

DOI:10.3969/j.issn.1000-1565.2021.05.013

## 环介导等温扩增技术研究进展

石磊<sup>1</sup>, 王曼<sup>2</sup>, 时国强<sup>3</sup>, 董振国<sup>3</sup>, 刘昱<sup>2</sup>

(1. 暨南大学 食品安全与营养研究院, 广东 广州 510000; 2. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071003; 3. 河北三狮生物科技有限公司 研发部, 河北 石家庄 050000)

石磊 博士, 教授, 博士生导师, 1985 年毕业于河北大学生物系并获学士学位, 现任暨南大学食品安全与营养研究院院长, 河北农业大学生命科学学院特聘兼职教授; 国家重大人才工程入选者, 国家重点研发计划首席科学家, 肉食品安全生产技术国家重点实验室主任, 第一届全国食品安全标准审评委员会委员, 中国食源性微生物检测技术创新战略联盟副理事长, 广东省免疫学会副理事长, 广州双螺旋基因技术有限公司董事长; 主要从事病原微生物快速诊断方法、临床微生物耐药基因解析及耐药性基因诊断研究; 在 SCI 收录期刊上发表论文 100 余篇, 申请专利 26 项, 其中发明专利 25 项, 实用新型专利 1 项; 先后主持“国家重点研发计划”、“国家 973 计划项目”、“国家海洋经济创新发展区域示范专项”等 10 余项国家级项目; 2018 年获中国人民解放军军队科技进步二等奖, 2019 年获第四届中国水产学会范蠡科学技术奖技术推广奖、优秀成果奖。



**摘要:** 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术是一种高效、简便、高特异性、无需热循环设备的核酸扩增技术。由于 LAMP 依然具备巨大的改造潜力, 所以近些年来, 一直有研究改进其技术以期达到更好的扩增检测效果。本文对 LAMP 的基本原理、应用领域范围以及技术改良方向进行了综述, 为今后该技术的改良与发展提供参考。

**关键词:** 环介导等温扩增(LAMP); 技术改良; 发展方向

**中图分类号:** Q7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1565(2021)05-0565-07

## Research progress of loop-mediated isothermal amplification technology

SHI Lei<sup>1</sup>, WANG Man<sup>2</sup>, SHI Guoqiang<sup>3</sup>, DONG Zhenguo<sup>3</sup>, LIU Yu<sup>2</sup>

(1. Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou 510000, China; 2. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071003, China; 3. Research and Development Department, Hebei Sanshi Biological Technology Co., LTD, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract:** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is an efficient, simple, highly specific nucleic acid amplification technology without thermal cycling equipment. As LAMP still has great potential for

收稿日期: 2021-06-16

基金项目: 河北省创新能力提升计划项目(205A7601D); 石家庄市高层次科技创新创业人才项目(05202001)

第一作者: 石磊(1961—), 男, 河北保定人, 暨南大学教授, 博士生导师, 主要从事病原微生物核酸分子检测等研究。

E-mail: leishi88@139.com

通信作者: 刘昱(1990—), 男, 山东临沂人, 河北农业大学在读博士研究生, 主要从事病原微生物核酸分子检测的研究。

E-mail: 1085869940@qq.com

modification, many studies have been conducted in recent years to improve its technology in order to achieve better amplification detection results. In this paper, the basic principle, application scope and technical improvement direction of LAMP were reviewed, to provide references for the improvement and development of LAMP technology in the future.

**Key words:** LAMP; technical improvement; research progress

病原微生物常常存在于食品源以及食物产品之中,往往造成疾病传染以及难以估量的经济损失.最初,聚合酶链式反应(PCR)技术常常被应用于食品以及肉源动物的病原微生物检测,然而其具有操作烦琐、检测设备昂贵、检测时间较长、假阳性多等缺点,使得研究人员不断探寻代替该技术的方法.环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术具有高灵敏度、运行简洁、实验设施低廉、高特异性等优势,被转基因检验<sup>[1]</sup>、胚胎性别鉴别<sup>[2-3]</sup>、病原微生物<sup>[4-8]</sup>等方面广泛采纳、应用.迄今为止,关于 LAMP 在食品安全检测、植物水产检疫以及人类医学检测等方面的应用也越来越广泛<sup>[9]</sup>.近年来,研究人员对 LAMP 进行不断改良并与其他技术联用,其巨大的技术优势在检验病原微生物的应用中越来越明显.因此回顾 LAMP 的发展经过以及展望其发展方向,是十分必要的.

