

环介导等温扩增核酸技术及其在食品安全检测领域的应用

杨小鹃^{1,2} 吴清平^{1,2*} 张菊梅^{1,2} 张淑红^{1,2} 徐晓可^{1,2}

(1. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

(2. 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

摘要: 环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, 简称 LAMP)是利用能识别靶序列上6个位点的4个特殊设计的引物和一种具有链置换活性的DNA聚合酶,在恒温条件下,特异、高效、快速地扩增核酸的新技术。该技术在1 h内扩增效率可达到 10^9 – 10^{10} 个数量级,扩增产物是一系列反向重复的靶序列构成的茎环结构和多环花椰菜样结构的DNA片段混合物,电泳后在凝胶上显现出由不同大小的区带组成的阶梯式图谱。近年来LAMP技术以其特异性强、等温灵敏、操作简单、产物易检测等优点已经应用于食品安全检测领域的多个方面。

关键词: 环介导等温扩增, LAMP, 食品安全, 检测

Loop-mediated Isothermal Amplification Method for Detection of Nucleic Acids and Its Application in Food Safety Inspection

YANG Xiao-Juan^{1,2} WU Qing-Ping^{1,2*} ZHANG Ju-Mei^{1,2} ZHANG Shu-Hong^{1,2}
XU Xiao-Ke^{1,2}

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel nucleic acid amplification method that amplified DNA with high specificity, efficiency and rapidity under isothermal conditions using a set of four specially designed primers and a DNA polymerase with strand displacement activity. The cycling reaction continues with accumulation of 10^9 – 10^{10} copies of target in less than an hour. The final products are stem-loop DNA with several inverted repeats of the target and cauliflower-like structures with multiple loops. A positive reaction would be shown as a ladder-like pattern in a gel electrophoresis analysis. Because of its simplicity, high sensitivity and specificity, the LAMP method has been widely applied to the field of food safety inspection.

Keywords: Loop-mediated isothermal amplification, LAMP, Food safety, Inspection

基金项目: 广东省农业领域科技计划项目重点专项(No. 2009A020101004); 广东省科学院青年科学研究基金(No. qnjj20099)

* 通讯作者: Tel: 86-20-87688132; E: wuqp@gdas.ac.cn, youngxj@126.com
收稿日期: 2010-02-26; 接受日期: 2010-05-12

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

随着世界经济的全球化,食品跨国界和跨地区的流通越来越频繁,各种食品安全事故和隐患也呈迅速扩展和蔓延之势,对人类健康和公共安全构成极大的威胁;另一方面,随着社会生产力的发展和生活水平的提高,人们对食品安全的要求也越来越高。这些因素促使了各种食品安全保障体系(例如 HACCP、GMP)的推广和应用,也促进了食品安全检测技术的改良、改进和提高。

分子生物学技术,特别是 PCR 作为一种简便高效的核酸扩增技术在食品安全检测方面发挥着重大作用。PCR 方法尽管操作起来比较简单易行,扩增产物在短时间内能够大量聚集,但是操作过程必须有高精度的温度循环装置,从而使得这种强有力的方法不能在实地现场广泛应用。近年来产生了一种替代 PCR 的价廉、快速、简便、准确的核酸扩增方法——环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。LAMP 技术是 Notomi 等^[1]首先提出的一种新的核酸扩增技术,它依赖于 4 条特异性引物和一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶(Bst DNA 聚合酶),在等温条件下可高效、快速、高特异地扩增靶序列。随后,人们对 LAMP 技术进行了不断改良,Mori 等^[2]设计了一种 LAMP 产物检测方法,可以根据浊度变化或是否形成白色沉淀来进行实时判断;Nagamine 等^[3]通过改良引物,增加了 2 条环引物(Loop F, Loop B),加快了反应速度,使反应时间缩短近 50%,提高了检测效率。LAMP 技术在 1 h 内能扩增出 10^9 靶序列拷贝,扩增产物是一系列反向重复的靶序列构成的茎环结构和多环花椰菜样结构的 DNA 片段的混合物,电泳后在凝胶上显现出由不同大小的区带组成的阶梯式图谱。LAMP 技术以其特异性强、等温灵敏、操作简单、产物易检测等优点在食品安全检测及其它领域得到了日益广泛的应用。与 PCR 相比,LAMP 反应在一般恒温条件下进行,不需要 PCR 所必需的精密温度循环装置,所用设备简单、花费少,同时又能满足食品安全快速检测的需要,所以,比 PCR 更具推广性,特别适用于基层单位及实地现场检测,有利于从源头控制食品安全事件的发生。

