技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000781

小鼠仙台病毒 LAMP 快速检测方法的建立

王会娟[1],王 蕾[1],严 磊[1],皮广禄[2],王 胜[1],谭 毅[1],赖国旗[1]
(1. 重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016;2. 重庆市渝中区动物卫生监督中心,重庆 400013)

【摘 要】目的:建立一种实验小鼠仙台病毒(Sendai virus,SeV)的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)检测方法。**方法**:采用 LAMP 技术,以小鼠 SeV(gi:9627219)F 蛋白的基因序列为靶基因,采用 PrimerExploer V4 软件设计 LAMP 的 6 条特异性引物,应用病毒 RNA 提取试剂盒提取 SeV RNA,通过优化 LAMP 反应体系条件建立小鼠 SeV 特异性的 LAMP 检测方法(SeV/LAMP)。同时,对该方法的特异性、稳定性、重复性、灵敏度进行验证,并初步用于临床检测。**结果**:所建立的 SeV/LAMP 方法可特异性的检测出 SeV RNA,其他常见病原体均为阴性。SeV/LAMP 能检测出不同批次同一时间或同一批次不同时间的 SeV RNA;SeV/LAMP 检测 SeV RNA 的最低检测含量为 0.33 pg,与 ELISA 检测方法相比较,其灵敏度高(分别为 5/30 和 2/30)。临床检测,SeV 的阳性率为 27.5%(11/40);全部反应可在 1 h 内完成。通过添加荧光染料 SYBR Green I 可直观目测实验结果。**结论**:建立的 LAMP 方法,具有特异、准确、灵敏、快速、简便的特点,可用于实验小鼠 SeV 的快速检测。

【关键词】小鼠;仙台病毒;环介导等温扩增
【中图分类号】R450 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-06-05

作者介绍:王会娟,Email:920128765@qq.com,
研究方向:实验动物学。
通信作者:赖国旗,Email:a68895078@21cn.com。
基金项目:重庆市科委重大资助项目(编号:CSTC2013yykfc1005);
重庆市科委面上资助项目(编号:CSTC2014YYKFA110033)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151013.2302.002.html
(2015-10-13)

Hematol,2007,61(3):208-221.
[3] Khushoo A,Pal Y,Mukher jee KJ. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in E scherichia coli in shake-flask and bioreactor[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2005,68(2):189-197.
[4] Kotzia GA,Labrou NE. Cloning expression and characterisation of E rwinia carotovora Lasparaginase[J]. J Biotechnol,2005,119(4):309-323.
[5] 李晓媛,陈建华,吴梧桐. PEG-L-天冬酰胺酶的临床研究近况[J].药学进展,2009,33(11):503-510.
[6] Kotzia GA,Labrou NE. Cloning,expression and characterisation of Erwinia carotovoral L-asparaginase[J]. J Biotechnol,2005,119(4)309-323.
[7] Molineux G. Engineering improved biopharmaceuticals for oncology [J]. Pharmacotherapy,2003,23(8Pt 2):3s-8s.
[8] Aaronson SA. Cancer medicine[M]. 5th ed. H amilton:B.C.Decker-Inc.2000:2140.
[9] Ashrafi H,Amini M,Mohammadi-Samani S. Nanostructure AA Saraginase-fatty acid bioconjugate:Synthesis,preformulation study and biological assessment[J]. Int J Biol Macromol,2013,62C:180-187.
[10] 张雨青,相入丽,阎海波,等. 丝素纳米颗粒的制备及应用于L-天冬酰胺酶的固定化[J]. 高等学校化学学报,2008,3(10):25-36.
[11] Ha W,Meng XW,Li Q,et al. Self-assembly hollow nanophere for enzyme encapsulation[J]. Soft Matter,2010(6):1045-1408.
[12] 施特尔马赫. 酶的测定方法. 钱嘉渊译. 北京:中国轻工业出版社,1992:85-88.
[13] Aravind A,Jeyamohan P,Nair R,et al. AS1411 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanocapsules for tumor cell targeting and drug delivery[J]. Biotechnol Bioeng,2012,109(11):2920-2931.
[14] Ha W,Fan MM,Peng SL,et al. Self-assembly of chitosan-g-PEG and α-cyclodextrin into hollow spheres in aqueous solution[J]. J Control Release,2011,152(S1)e204-e205.
[15] Saracino MA,Marcheselli C,Somaini L,et al. Simultaneous determination of disulfiram and bu -propion in human plasma of alcohol and nicotine abusers[J]. Anal Bioanal Chem,2010,398(5):2155-2161.
[16] 张 敉,杨 林,周云莉,等. 脂质纳米粒提高尿酸氧化酶体外稳定性的初步研究[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(10):1452-1455.
[17] Choi KY,Min KH,Yoon HY,et al. PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumor targetability in vivo[J]. Biomaterials,2011,32(7):1880-1889.
[18] Choi KY,Yoon HY,Kim JH,et al. Smart nanocarrier based on PE-Gylated hyaluronic acid for cancer therapy[J]. ACS Nano,2011,5(11):8591-8599.