## 1 LAMP 技术原理

21 世纪初,Notomi 等<sup>[9]</sup>宣布发明了环介导等温扩增(LAMP),不同于 PCR 仅仅需要设计上下游引物, LAMP 则需要设计包括外引物、内引物最少 4 条引物.利用具有链置换效应以及识别延伸效应的 BstDNA 聚合酶,对目的片段进行大量且快速的扩增. LAMP 的原理在于根据目的基因的保守序列设计出 1 组引物,即内外引物(FIP、BIP、F3、B3),利用 Bst DNA 聚合酶的相关功能对目的基因片段进行特定的指数式体外扩增,以此就可以检测出目的基因. Nagamine 等<sup>[10]</sup>,通过设计 1 对环引物来大幅推进反应速率,耗时减少了 0.5 h,使得 LAMP 检测更加迅速,然而添加环引物会增加引物错配概率.反应主要包括 2 个阶段:1)在适宜的温度下,由外引物以及内引物扩增出“哑铃状”的扩增元件; Bst 酶作用于扩增元件,由于折叠效应,使得 FIP 折叠环化, Bst 酶开始链置换并进行合成,替换出的单链核酸继续环化. 2)从内引物 BIP 的 3' 末端 B1 区间开始扩增,以内引物为模板,促使单链核酸合成延伸及链置换,生成 2 条环化 DNA 片段.内引物上的 B2 区域与其杂交,开始新的循环扩增.另外,可以设计 1 对环引物(LF/LB)以提高扩增效率.扩增终产物具有不同个数茎环结构,并且片段大小也不一致,在凝胶电泳扩增后显现出 1 组特殊的扩增条带.

## 2 LAMP 应用领域

### 2.1 LAMP 在食品安全中的应用

LAMP 在食品安全中检测真菌、细菌等病原微生物污染的应用已经得到了广泛的关注与认可<sup>[11]</sup>.何琳<sup>[12]</sup>通过优化 LAMP 反应体系中的镁离子浓度、甜菜碱浓度、反应温度等条件后,发现对虾的白斑病病毒(white spots syndrome virus)检测只需 45 min 就有了显著的检出效果,在加入 SYBR Green I 后可达到肉眼可见的检测效果.张蕾等<sup>[13]</sup>将 LAMP 检测法从检出限、特异性等方面与 QRT-PCR、普通检测方法进行对比,并将优化调试后的 LAMP 法应用于食品安全相关方面的沙门氏菌检测中.实验发现该方法与实时荧光 PCR 具有几乎一致的特异性,并且检测更加灵敏. Ferrara 等<sup>[14]</sup>建立了一种基于 *fum10* 基因设计引物的方法,并与作为标准的比色法对比.对产伏马菌素 B2 的黑曲霉(*Aspergillus niger*)和卫氏曲霉(*A. welwitschiae*)进行了快速、特异的检测,可用于玉米食品链现场监测,适用于田间粗提取的 DNA 样本的可视性评估.吕观等<sup>[15]</sup>开发了免疫磁珠分离(IMS)联合 LAMP 技术,用来检测牛肉中含有金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)与鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*.)这 2 种常见的食品污染菌.首先将 2 种菌的抗体蛋白进行生物素标记,通过对链霉亲和素磁珠进行功能性修饰,进而浓缩和检验牛肉中的目标病菌.