1 LAMP 反应原理

1.1 LAMP 引物设计

LAMP 引物设计是基于靶基因 3'端的 F3c、F2c

和 F1c 区以及 5'端的 B1、B2 和 B3 区 6 个不同的位点设计的一对内引物和一对外引物。内引物包括前内引物 FIP (Forward inner primer)和后内引物 BIP (Backward inner primer),外引物包括 F3 和 B3 (图 1)。

FIP 引物:由 F1c 区(靶基因 F1 序列的互补序列)和 F2 区(同靶序列 F2)组成,TTTT 链接 F1c 和 F2。

F3 引物:上游外部引物,由 F3 区组成,并与靶基因的 F3c 区域互补。

BIP 引物:由 B1c 区(靶基因 B1 序列的互补序列)和 B2 区(同靶序列 B2)组成,TTTT 链接 B1c 和 B2。

B3 引物:下游外部引物,由 B3 区域组成,和靶基因的 B3c 区域互补。另外,还可通过在 F1、F2 之间和 B1、B2 之间设计两条环引物(Loop F、Loop B)使反应速度提升 $1/2-1/3$ ^[3]。

除了一般的引物设计原则外,比如避免引物二聚体形成、3'端发夹结构、引物自身互补,LAMP 引物设计还有它自身的特点,尤其是 4 条引物的退火温度之间的关系。一般 LAMP 引物的退火温度按照以下顺序进行设计:F1 和 B1 > F2 和 B2 > F3 和 B3,且要求 F2、B2 的退火温度控制在 $60^{\circ}\text{C}-65^{\circ}\text{C}$ ^[1],这是 Bst DNA 聚合酶的作用温度范围。LAMP 引物设计还需考虑扩增片段的大小,包括 F2 区、B2 区在内的目的片段在 300 bp 以下时,可以获得较好的扩增效果^[1]。扩增过程中,茎环结构的形成对 LAMP 反应至关重要,实验发现引物设计时 F2c(B2c)和 F1c(B1c)之间的距离大于 40 bp,扩增易成功^[1]。

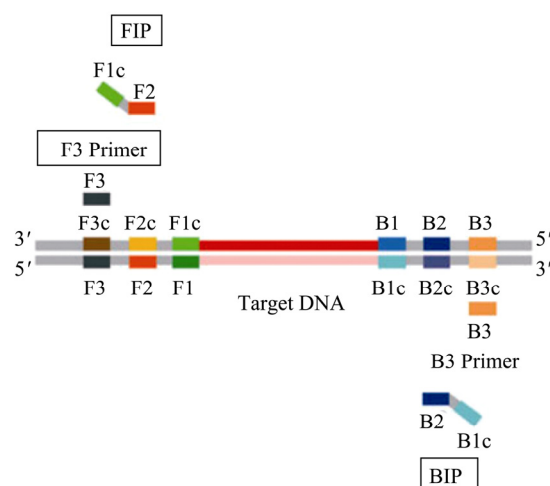


图 1 靶序列上 6 个特异区域及引物设计^[4]

Fig. 1 Six distinct regions of target DNA and primer design of the LAMP reaction^[4]

1.2 LAMP 扩增原理

哑铃状起点结构形成(图 2): DNA 在 65°C 左右处于动态平衡状态, 任何一个引物向双链 DNA 的互补部位进行碱基配对延伸时, 另一条链就会解离, 变成单链。由于引物之间退火温度高低不同, 在链置换型 Bst DNA 聚合酶的作用下, FIP 引物 F2 区段最先与模板 DNA 互补序列配对, 延伸合成互补链。F3 引物与 F2c 前端 F3c 序列互补, 以 3'末端为起点, 通过链置换型 DNA 聚合酶的作用, 一边置换之前 FIP 引物合成的 DNA 链, 一边合成自身 DNA, 如此向前延伸, 最终 F3 引物合成而得的 DNA 链与模板 DNA 形成双链。由 FIP 引物先合成的 DNA 链被 F3 引物进行链置换产生一单链, 这条单链在 5'末端存在互补的 F1c 和 F1 区段, 于是发生自我碱基配对, 形成环状结构。同时, BIP 引物同该单链杂交结合, 以 BIP 引物的 3'端为起点。合成互补链, 在此过程中环状结构被打开。接着, 类似于 F3, B3 引物从 BIP 引物外侧插入, 进行碱基配对, 以 3'端为起点, 在聚合酶的作用下, 合成新的互补链。通过上述两过程, 形成双链 DNA。而被置换的单链 DNA 两端存在互补序列, 自然发生自我碱基配对, 形成环状结构, 于是整条链呈现哑铃状结构。该结构是 LAMP 法基因扩增循环的起始结构。至此为止的所有过程都是为了形成 LAMP 法基因扩增循环的起点结构。