(责任编辑:冉明会)

Establishment of the LAMP rapid detection method for mouse Sendai virus

Wang Huijuan[1], *Wang Lei*[1], *Yan Lei*[1], *Pi Guanglu*[2], *Wang Sheng*[1], *Tan Yi*[1], *Lai Guoqi*[1]

(*1. Experimental Animal Center, Chongqing Medical University*;

2. Animal Health Surveillance Institute of Yuzhong District in Chongqing)

【Abstract】***Objective***: To establish a method for the detection of the loop mediated isothermal amplification(LAMP) of mice Sendai virus (SeV). ***Methods***: Using LAMP technology, six specific primers for LAMP were designed with V4 PrimerExploer software, according to the target gene sequence of mice of SeV(gi:9627219) F protein. SeV RNA was extracted with virus RNA kit. SeV specific LAMP(SeV/LAMP) method was established through optimizing the LAMP reaction system. At the same time, validation of specificity, stability, repeatability and sensitivity of the method, and initially clinical testing were performed. ***Results***: The established method of SeV/LAMP can detect RNA SeV specifically, having no reaction with other common pathogens. SeV/LAMP can detect different batches at the same time, or the same batch at different times of RNA SeV. The lower limit of SeV/LAMP detection of SeV RNA was 0.33 pg; the sensitivity of SeV/LAMP detection of SeV RNA was high(respectively 5/30, 2/30) compared with that of ELISA detection method. For clinical detection, the positive rate of SeV was 27.5%(11/40). All reactions can be completed within 1 h. Visual experimental results can be achieved by adding calcein intuitive. ***Conclusion***: LAMP method has the advantages of specificity, accuracy, sensitivity, rapid and simple, and therefore can be used for the rapid detection of SeV in mice.

【Key words】mouse; sendai virus; loop mediated isothermal amplification

仙台病毒(Sendai virus, SeV)属于副黏病毒科，副黏病毒属，是具有细胞融合活性的包膜病毒。核酸型为单股负链 RNA，基因组全长 15 384 bp[1]，编码 6 个结构蛋白(L、P、NP、HN、F、M)和一个非结构蛋白 C，其基因排序次序为：3'-Leader-NP-P+C-M-F-HN-L-Leader-5'[2]。SeV 是实验用大鼠和小鼠严格控制的病毒，其传染性强，容易扩散，在多数情况下呈隐性感染，可使幼鼠的生长发育和成年鼠的繁殖力受到极大影响，同时改变体内细胞免疫反应，干扰实验结果[1]，是啮齿类实验动物最难控制的病毒之一，但又必须严格控制。