### 2.2 LAMP 在动植物疫病检测中的应用

近年来,随着等温核酸扩增技术改良研究的不断开展, LAMP 被越来越多的领域认可,逐渐拓展到了家

禽畜牧业疫病防治和人类医学的检测领域,对比 PCR 检测具有明显优势. Chen 等<sup>[16]</sup>采用反转录环介导等温扩增(RT-LAMP)技术,通过将病原病毒 RNA 反转录为 cDNA,再通过 LAMP 扩增检测病原 cDNA,实现了猪瘟病毒(CSFV)的快速检测. 研究发现该方法的检出限比标准 RT-PCR 方法低 100 倍. 谷晓红等<sup>[17]</sup>根据大肠杆菌的 *malB* 基因设计 LAMP 引物,对饮用水中大肠杆菌进行 LAMP 检测,发现该方法可以快速、灵敏、特异性地检测到大肠杆菌(*Escherichia coli*),对防治大肠杆菌引起的相关传染病有积极的意义. Htun 等<sup>[18]</sup>采用 LAMP 法对腐霉病的临床样本进行了检测,发现其检测时间比普通 PCR 检测缩短了一半,比普通 PCR 检测灵敏 10 倍,特异性也几乎一致. 更加确定了 LAMP 检测在对比检测的“金标准”PCR 检测时也具有明显的优势. Niczyporuk 等<sup>[19]</sup>采用 LAMP 检测技术,根据腺病毒外壳蛋白六邻体的基因设计引物,首次为波兰野禽中禽腺病毒(FAV)扩增提供了准确的定量数据,揭示了腺病毒的种间传播,并证明了禽腺病毒在野禽中的传播. Yu 等<sup>[20]</sup>根据 ORF2 基因设计 LAMP 引物,建立了一种快速简便检测临床样品中鹅星状病毒(GAstVs)的 RT-LAMP 方法,并与传统 RT-PCR 和巢式 RT-PCR 方法进行了比较. 结果表明,该方法与后者具有相同的灵敏度,相较前者的方法灵敏度高 1 个数量级.

### 2.3 LAMP 在人类疾病检测中的应用

陈涛等<sup>[21]</sup>分别采用 LAMP 法、直接涂片法、罗氏固体培养法及 QPCR 法对 2 000 多份痰标本中结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)进行检测. 在阳性检出率上,LAMP 法比临床主流检测方法——涂片法高,与另外 2 种检测方法的结果几乎没有差别. Takayama 等<sup>[22]</sup>开发了呼吸道合胞病毒(RSV)与病毒流感病毒(influenza virus)实时 RT-LAMP 技术,原理是设计 1 对荧光淬灭引物(QPrimer),当引物与目的片段杂交时,QPrimer 胞嘧啶上的荧光基团会与目的片段上的鸟嘌呤残基发生光诱导电子穿梭,实现荧光淬灭. 对 113 份临床标本的检测结果表明,该方法能够鉴别呼吸道合胞病毒和流感病毒的类型和亚型,检测特异性为 100%,灵敏度均超过 85.0%,15 min 左右就可以明显观测到阳性扩增曲线.

基于 QPrimer 法,Le 等<sup>[23]</sup>开发并验证了直接 rRT-LAMP 检测流感病毒的方法,该方法采用将冻干的样本加入到反应体系当中,不需要使用 RNA 分离试剂盒进行核酸纯化步骤,也不需要冰上储存和处理试剂,在 10~30 min 内完成检测,在对 310 个临床标本进行验证时显示出高灵敏度和高特异性.

Garcia-Venzor 等<sup>[24]</sup>建立了一种联合 LAMP 技术和 CRISPR-Cas12 技术的方法,首先合成包含新型冠状病毒(SARS-CoV-2)N 基因 mRNA 和人类 RNaseP POP7 mRNA 的基因块,然后体外转录作为指导 RNA,结合利用 CRISPR-Cas12 技术可以迅速切取样品中的新冠病毒中的目的基因片段,然后联用 LAMP 技术可以省略提取 RNA 的步骤,直接检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2). 该方法的检测限为 16 copies/ $\mu$ L,特异性高,成本低.