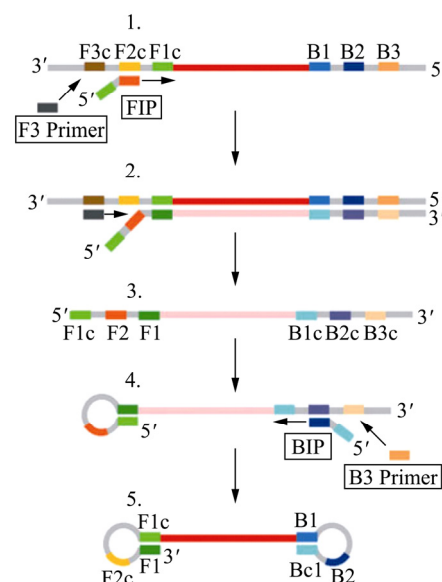


图 2 LAMP 反应原理(哑铃状起点结构形成合成阶段)^[4]
Fig. 2 Principle of LAMP method (Starting structure producing step)^[4]

LAMP 反应扩增循环(图 3): 首先在哑铃状结构中, 以 3'末端的 F1 区段为起点, 以自身为模板, 进行 DNA 合成延伸。与此同时, FIP 引物 F2 与环上单链 F2c 杂交, 启动新一轮链置换反应。解离由 F1 区段合成的双链核酸。同样, 在解离出的单链核酸上也会形成环状结构。在环状结构上存在单链形式 B2c, BIP 引物上的 B2 与其杂交, 启动新一轮扩增。

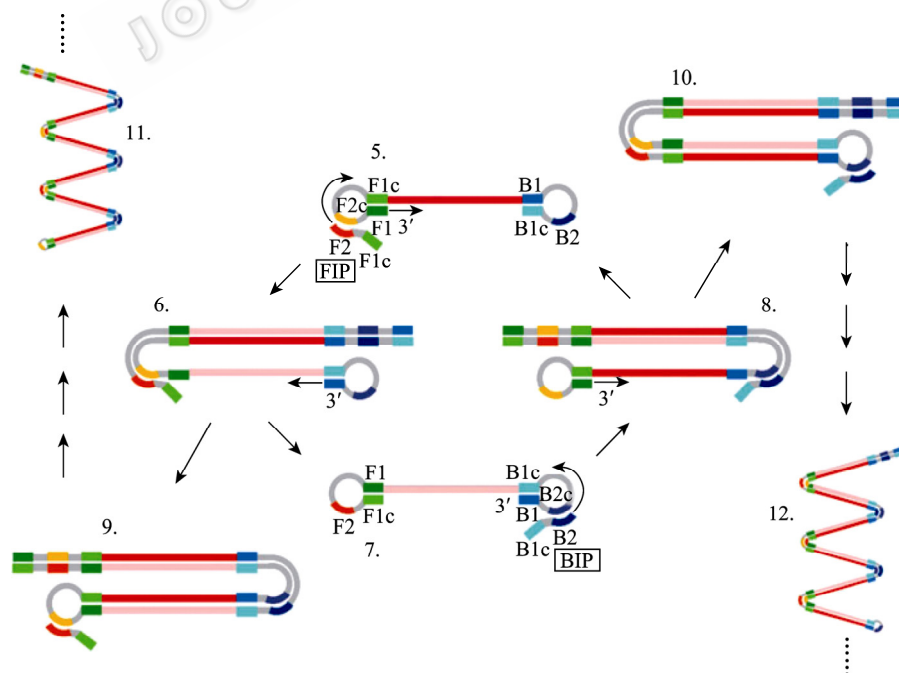


图 3 LAMP 反应原理(循环扩增阶段)^[4]
Fig. 3 Principle of LAMP method (Cycling amplification step)^[4]

