毒均不发生交叉反应。LAMP 扩增过程中产生大量的焦磷酸镁沉淀使反应液呈现浑浊,在反应管中预先加入荧光目视检测试剂,阳性样品呈现肉眼可见的绿色荧光,可直接观察无需琼脂糖凝胶电泳从而进一步防止气溶胶的污染。

本实验用所建立的方法与间接 ELISA 方法及 RT-PCR 方法对上海市质量监督检验站送检的 92 份小鼠样品同时检测并对结果进行了比较。三种方法的阳性检出率 100% 符合,但由于样品数量(尤其是阳性样品的数量)有限,并不能完全体现统计学价值,在今后 SeV 的检测工作中将继续进行 RT-LAMP 与其余检测方法的比较研究。任何一种方法都具优缺点,间接 ELISA 方法检测血清中抗体,简便快捷,可以满足常规动物检测需要;而 RT-LAMP

和 RT-PCR 检测抗原,因此对于发病早期尚未产生抗体的动物、免疫缺陷不易产生抗体的动物以及在检测时易发生 A 本底值升高的转基因动物,采用抗原检测方法更为准确。LAMP 法最大的弊端在于实验中对于污染控制要求极为严格,本研究所建立方法采用浊度仪实时监控并用目测法判定结果,尽量降低了开盖跑胶造成污染的可能性,该方法操作简便、敏感性特异性好,便于推广,进一步优化、完善后在仙台病毒的检测方面有一定应用潜力。

参 考 文 献

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京:农业出版社,1991. 57-64.
- [2] 刘春燕, 张媛媛, 姚薇, 等. 仙台病毒在儿童急性呼吸道感染中的血清学调查[J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(3): 378-379.
- [3] 李厚达. 实验动物学[M]. 北京:中国农业科学出版社. 2003.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucl Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [5] 秦智锋, 曾少灵, 阮周曦, 等. 口蹄疫病毒 RT-Lamp 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(5): 375-378.
- [6] Boubourakas IN, Fukuta S, Kyriakopoulou PE, et al. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2009, 160(1-2): 63-68.
- [7] 王建峰, 黄素文, 刘思国, 等. 牛副结核分枝杆菌 LAMP 快速检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(7): 555-557.
- [8] 赵丽娟, 周洁, 高诚, 等. 环介导等温扩增技术及其应用[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(2): 162-166.
- [9] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Bioph Methods, 2004, 59: 145-157.
- [10] 刘业兵, 张磊, 宁宜宝, 等. 猪细小病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2010, 43(14): 3012-3018.
- [11] Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, et al. Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44, 1376-1381.
- [12] Parida M, Posadas G, Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus[J]. Clin Microbiol, 2004, 42: 257-263.
- [13] Nie XZ. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y[J]. Plant Dis, 2005, 89: 605-610.
- [14] 李启明, 马学军, 高寒春, 等. 逆转录环介导等温核酸扩增技术(RT-LAMP)在 H5N1 禽流感病毒基因检测中的应用[J]. 病毒学报, 2008, 24: 178-184.