目前，已经报道的检测小鼠 SeV 的方法有常规的 RT-PCR、ELISA、间接免疫荧光技术、免疫印迹技术等[3]，但这些方法中存在假阳性率高、特异性差、操作复杂、成本高等缺点。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型核酸扩增技术[4]，具有特异性高、操作简捷、成本低廉、结果直观等优点，目前在一些病原微生物的检测中开始被广泛应用。本研究根据 LAMP 的基本原理，针对小鼠 SeV 的 F 蛋白的基因序列[5]的 8 个特异性区域，设计了 6 条特异性引物，建立了一种快速、高效、实用的 RNA 检测方法。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞及实验动物

猪瘟病毒、羊痘病毒、口蹄疫病毒、蓝耳病毒、沙门杆菌、幽门螺杆菌均由重庆出入境检验检疫局动物检验实验室分离保存；小鼠仙台病毒由苏州西山生物技术有限公司惠赠；vero 细胞由重庆出入境检验检疫局动物检验实验室分离保存；清洁级小鼠 70 只，体质量 22~25 g，来自重庆医科大学动物实验中心[SCXK(渝)2012-0001]，其中 30 只小鼠(C57BL/6 12 只、BALB/c 9 只、KM 9 只)用于 LAMP 和 ELISA 的灵敏度对比检测，剩余 40 只(C57BL/6 24 只、BALB/c 9 只、KM 7只)用于临床样本的检测。小鼠的组织取材在重庆医科大学实验动物中心动物屏障设施内进行 [SYXK(渝)2012-0001]。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM(4567890)和胎牛血清(1414426)购自 Gibco 公司；dNTPs(B3901A)、Taq DNA 聚合酶(M36927)、病毒 RNA 提取试剂盒(M1719)购自天根生化科技(北京)有限公司；荧光染料 SYBR Green I(P6566)购自英俊公司；BioMate 3 紫外蛋白核酸分析仪购自 Thermo Scientifc 公司；LAMP RNA 扩增试剂盒(4X004)、LAMP Real Time Turbidimeter LA-320 仪均购自日本荣研化学株式会社；小鼠仙台病毒的 ELISA 检测试剂盒(K6165)购自苏州西山生物技术有限公司。

1.3 SeV 病毒的扩大培养和 RNA 模板的制备

仙台病毒用 vero 细胞培养，细胞病变达到 80%以上时收获病毒。细胞反复冻融 3 次后，4 500 r/min 离心，弃去细胞碎片等沉淀，收获病毒液。取上述病毒液 1 ml 按试剂盒的操作说明提取 RNA，最后用 40 μl 去 RNA 酶的无菌水溶解，冻存于-80 ℃备用。

1.4 LAMP 引物设计与合成

参照 GenBank 中 SeV(gi:L9627219)的 F 基因序列采用 PrimerExploer V4 软件设计 LAMP 的 6 条特异性引物序列(表 1)，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，用 ddH_2O 溶解后分装，于-20 ℃冰箱保存备用。

表 1 扩增 SeV 的 LAMP 引物序列

Tab.1 LAMP primers for SeV amplification

引物名称	引物序列(5'-3')
F3	TGTGCTCATACACAAGGCAT
B3	GGGGATAAGGCTGTCCACA
FIP	TCGGTTATGTCTGCACCCCCTAAGACGGGGAGGAATGGTAT
BIP	CCAGGGATCCCGCACAACTGTGTTGTGTCCCCCAGGAT
Loop F	AAAGAAGCACGACTGAGTATATGG
Loop B	CCTGACAGCCAGCAAAAGTG

1.5 LAMP 检测方法反应条件的优化

利用 LAMP Real Time Turbidimeter LA-320 仪在反应过程中进行实时浊度监控，对不同引物组开始扩增的时间、最大扩增效率、达到最大扩增效率的时间及进入平台期所需时间等参数进行分析，筛选出对 SeV 核酸高效、特异扩增的LAMP 引物。并且通过设置温度梯度试验和内引物、环引物浓度梯度试验，优化反应体系，选择最适反应温度和最佳内引物、环引物反应浓度比例，确定最优反应体系。当实时浊度仪的扩增效率数值大于等于 0.1 时，判定为阳性结果，否则为阴性结果。