经过相同的过程,又形成环状结构。通过此过程,结果在同一条链上互补序列周而复始形成大小不一的结构,靶 DNA 序列大量交替重复产生,数量级可达 10^9 。

2 LAMP 技术的基本操作过程

LAMP 等温扩增反应体系包含了引物、模板 DNA、Bst DNA 聚合酶、dNTPs 和缓冲液。其基本操作过程是将 LAMP 反应体系(除 Bst DNA 聚合酶外)在 95°C 加热 5 min 后,冷却,再加入 Bst DNA 聚合酶,在 65°C 保温 60 min,然后在高于 80°C 的温度下加温 10 min 终止反应^[1]。LAMP 的反应体系一般为 25 μL ,外引物的浓度一般是内引物的 1/4–1/10^[1]。

3 LAMP 技术的特点

3.1 灵敏度高

LAMP 一般能检测到比 PCR 低 10 倍的拷贝数^[5–6],对于低浓度核酸样本的检测比 PCR 效果好。

3.2 特异性强

针对病原微生物特异性基因靶序列设计的两对内外引物可以严格地识别靶序列上的 6 个独立区域,所以 LAMP 反应受到反应混合物中存在的非靶序列 DNA 存在的影响可能性比 PCR 小。

3.3 速度快

此反应是在恒温条件下(60°C – 65°C),没有温度循环变化上的时间损失,这个温度范围正适合酶的作用。在 30–60 min 内就可以将几个拷贝的靶基因扩增到 10^9 水平,数量在 10–20 g/25 L,比 PCR 更快,能满足样品快速检测的要求。

3.4 扩增产物鉴别方便

3.4.1 副产物——焦磷酸镁的浊度检测: 扩增结果可直接对扩增副产物焦磷酸镁白色沉淀通过肉眼进行判断或者对其浊度进行检测,在核酸大量合成时,从 dNTPs 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合,产生副产物——焦磷酸镁沉淀。具有极高的特异性,只要用肉眼观察或浊度仪在 400 nm 光下检测沉淀浊度就能够判断扩增与否,是鉴定反应是否进行的最直接的参照。

3.4.2 凝胶电泳检测: LAMP 扩增产物可以像 PCR 反应一样利用凝胶电泳并结合成像系统进行检测。

成像结果显示 LAMP 反应会产生许多不同大小的条带,条带大小相差 100 bp 左右,可以通过产生的不同梯型来区分特异性扩增和非特异性扩增。反应产物还可以用限制性酶进行消化来鉴定产物的结构和大小。

3.4.3 荧光染料检测: 也可用结合双链 DNA 的荧光染料 SYBR Green I 染色,在紫外灯或日光下通过肉眼进行判定,如果含有扩增产物,反应混合物变绿;反之,则保持 SYBR Green I 的橙色不变。

4 LAMP 技术在食品安全检测领域的应用

目前, LAMP 技术在国内外已有大量报道,大部分涉及在食品安全检测、临床诊断等方面,并且报道检测效果优于 PCR 方法。LAMP 技术在食品安全检测方面的应用领域与 PCR 技术类似,适用的领域包括:食源性致病菌检测、食源性病毒检测、真菌毒素检测、食源性寄生虫检测和食品转基因成分检测等。

4.1 食源性致病菌检测

4.1.1 致泻性大肠杆菌(Diarrheogenic *Escherichia coli*, DEC) LAMP 检测: 大肠杆菌中一些特殊的血清型菌株具有病原性,能引起人类腹泻,通常称这类大肠杆菌为致泻性大肠杆菌。DEC 被分为几大类:肠出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC),肠致病性大肠杆菌(Enteropathogenic *E. coli*, EPEC),侵袭性大肠杆菌(Enteroinvasive *E. coli*, EIEC),产肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)等。由进食致泻性大肠杆菌污染的食品而引起的食源性疾病的发病率居高不下,因此各国对此高度重视。致泻性大肠杆菌类型多、血清型复杂,常规检测方法难以有效地实现快速、灵敏和全面地检测。Song 等^[7]应用 LAMP 技术实现了对 EIEC 和志贺氏菌同源基因 *ipaH* 的检测。整个实验在 2 h 内完成,其检测限达到 8 CFU/反应管,与 PCR 比较,PCR 检测限为 8×10^2 CFU/反应管。Hara-Kudo 等^[8]在应用 LAMP 技术对 ETEC 进行检测时,针对 ETEC 的志贺样毒素 VT1 和 VT2 设计了内外引物及单、双环引物,扩增毒素基因 *VT1*、*VT2*、*VT2vha*、*VT2vhb* 和 *VT2vp1*,灵敏度达到 0.7 CFU/反应管,也证实 LAMP 的检测灵敏度高于普通 PCR,且在污