## 3 荧光 LAMP 技术的改良研究

LAMP 方法虽然具有设备低廉、操作简便、检测快速、特异性强、灵敏度高优势,但是仍有一些技术上的难题:1)扩增得到的目的片段长度存在明显差异,在凝胶电泳检测后,结果不容易分析;2)没有特异性较高且价格低廉的荧光染料,当使用 SYBR Green I 等常规荧光染料时容易造成非特异性结合 dsDNA 从而导致假阳性;3)引物比较复杂,如果设计环引物,6 条引物共存于反应体系之中,可能会造成引物自联产生假阳性;4)扩增产物的片段较大,不易降解,很容易造成严重气溶胶污染,为后续实验造成麻烦;5)扩增目的片段一般选择在 200 bp 左右,很少用于 100 bp 左右的扩增实验. 为了克服这些缺陷,近年来大量的科研工作者采用了各种实验方案进行技术改良,以期该技术可以更加成熟,应用于更加广泛的领域中. 普通的 LAMP 检测,往往只是做到了终端检测,而荧光实时定量检测,不但可以在反应进行中实时检测,而且能够对扩增反应进行定量检测,达到直观详细获得实验数据的目的.

### 3.1 荧光探针法

由于常规的荧光染料常常造成假阳性,给结果分析带来麻烦,所以一些学者尝试使用荧光探针来代替前者承担发射荧光信号功能. 然而,由于 6 条引物或 4 条引物(不设计环引物)已经占用了大量目的片段的结合区域,这就给设计探针增加了难度.

Gadkar 等<sup>[25]</sup>将设计好的环引物 LB 的 3' 端的残基 T 上连接 FAM 荧光基团,该残基处于 3' 端末尾倒数 2、3 位上,且要求残基 T 的 2 侧有 1 个 G 苷,这样环引物探针 LB 在游离状态下由于 G 苷供电子的关系, FAM 荧光基团处于自淬灭的状态,当结合目的片段时, G 苷终止供给电子, FAM 荧光基团被解除电子供给而发射荧光信号,完成了一个自淬灭到除淬灭的过程. Elbeaino 等<sup>[26]</sup>在 LAMP 的内引物之间目的片段的空白处设计了 TaqMan 荧光探针,经过实验测试,特异性明显增强,避免了假阳性现象的出现. 以上 2 种方法虽然在设计引物上都有一定的难度,但是却比 Shi 等<sup>[27]</sup>采用双链探针法反应体系要简单的多. Ding 等<sup>[28]</sup>巧妙地将已经设计好的环引物探针设计成一个发夹探针,当目标探针没有与环引物结合到目标片段上时,由于探针的发夹性质原因,荧光基团与淬灭环引物基团之间距离很近,荧光基团被探针所淬灭而不能直接发出荧光信号;当要与目的片段进行结合时,探针依然在内切酶作用下打开发夹结构,使得两端基团之间距离变大,荧光基团被激活后产生发射信号进而被系统检测到,而且探针仍然可以直接起到环引物作用. 该方法不仅提升了检测的特异性,而且灵敏度也得到了提高. Kim 等<sup>[29]</sup>在 LAMP 的 LF 环引物的 5' 端链接 FAM 荧光基团,在 3' 端链接淬灭基团 BHQ1,称之为同化探针<sup>[30]</sup>,并且根据 LAMP 内引物相对链的上游序列设计的“蜂群引物”<sup>[31]</sup>检测了猪圆环病毒 3 型(PCV3),发现其灵敏度是普通 qPCR 的 10 倍,检出时间为 17 min 左右,比普通 qPCR 快了将近一半,并且 kappa 值为 0.98(置信区间为 0.95~1.00),代表其准确度良好.

### 3.2 优选荧光染料

目前常用的荧光染料有 SYBR Green I、SolisGreen、EvaGreen 等,其中 SYBR 系列荧光染料最常应用于实验室中,然而其对于双链 DNA 的非特异性结合,以及引物自联等都会造成假阳性结果. 所以选择特异性较好的荧光染料对于实验结果的准确性十分重要.