1.6 LAMP 特异性实验

分别以仙台病毒、猪瘟病毒、羊痘病毒、口蹄疫病毒、蓝耳病毒、沙门杆菌、幽门螺杆菌的 DNA 或 RNA 作为模板，按照已建立的 LAMP 检测体系进行扩增，然后分别加入 1 μl SYBR Green I 荧光染料目测观察并进行琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.7 LAMP 稳定性实验

用 7 个不同批次不同时间培养的 SeV 提取的 RNA 作为模板，按照建立的 LAMP 反应检测体系进行扩增。

1.8 LAMP 重复性实验

取 6 个同批次培养的 SeV 的 RNA 产物为模板，按照建立的 LAMP 反应检测体系进行扩增。

1.9 LAMP 灵敏度实验

以已知浓度的 SeV 的 RNA 为模板，进行 10 倍梯度稀释。然后再进行 LAMP 反应，反应后进行琼脂糖凝胶电泳并分析实验结果。

1.10 LAMP 与 ELISA 的灵敏度对比检测

随机挑选 30 只实验小鼠，采用摘眼球采血方法得到血液并分离血清，分别取每只小鼠的少量血清灭活处理，然后用仙台病毒的 ELISA 检测试剂盒进行检测，其余血清提取 RNA，用 LAMP 检测体系进行扩增，对比 2 种检测方法的检测结果。

1.11 临床样本的检测

在重庆医科大学实验动物中心随机抽取 40 只实验小鼠，采血并分离血清后提取 RNA 进行 LAMP 检测，再分别加入 1 μl SYBR Green I 荧光染料目测观察。

2 结 果

2.1 反应体系建立

通过设置反应温度梯度：59 ℃、60 ℃、61 ℃、62 ℃、63 ℃、64 ℃、65 ℃、66 ℃；内引物浓度梯度：20、30、40、50、60、70、80、90 μmol/L；环引物浓度梯度：10、15、20、25、30、35 μmol/L，综合 LAMP 反应扩增的起始时间相对较早、最大扩增效率相对较大、达到相对最大扩增效率的时间最短和进入平台期所需时间最短，最终选定的最优反应温度为：63 ℃，并建立了 LAMP 的最终反应体系(表 2)。

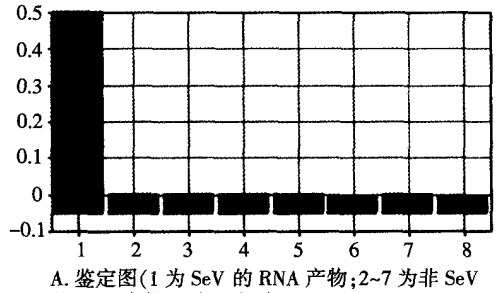
表 2 LAMP 优化后的反应体系

Tab.2 Reaction system of LAMP after optimization

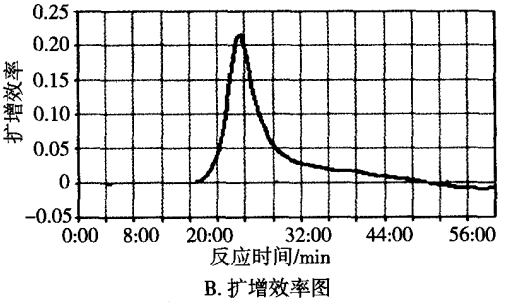
试剂	体积(μl)
2×RM 缓冲液	12.5
50 μmol/L FIP	1
50 μmol/L BIP	1
5 μmol/L F3	1
5 μmol/L B3	1
20 μmol/LLF	1
20 μmol/L LB	1
Bst 酶	1
模板 RNA(3.3 μg/ml)	1
ddH_2O	up to 25