染样品的检测中比 PCR 的回收率高。Wang 等^[9]将 LAMP 技术应用于 EHEC 主要血清型 O157 的检测, 针对特异性抗原基因 *rfbE* 设计了内外引物及环引物, 在 40 min 内完成检测, 在牛奶中检测限达到 410 CFU/mL, 而同样条件下, 普通 PCR 的检测限为 4.1×10^3 CFU/mL, LAMP 方法检测的结果与 ISO16654: 2001 的符合率达到 100%。

4.1.2 副溶血性弧菌(*Vibrio Parahemolyticus*) LAMP 检测: 副溶血性弧菌是沿海地区重要的食源性致病菌, 主要引起水产品食物中毒。徐芊等^[10]将 LAMP 技术应用于副溶血性弧菌的快速检测, 针对副溶血性弧菌不耐热溶血毒素基因 *tlh* 设计引物进行 LAMP 扩增, 对扩增反应进行优化, 最佳反应时间为 60 min, 反应温度为 60°C。对哈氏弧菌等弧菌属细菌以及单增李斯特菌等非弧菌属细菌共 14 株进行 LAMP 扩增, 证明引物具有很高的特异性。对于基因组 DNA 和纯培养物的检测灵敏度分别为 90 fg 和 24 CFU/mL, 对模拟样品的检测限为 89 CFU/g。

4.1.3 阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) LAMP 检测: 胡连霞等^[11]也建立了快速检测婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的 LAMP 扩增技术。以阪崎肠杆菌 16S rRNA 和 23S rRNA 基因间区序列作为靶序列, 设计内、外引物和环引物, 检测限达到 0.101 CFU/mL, 人工污染阪崎肠杆菌的婴儿配方奶粉的检出限为 1.1 CFU/mL, 从样品处理到报告结果, 耗时 1 h。而 PCR 法检测阪崎肠杆菌的检出限为 101 CFU/mL, 人工污染阪崎肠杆菌的婴儿配方奶粉的检出限为 1100 CFU/mL。再一次证实了 LAMP 方法是特异性强、敏感性高的快速检测方法。

近年来, LAMP 快速检测技术研究不断增多, 针对沙门氏菌(*Salmonella* spp.)^[12]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[13]、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)^[6]等食源性致病菌的 LAMP 检测方法也都建立了起来, 以快速检测食物中是否含有这些致病微生物, 从而预防疾病的发生。

4.2 食源性病毒检测

4.2.1 诺如病毒(Norovirus, NoV) LAMP 检测: 诺如病毒是引起人类腹泻的一种重要的传染性病原体, 可在幼儿园、医院、学校传播流行, 由于诺如病毒培养困难, 目前一般通过电镜或 RT-PCR 进行检测。Fukuda 等^[14]利用 LAMP 原理设计 RT-LAMP 来

检测诺如病毒, 针对诺如病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶基因的特异性序列设计了 13 条引物, 成功检测了不同亚型的诺如病毒, 检测限为 10^2 – 10^3 copy/反应管, 检测粪便标本时, RT-LAMP 法检测诺如病毒 G1 和 G2 型的阳性率均为 100%; 而 RT-PCR 法检测诺如病毒 G1 和 G2 型的阳性率分别为 94%和 100%。这个发现证实 RT-LAMP 法在发生食物和人际传播的胃肠炎时有潜力作为一个诊断诺如病毒的基因检测手段。