Tangkanchanapas 等<sup>[32]</sup>使用 SYTO9 荧光染料进行 RTPCR 并与羟基萘酚蓝(HNB)和加入钙黄素(加入  $\text{MnCl}_2$ )可视化实验进行对比. 结果发现, SYTO9 具有良好的可视性、灵敏度和特异性. Seyrig 等<sup>[33]</sup>和吴亮等<sup>[34]</sup>研究表明, SYTO8.1 和 SYTO9 对比 SYBR,在其饱和浓度下, DNA 链的合成不会受到干扰,并且荧光信号更强. 检测肺炎支原体时,加入 SYTO9 染料后,当样本中靶基因拷贝数达到  $10^4$  时,样本组荧光即与对照组荧光在 0.5 h 时差异开始变得尤为明显.

## 4 LAMP 其他方面的改良

### 4.1 反应条件的改良

Frisch 等<sup>[35]</sup>通过优化 LAMP 实验得出在检测扩展青霉素时, LAMP 适宜温度为 68 °C,这意味着 Bst 聚合酶的最适宜温度不一定局限在 60~65 °C.

Zhou 等<sup>[36]</sup>在标准的 25  $\mu\text{L}$  LAMP 反应混合物中加入低至 0.15 U 的高保真 DNA 聚合酶. 这一数量足以去除 39 个 3' 端引物的错配碱基,从而使 LAMP 引物在扩增过程中对 3' 端出现的各种错配具有良好的耐受性. 该方法显著提高了扩增效率,特别是对与 6 条引物不匹配的突变体. 无论引物和模板是否特异性互补,新方法的反应时间都比传统 LAMP 方法快 5.6~22.6 min,可用于高度变异病毒的分子诊断,特别适合在资源有限的环境中应用.

### 4.2 LAMP 与其他技术联用

Marciniak 等<sup>[37]</sup>采用可环化探针将滚环扩增与 LAMP 结合的方法,其原理是设计一个“锁式探针”,反应未开始该探针与目的扩增片段结合形成环状,只有当 LAMP 内引物与之结合, LAMP 才可以进行扩增. 此方法成功检测到 31 bp 短片段核酸,解决 LAMP 不能检测短片段的问题. Chen 等<sup>[38]</sup>将 LAMP 和横向流动生物传感器(lateral flow biosensors, LFB)技术联合起来,传感器分为控制线和检测线 2 个结合区域, LAMP 扩增产物两端分别修饰荧光素和生物素,当扩增产物与控制线和检测线结合后,纳米金粒子会结合扩增产物,从而产生肉眼可见的红色条带,从而创建了一种快速可靠的检测关西疟原虫的方法,具有适用于现场监测点检测的优点.

Fu 等<sup>[39]</sup>采用 LAMP 结合电化学的方法研制了一种高灵敏度检测 B 族链球菌的 LAMP 电化学传感器(LAMP E-sensor). 该方法在 1 h 内大量扩增目标基因,并得到了大量二茂铁修饰的产物(Fc),用于转化成

为电化学信号,这些Fc修饰的产物可以通过Fc和 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)之间的宿主客体相互作用连接 $\beta$ -CD。此外,亚甲基蓝(MB)嵌入在LAMP产物的双链中,使得MB接近化学传感器电极,产生了强烈的电化学信号。使用该MB作为报告基因、Fc作为内部对照,LAMP E传感器显示出1~100 pg/L的宽检测范围和0.23 fg/L的较低检测限,具有良好的重复性和灵敏度。

Sharma等<sup>[40]</sup>结合LAMP法开发了一种全自动芯片微流控实验平台,通过精确地控制磁珠的移动以确保吸附在其表面的目的核苷酸片段得到纯化和扩增。由于白晶体紫(LCV)染料的比色特性,只要在扩增室中观察到寨卡病毒靶标发生颜色变化,就可以判定其为寨卡病毒阳性。其不但具有优异特性,而且在样品加载后的任何步骤都不需要人为干预,降低了因为技术操作不规范影响检测结果的概率。