2.2 LAMP 的特异性

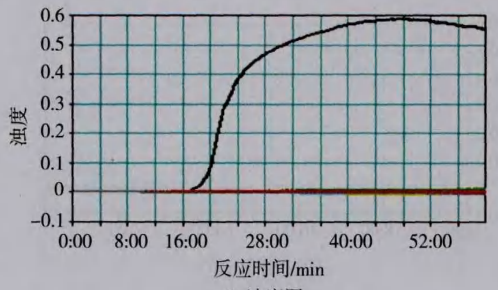
LAMP 实时浊度仪显示：只有小鼠仙台病毒的 RNA 为阳性结果，其他 6 个菌株或毒株的 DNA 或 RNA 均为阴性结果。扩增结束后，分别加入 1 μl SYBR Green I 目测实验结果，并将扩增产物于 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。结果显示：只有以 SeV 为模板才能扩增出清晰的梯形条带和看到翠绿色，说明 LAMP 检测方法具有良好的特异性。



A. 鉴定图(1 为 SeV 的 RNA 产物；2~7 为非 SeV 的 RNA 产物；8 为空白对照)



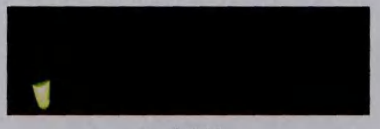
B. 扩增效率图



C. 浊度图



D. 凝胶电泳图（M：DL2000 DNA Marker）



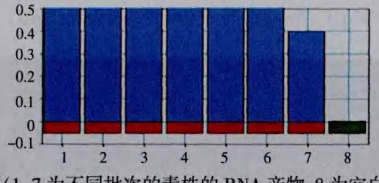
E. 荧光图

图 1 LAMP 方法检测 SeV 的特异性

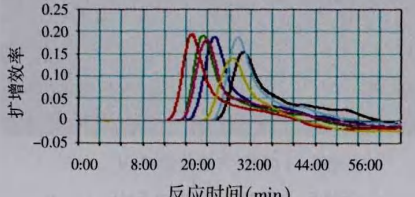
Fig.1 Specificity of LAMP assay for SeV

2.3 LAMP 的稳定性

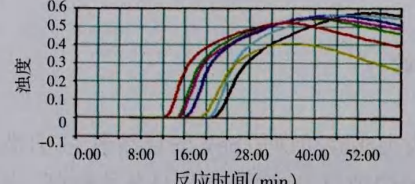
用不同时期不同批次提取的 7 管 SeV 的 RNA 作为模板进行 LAMP 扩增，结果显示：均能鉴定为阳性结果，且扩增效率相差不大，都在 0.15~0.2 的范围之内，浊度结果相差也不大，浊度曲线大致相同（图 2），说明 LAMP 检测方法具有很好的稳定性。



A. 鉴定图（1~7 为不同批次的毒株的 RNA 产物；8 为空白对照）



B. 扩增效率图



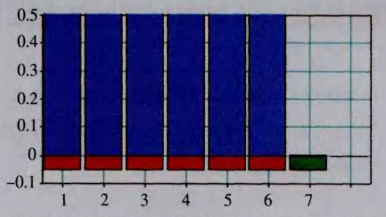
C. 浊度图

图 2 LAMP 方法检测 SeV 的稳定性

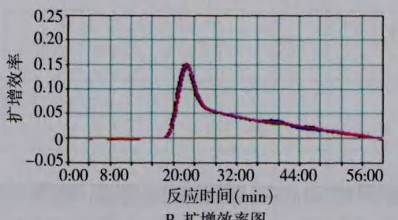
Fig.2 Stability of LAMP assay for SeV

2.4 LAMP 的重复性

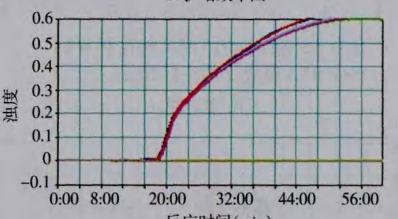
用 6 个同批次培养的 SeV 的 RNA 作为模板，进行LAMP 扩增，实时浊度仪结果显示：均鉴定为阳性，且扩增效率曲线和浊度曲线几乎完全重合（图 3），说明 LAMP 检测方法的重复性极好。