4.2.2 脊髓灰质炎病毒(Poliovirus, PV) LAMP 检测: 脊髓灰质炎病毒是重要的食源性病毒, 它是脊髓灰质炎的病原体, 主要通过粪-口传播, 病毒可侵犯脊髓前角运动神经细胞, 引起暂时性或永久性弛缓性肢体麻痹, 故亦称小儿麻痹症, 多见于儿童。脊髓灰质炎病毒属于人类肠道病毒(Human enterovirus, HEV)的一种, 分类位于 HEV-C 组, 人类肠道病毒还包括了 HEV-A、HEV-B 和 HEV-D 组。Arita 等^[15]根据脊髓灰质炎病毒类病毒基因组的 5'NTRs 序列设计引物, 建立 RT-LAMP 快速检测技术, 90 min 内实现了对粪便样品中脊髓灰质炎病毒的检测, 该方法还可检测其它的肠炎病毒 HEV-A 和 HEV-B, 但所建立的 RT-LAMP 方法更适合于检测包括脊髓灰质炎病毒在内的 HEV-C 组病毒, 对 HEV-A、HEV-B 的敏感性(7400 to 28000 copy)不如 HEV-C (包括 PV) (400 copy)的高。

4.3 真菌毒素的检测

真菌毒素是真菌在食品或饲料里生长所产生的代谢产物, 对人类和动物都有害。常见的真菌毒素为黄曲霉毒素(Aflatoxin, AF), 主要由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生, 它影响机体的免疫系统、致突变、致畸、致癌, 对动物体和人体健康造成严重威胁。罗超^[16]建立了基于 *Ver-1* 基因的 LAMP 法快速检测产黄曲霉毒素真菌, 并应用于饲料的检测。该方法应用于 180 个样品的检测, 并与 ELISA 检测的结果相比较, 两种方法的吻合率达到 91.67%。

4.4 食源性寄生虫的检测

随着人民生活水平的提高, 饮食来源和方式的多样化, 我国由食源性寄生虫病造成的食品安全问题日益突出。“食源性寄生虫病已成为影响我国食品安全的主要因素之一”^[17]。食源性寄生虫病是指进食生鲜的或是未经彻底加热的含有寄生虫卵或幼虫的

食品而感染的一类疾病的总称。隐孢子虫(*Cryptosporidium*)是一种常见食源性寄生虫,广泛存在于多种脊椎动物体内,寄生于人体的种主要是微小隐孢子虫(*C. parvum*),由微小隐孢子虫引起的疾病称隐孢子虫病(*Cryptosporidiosis*),是一种以腹泻为主要临床表现的人畜共患性原虫病。Karanis等^[18]用 LAMP 方法检测粪便及水样中微小隐孢子虫的 60 kD 的糖蛋白基因 *gp60*, LAMP 可检测到微小隐孢子虫卵囊的最低数量为 1 条, DNA 水平的最低检测限为 400 fg/ μ L, 均高于 PCR 的灵敏度。LAMP 方法还应用于十二指肠贾第虫(*Giardia duodenalis*)^[19]的检测,十二指肠贾第虫寄生在人体的小肠、胆囊,可引起腹痛、腹泻和吸收不良等症状,在旅游者中发病率较高,故又称旅游者腹泻,已引起各国的重视。

4.5 食品转基因成分检测

随着农业转基因技术的不断成熟,新的转基因食品及其原料不断进入市场,进出口贸易中转基因食品的监管压力不断增加。转基因食品的有效监管依赖于有效的检测技术。目前, LAMP 已逐步应用于转基因食品分析中。兰青阔等^[20]建立了针对转基因大豆 *cp4-epsps* 基因的 LAMP 检测方法,在 65°C 保温 30 min,通过荧光显色即可完成对转基因的检测工作。结果显示,该 LAMP 方法能够特异性检测 *cp4-epsps* 基因,其检测灵敏度是常规定性 PCR 方法的 10 倍。Lee 等^[21]针对 MS8、RF3 转化体特异性序列及 CaMV 35S 启动子、Nos 终止子等位点建立了转基因油菜的 LAMP 快速检测方法。

5 LAMP 技术的应用展望

我们实验室正在开展食源性致病菌 LAMP 快速检测技术研究,通过文献搜集及实验发现 LAMP 反应模板的预变性步骤存在一定争议,Notomi^[1]发明 LAMP 技术时指出反应过程需要预变性(95°C 5 min),之后 Nagamine^[22]验证了没有预变性的模板也可进行 LAMP 扩增,只是扩增开始的时间比有预变性的模板推迟,但在 60 min 内都可达到一样的扩增效率。目前一些研究者建立的 LAMP 扩增技术大多存在必须的预变性步骤^[18],也有少数的不需要预变性的 LAMP 方法。预变性过程——95°C 5 min,之后再开盖单独加入 Bst DNA 聚合酶,这样操作繁