### 4.3 多重LAMP检测法

多重LAMP法指的是在一个反应体系中同时检测2种或者3种目的基因,要求在反应期间不能出现引物自联、错配的状况,这就要求设计引物时避免这些问题,提升引物设计的标准。

Siddique等<sup>[41]</sup>利用*groEL*和*fkfB*基因,建立了快速、经济、物种特异性和高灵敏度的检测鳗鲡和溶藻弧菌的单、双LAMP检测方法,用于海水人为污染的评估。该研究采取的检测方式为颜色反应和凝胶电泳相结合的方法,不能实时监测污染程度。

Lin等<sup>[42]</sup>设计了一种双重RT-LAMP-LFD检测法来检测联合引起虾白尾病的罗氏沼虾诺达病毒(MrNV)与超小型病毒(XSV),该方法分别设计了2套LAMP内外引物,并在内引物FIP的5'端上标记了异硫氰酸荧光素(FITC),经验证该方法特异性和检出限都十分优异。

Kim等<sup>[43]</sup>创建了一种三重环介导等温扩增检测方法,并将其应用于具有代表性的食源性致病菌沙门氏菌模型中,以考察各项性能及对污染食品中病原菌的检测能力。根据3种病菌为沙门氏菌属及其亚种I和鼠伤寒沙门氏菌的靶基因设计了3套LAMP引物,每个引物只扩增目标基因,而不与非目标基因杂交。该方法的检出限为2.5 pg/ $\mu$ L鼠伤寒链球菌DNA。

## 5 未来展望

LAMP自2000年问世以来,以其优异的性能和低难度的操作,引起了广泛的关注与研究热情。近年来,关于LAMP的研究从未间断过,这不仅仅是因为其具有强大的技术包容性可以与其他技术相联合的优势,更因为其巨大的市场潜力。至今,我国已研制出近20种LAMP检测试剂盒,并申请专利进行销售<sup>[44]</sup>。前面已经提到,尽管LAMP有如此多的优势,其需要改良的方面仍有不少,今后LAMP将会朝着克服这些劣势的方向发展,使其能更好地为人类社会服务。

### 参 考 文 献:

- [1] LIU M, LUO Y, TAO R, et al. Sensitive and rapid detection of genetic modified soybean (roundup ready) by loop-mediated isothermal amplification[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(11): 2365-2369. DOI:10.1271/bbb.80723.
- [2] WRIGHT C F, BURTON H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis[J]. Hum Reprod Update, 2009, 15(1): 139-151. DOI:10.1093/humupd/dmn047.
- [3] 张立, 黄春华, 黄河, 等. LAMP法性别鉴定在胚胎工程技术中的应用[J]. 现代畜牧兽医, 2006(6): 9-11. DOI:10.3969/j.issn.1672-9692.2006.06.006.
- [4] BALNE P K, BASU S, SHARMA S. Loop-mediated isothermal amplification for rapid diagnosis of tubercular uveitis[J]. JAMA Ophthalmol, 2015, 133(2): 225-226. DOI:10.1001/jamaophthalmol.2014.4257.
- [5] SCHEEL C M, ZHOU Y T, THEODORO R C, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 483-488. DOI:10.1128/JCM.02739-13.
- [6] 初亚男, 成思佳, 梁超, 等. 可视化等温扩增法快速筛查并分型禽流感病毒[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(7): 670-673.