A. 鉴定图（1~6 为同批次毒株的 RNA 产物；7 为空白对照）



B. 扩增效率图



C. 浊度图

图 3 LAMP 方法检测 SeV 的重复性

Fig.3 Repeatability of LAMP assay for SeV

2.5 LAMP 的灵敏度

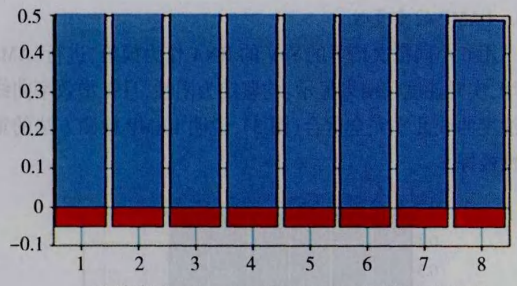
用紫外蛋白核酸分析仪测定模板 SeV RNA 的浓度，经测定 SeV RNA 浓度为 3.3 μg/ml，将其依次进行 10 倍浓度梯度稀释，LAMP 检测体系最低检测到 1×10^{-7} 梯度，故最低检出限为：3.3 μg/ml$\times10^{-7}$，即 0.33 pg。由浊度仪的扩增效率图和浊度图可以看出开始扩增的时间是按照模板的浓度梯度的大小依次开始扩增的（图 4）。

2.6 LAMP 与 ELISA 的灵敏度对比检测

用随机挑选的 30 只实验小鼠的 RNA 做 LAMP 和ELISA 检测，结果显示：ELISA 方法检测出 2 只阳性，而 LAMP 方法检测出 5 只阳性，且被 ELISA 检测出的 2 只阳性小鼠全部被 LAMP 检测出来。ELISA 方法的检出率为：2/30；而已经建立的 LAMP 检测方法的检出率为：5/30，结果说明 LAMP 方法的检出率比 ELISA 方法高、灵敏度比 ELISA 方法高。

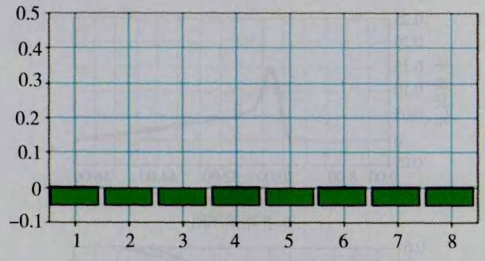
2.7 临床样本检测

对重庆医科大学实验动物中心随机抽取的 40 只质检小鼠的 RNA 进行 LAMP 检测，结果有 11 只为阳性结果，分别加入 1 μl SYBR Green I 荧光染料后肉眼观察可见翠绿色（图 5）。临床检测，SeV 的阳性率为 27.5%，说明 SeV 在实验动物生产部门的实际生产过程中的感染率非常高。



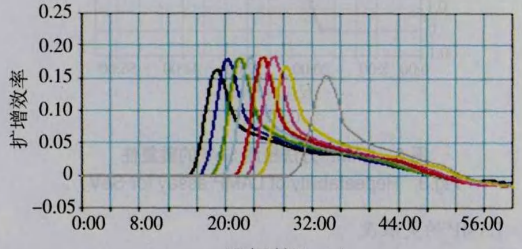
1为浓度为 3.3 μg/ml 的 SeV RNA 原液，2~8 为浓度依次为 3.3 μg/ml×10^{-1}~3.3 μg/ml×10^{-7} 浓度梯度稀释的 SeV RNA 原液