琐、易污染,影响检测样本通量。那么 LAMP 技术的优化及进一步的摸索,建立不需要预变性步骤的 LAMP 将是我们改进的方向,以期望 LAMP 技术成为可以替代 PCR 的分子诊断新技术,为食品安全快速诊断构建新的技术平台。当然,伴随着新方法的出现,必然会有一些不足,也曾有研究指出,当 DNA 样品存在杂质时,会影响 LAMP 扩增效果,使其低于 PCR 的检测水平^[23]。因此, LAMP 技术的进一步完善,还应考虑建立样品前处理方法,去除杂质,这也是今后进行此项工作的研究方向。

参考文献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(12): E63.
- [2] Moil Y, Nagamine K, Tomita, *et al.* Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **289**(1): 150–154.
- [3] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 2002, **16**(3): 223–229.
- [4] Tomita N, Mori Y, Kanda H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*, 2008, **3**(5): 877–882.
- [5] Prasad D, Vidyarthi AS. DNA based methods used for characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. *Afr J Biotechnol*, 2009, **8**(9): 1768–1775.
- [6] Yamazaki W, Seto K, Taguchi M, *et al.* Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiol*, 2008(8): 94.
- [7] Song T, Toma C, Nakasone N, *et al.* Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **243**(1): 259–263.
- [8] Hara-Kudo Y, Nemoto J, Ohtsuka K, *et al.* Sensitive and rapid detection of Verotoxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *J Med Microbiol*, 2007(56): 398–406.
- [9] Wang DG, Liu F, Huo G CH, *et al.* Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Escherichia coli* O157 in raw milk. *J Rapid Methods Autom Microbiol*, 2009, **17**(1): 55–66.
- [10] 徐芊, 孙晓红, 赵勇, 等. 副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立. 中国生物工程杂志, 2007, **27**(12): 66–72.

- [11] 胡连霞, 张伟, 张先舟, 等. 改良环介导等温扩增技术快速检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌. 微生物学报, 2009, **49**(3): 378–382.
- [12] Li X, Zhang S, Zhang H, *et al.* A loop-mediated isothermal amplification method targets the *phoP* gene for the detection of *Salmonella* in food samples. *Int J Food Microbiol*, 2009, **133**(3): 252–258.
- [13] Goto M, Hayashidani H, Takatori K, *et al.* Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harbouring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. *Lett Appl Microbiol*, 2007, **45**(1): 100–107.
- [14] 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 Clin Microbiol*, 2006, **44**(4): 1376–1381.
- [15] Arita M, Ling H, Yan D, *et al.* Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus. *BMC Infect Dis*, 2009(9): 208.
- [16] 罗超. 基于 *Ver-1* 基因 LAMP 法检测饲料产黄曲霉毒素真菌的研究. 湖南农业大学硕士学位论文, 2008.
- [17] 中华人民共和国卫生部. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告. 2005-5-16.
- [18] Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K, *et al.* Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(17): 5660–5662.
- [19] Plutzer J, Karanis P. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitol Res*, 2009, **104**(6): 1527–1533.
- [20] 兰青阔, 王永, 赵新, 等. LAMP 在检测转基因抗草甘膦大豆 *cp4-epsps* 基因上的应用. 安徽农业科学, 2008, **36**(24): 10377–10378, 10390.
- [21] Lee D, La Mura M, Allnutt TR, *et al.* Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences. *BMC Biotechnol*, 2009(9): 7.
- [22] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem*, 2001, **47**(9): 1742–1743.
- [23] Wang D, Huo G, Wang F, *et al.* Drawback of loop-mediated isothermal amplification. *Afr J Food Sci*, 2008(2): 83–86.

征订启事**欢迎订阅 2010 年《植物保护》杂志**

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫害动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。

联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部 邮编: 100193

电话: 010-62819059, 62815914 传真: 010-62815914

E-mail: zwbh1963@263.net 网址: www.plantprotection.ac.cn

联系人: 王音 高洪荣