- [7] CHENG S J, CHEN Z Y, CHU Y N, et al. Sensitive detection of influenza A (H1N1) virus by isothermal amplification in a single tube[J]. Chin J Anal Chem, 2011, 39(3): 335-340. DOI:10.1016/S1872-2040(10)60424-0.
- [8] HARA-KUDO Y, KONISHI N, OHTSUKA K, et al. Detection of *Verotoxigenic Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 122(1/2): 156-161. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.078.
- [9] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63. DOI:10.1093/nar/28.12.e63.
- [10] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223-229. DOI:10.1006/mcpr.2002.0415.
- [11] 张曼, 刘宝林, 高志贤. 环介导等温扩增技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6124-6130. DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2019.18.030.
- [12] 何琳. 环介导等温扩增技术快速检测水产动物病原的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 1-93.
- [13] 张蕾, 张海予, 魏海燕, 等. 环介导等温扩增方法在食品中沙门菌检测的应用和评价[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(6): 520-524. DOI:10.13590/j.cjfh.2013.06.020.
- [14] FERRARA M, LOGRIECO A F, MORETTI A, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of fumonisin producing *Aspergillus species*[J]. Food Microbiol, 2020, 90: 103469. DOI:10.1016/j.fm.2020.103469.
- [15] 吕观, 常彦磊, 石磊. 免疫磁珠-环介导等温扩增快速检测牛肉中的鼠伤寒沙门氏菌与金黄色葡萄球菌[J]. 肉类研究, 2019, 33(7): 42-48. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20190612-124.
- [16] CHEN L, FAN X Z, WANG Q, et al. A novel RT-LAMP assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus[J]. Virol Sin, 2010, 25(1): 59-64. DOI:10.1007/s12250-010-3043-2.
- [17] 谷晓红, 谭晴晴, 刘艳艳, 等. 利用环介导等温扩增技术快速检测饮用水中的大肠杆菌[J]. 山东农业科学, 2017, 49(1): 130-135. DOI:10.14083/j.issn.1001-4942.2017.1.028.
- [18] HTUN Z M, ROTCHANAPREEDA T, RUJIRAWAT T, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of *pythium insidiosum*[J]. Int J Infect Dis, 2020, 101: 149-159. DOI:10.1016/j.ijid.2020.09.1430.
- [19] NICZYPORUK J S, KOZDRUŃ W, CZEKAJ H, et al. Detection of fowl adenovirus D strains in wild birds in Poland by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)[J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1): 58. DOI:10.1186/s12917-020-2271-4.
- [20] YU Z R, ZHANG D, YANG K K, et al. A simple and rapid diagnostic method to detect new goose astrovirus using reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. 3 Biotech, 2019, 10(1): 1-6. DOI:10.1007/s13205-019-2006-z.
- [21] 陈涛, 周琳, 周杰, 等. 环介导等温扩增法快速检测结核分枝杆菌的临床应用评估[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(7): 413-418.
- [22] TAKAYAMA I, NAKAUCHI M, TAKAHASHI H, et al. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus[J]. J Virol Methods, 2019, 267: 53-58. DOI:10.1016/j.jviromet.2019.02.010.
- [23] LE THI N, IKUYO T, NGUYEN GIA B, et al. A clinic-based direct real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for influenza virus[J]. J Virol Methods, 2020, 277: 113801. DOI:10.1016/j.jviromet.2019.113801.
- [24] GARCIA-VENZOR A, RUEDA-ZARAZUA B, MARQUEZ-GARCIA E, et al. SARS-CoV-2 direct detection without RNA isolation with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and CRISPR-cas12[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 627679. DOI:10.3389/fmed.2021.627679.
- [25] GADKAR V J, GOLDFARB D M, GANTT S, et al. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 5548. DOI:10.1038/s41598-018-23930-1.
- [26] ELBEAINO T, INCERTI O, DAKROUB H, et al. Development of an FTP-LAMP assay based on TaqMan real-time PCR and LAMP for the specific detection of *Xylella fastidiosa* De Donno and mulberry strains in both plants and insect vectors[J]. J Microbiol Methods, 2020, 175: 105992. DOI:10.1016/j.mimet.2020.105992.
- [27] SHI C, SHANG F J, PAN M, et al. The isothermal amplification detection of double-stranded DNA based on a double-