A. 鉴定图



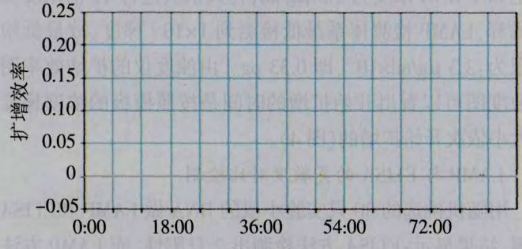
1为 3.3 μg/ml×10^{-8} 浓度梯度稀释的 SeV RNA 原液，2 为空白对照

B. 鉴定图



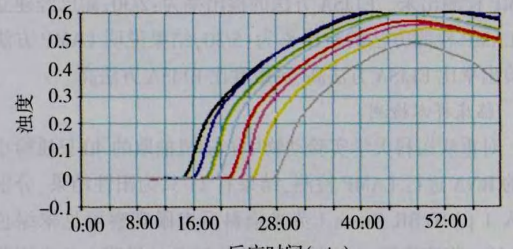
反应时间(min)

C. 扩增效率图



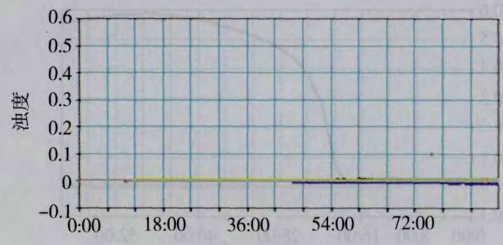
反应时间(min)

D. 扩增效率图



反应时间(min)

E. 浊度图

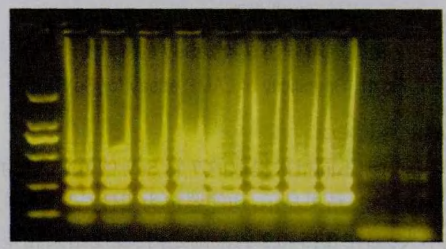


反应时间(min)

F. 浊度图



G. C、E 的图卡



M：DL2000 DNA Marker

H. 凝胶电泳图

图 4　LAMP 方法检测 SeV 的灵敏性

Fig.4　Sensitivity of LAMP assay for SeV

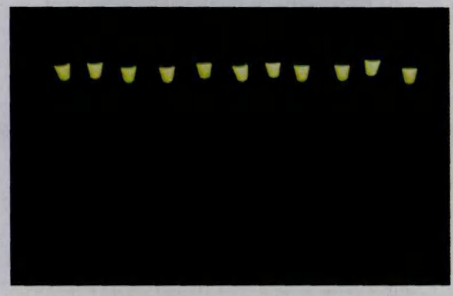


图 5　LAMP 方法检测 SeV

Fig.5　LAMP assay for SeV

3　讨　论

啮齿类实验动物是 SeV 的自然宿主，自然条件下 SeV 能快速感染实验小鼠，且传染性强、容易扩散，实验动物国标将 SeV 列为 SPF 小鼠的必检项目[6]。实验动物 SeV 的检测方法主要有血凝抑制试验、补

体固定试验、ELISA、免疫荧光抗体法等血清学方法和 RT-PCR 等核酸检测方法[7]。我国实验动物国家标准规定的啮齿类实验动物的 SeV 检测方法包括 ELISA[8]和免疫荧光试验等[9]。但是这些检测方法都存在一定的局限性，如试剂盒较为昂贵，检测耗时较长，特异性差，灵敏度不高，容易漏检等，均不能满足实验动物快速检疫和疫情防控需求[10]。因此，建立一种操作简便、仪器设备要求低、灵敏度高、稳定性好、特异性强的快速高效检测 SeV 的技术，对于实验动物的检疫、疫病防控、质量控制等具有极其重要的意义。