- stranded fluorescence probe[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 80: 54-58. DOI:10.1016/j.bios.2016.01.039.
- [28] DING X, YIN K, LI Z Y, et al. Cleavable hairpin beacon-enhanced fluorescence detection of nucleic acid isothermal amplification and smartphone-based readout[J]. Sci Rep, 2020, 10: 18819. DOI:10.1038/s41598-020-75795-y.
- [29] KIM H R, LIM D R, CHAE H G, et al. Advanced target-specific probe-based real-time loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid and specific detection of porcine circovirus 3[J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 67(6): 2336-2344. DOI:10.1111/tbed.13671.
- [30] KUBOTA R, ALVAREZ A M, SU W W, et al. FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Biol Eng Trans, 2011, 4(2): 81-100. DOI:10.13031/2013.38509.
- [31] MARTINEAU R L, MURRAY S A, CI S, et al. Improved performance of loop-mediated isothermal amplification assays via swarm priming[J]. Anal Chem, 2017, 89(1): 625-632. DOI:10.1021/acs.analchem.6b02578.
- [32] TANGKANCHANAPAS P, HÖFTE M, DE JONGHE K. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) designed for fast and sensitive on-site detection of *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd)[J]. J Virol Methods, 2018, 259: 81-91. DOI:10.1016/j.jviromet.2018.06.003.
- [33] SEYRIG G, STEDTFELD R D, TOURLOUSSE D M, et al. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics[J]. J Microbiol Methods, 2015, 119: 223-227. DOI:10.1016/j.mimet.2015.11.004.
- [34] 吴亮,夏雯,阴晴,等. LC-MS/MS法同时测定欧前胡素与异欧前胡素血药浓度[J]. 临床检验杂志, 2020(1):7-10.
- [35] FRISCH L M, MANN M A, MAREK D N, et al. Development and optimization of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the species-specific detection of *Penicillium expansum*[J]. Food Microbiol, 2021, 95: 103681. DOI:10.1016/j.fm.2020.103681.
- [36] ZHOU Y, WAN Z, YANG S, et al. A mismatch-tolerant reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method and its application on simultaneous detection of all four serotype of dengue viruses[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1056. DOI:10.3389/fmicb.2019.01056.
- [37] MARCINIAK J, KUMMEL A, ESENER S, et al. Coupled rolling circle amplification loop-mediated amplification for rapid detection of short DNA sequences[J]. Biotechniques, 2008, 45(3): 275-280. DOI:10.2144/000112910.
- [38] CHEN C, LU J, LONG B, et al. Detection of *Mycobacterium kansasii* using a combination of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and lateral flow biosensors[J]. Int Microbiol, 2021, 24(1): 75-82. DOI:10.1007/s10123-020-00143-z.
- [39] FU Y X, ZHOU X Y, DUAN X L, et al. A LAMP-based ratiometric electrochemical sensing for ultrasensitive detection of *Group B Streptococci* with improved stability and accuracy[J]. Sensor Actuat B: Chem, 2020, 321: 128502. DOI:10.1016/j.snb.2020.128502.
- [40] SHARMA S, KABIR M A, ASGHAR W. Lab-on-a-chip zika detection with reverse transcription loop-mediated isothermal amplification-based assay for point-of-care settings[J]. Arch Pathol Lab Med, 2020, 144(11): 1335-1343. DOI:10.5858/arpa.2019-0667-oa.
- [41] SIDDIQUE M P, JANG W J, LEE J M, et al. Detection of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio alginolyticus* by singleplex and duplex loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays targeted to *groEL* and *fliB* genes[J]. Int Microbiol, 2019, 22(4): 501-509. DOI:10.1007/s10123-019-00079-z.
- [42] LIN F, LIU L, HAO G J, et al. The development and application of a duplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick method for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus isolated in China[J]. Mol Cell Probes, 2018, 40: 1-7. DOI:10.1016/j.mcp.2018.05.001.
- [43] KIM M J, KIM H J, KIM H Y. Direct triplex loop-mediated isothermal amplification assay for the point-of-care molecular detection of *Salmonella* genus, subspecies I, and serovar *Typhimurium*[J]. Food Control, 2021, 120: 107504. DOI:10.1016/j.foodcont.2020.107504.
- [44] 杨粤,付博宇,张蕴哲,等. 环介导等温扩增检测技术的应用与方法改进[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1526-1530. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2016.04.034.

(责任编辑:赵藏赏)