LAMP 技术是最近几年发展的一种核酸扩增技术[11]，具有操作简便、成本低廉、快速高效、特异性强、灵敏度高等优点[12]。LAMP 技术的核心和难点是在普通 PCR 的引物的基础上相应的多设计出一对内引物和环引物，通过 6 个位点识别目的片段，更加精确地提高了扩增的特异性和灵敏度。在做本文的研究之前，查询了所有相关文献报道并仔细阅读，关于此方法在小鼠仙台病毒的检测方面并没有全面和详细的报道，已经发表的《逆转录环介导等温扩增技术检测 SeV 的方法建立与应用》的毕业论文，只是设计出了一对内外引物，并没有设计出一对环引物，开始扩增的时间在 25 min 左右，最低检出限为 0.95 pg，而本文通过重新设计 F3 和 B3引物，成功的匹对出一对内外引物和一对环引物，缩短了开始扩增的时间，为 16 min 左右，提高了扩增的灵敏度，最低检出限为 0.33 pg。

该方法采用 6 条特异性引物识别靶基因的 8 个特定位点，在恒温条件下，即可依靠具有链置换活性的大片段 DNA 聚合酶的作用高效扩增片段，而多条引物可以保证扩增的高特异性。本文在小鼠 SeV 的 F 基因保守序列设计 6 条引物，通过优化各种反应条件后，建立了小鼠 SeV 的 LAMP 快速高效检测方法。该 LAMP 检测方法只需将加样管放在 63 ℃的水浴中反应 60 min 即可完成，通过添加荧光染料 SYBR Green I，用肉眼即可判断有无扩增产物，操作方便快捷。在临床样品检测中，与 PCR 及测序结果完全一致，符合率为 100%。如果将此方法运用到以后实验啮齿类动物的 SeV 的质检、微生物控制和疾病的控制中，将大大节省时间，降低成本，提高检测的灵敏度和准确性。本文的研究侧重于 LAMP 技术方法的完善和应用，为以后实验小鼠 SeV 的临床检测提供了更加精确快速的方法，并且可以很快推广应用。

致谢

感谢苏州西山生物技术有限公司时长军博士提供 SeV；重庆出入境检验检疫局王国民教授、聂福平博士、王昱博士对整个实验提供技术支持。

参 考 文 献

[1] 王宗耀，谢建云，邵伟娟，等. 仙台病毒 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国比较医学杂志，2008，18(1)：49-53.

[2] 范文平. 仙台病毒的分子生物学研究进展[J]. 中国实验动物学杂志，1999，9(2)：115-119.

[3] 向志光，佟 魏，李雨涵，等. 大鼠仙台病毒 ELISA、间接免疫荧光和免疫印迹三种检测方法比较[J]. 中国比较医学杂志，2013，38(11)：113-115.

[4] Notomi T，Okayama H，Masubuchi H，et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res，2000，28(12)：e63.

[5] Hayase Y，Tobita K，Kii M，et al. Detection of nucleoprotein gene of Sendai virus in the lungs of rats by touchdown nested reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. Exp Anim，1997，46(4)：307-310.

[6] 实验动物微生物学等级及监测国家标准[S]. GB/14922.2-2011.

[7] 翟新验，卢胜明，刘 均. 仙台病毒的结构和感染动物的诊断[J]. 实验动物科学与管理，2005，22(2)：30-31.

[8] Paker JC，Beirne AJO，Collins MJ. Sensitity of enzyme-linked immunosorbent assay，complement fixation，and hemagglutination inhibition serological tests for detection of sendai virus antibody in laboratory *mice*[J]. *Clin Microbiol*，1979，9(3)：444-447.

[9] 实验动物国家标准[S].GB/T14926.23-2001.

[10] Bootz F，Sieber I，Popovie D，et al. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials[J]. Laboratory Animals，2003，37(4)：341-351.

[11] Nagamine K，Watanabe K，Ohtsuka K，et al.Loop mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template[J]. Clinical Chemistry，2001，47(9)：1742-1743.

[12] 常小斌，刘 洵，程天印，等. 环介导等温基因扩增技术及其应用研究进展[J].畜牧兽医科技信息，2006，36(12)：10-12.

（责任编辑：张辉洁）