

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.2133.037

网络出版时间:2011-10-25 21:33

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.2133.037.html>

鸭源新城疫病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立

鞠小军,刁有祥,唐 熠,程彦丽,陈 琳,李建侠,宋晓娜

(山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018)

【摘 要】 【目的】建立鸭源新城疫病毒逆转录环介导等温核酸扩增(RT-LAMP)快速检测方法,为鸭源新城疫病毒的快速诊断提供支持。【方法】选取鸭源新城疫病毒 NP 基因的相对保守区序列,利用 Primer Explorer V4 在线软件设计了 3 对 RT-LAMP 引物,以鸭源新城疫病毒 SDFCH 株 RNA 为模板进行 RT-LAMP 反应,通过对反应温度、时间及反应体系各组分浓度的筛选,优化反应体系和反应条件,然后对该方法的灵敏性和特异性进行检测(以 RT-PCR 方法为对照),并将其应用于临床病料检测。【结果】优化的 RT-LAMP 反应体系能够在 63 ℃ 下 1 h 内实现目标核酸区段的大量扩增,反应结果可直接用肉眼判断;建立的鸭源新城疫病毒 RT-LAMP 检测方法特异性较强,灵敏度较高,与其他病毒,如 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)、鸭呼肠孤病毒(DRV)、禽偏肺病毒(aMPV)、传染性支气管炎病毒(IBV)等的核酸无交叉反应,可检测到 1×10^{-3} 稀释度的目标 RNA(0.1 pg/ μ L),较普通 RT-PCR 的灵敏性高 10 倍;利用建立的鸭源新城疫病毒 RT-LAMP 检测方法对 24 份疑似鸭源新城疫样品的阳性检出率为 41.7%。【结论】建立的鸭源新城疫病毒的 RT-LAMP 检测方法,具有快速、准确、特异性强、灵敏度高的特点。

【关键词】 鸭;新城疫病毒;逆转录环介导等温核酸扩增;快速检测

【中图分类号】 S858.325.3;S854.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)12-0015-06

Establishment of RT-LAMP system for rapid detection of Newcastle disease virus in duck

JU Xiao-jun, DIAO You-xiang, TANG Yi, CHENG Yan-li,

CHEN Lin, LI Jian-xia, SONG Xiao-na

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, 271018, China)

Abstract: 【Objective】 The study was conducted to establish a rapid diagnostic method of reversetranscription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for Newcastle disease virus(NDV) in ducks, and provide supports for the rapid detection of Newcastle disease. 【Method】 Six special primers were designed for NDV NP gene with Primer Explorer V4. The RT-LAMP reaction was carried out taking the RNA of Newcastle disease virus SDFCH as its template. The reaction system and conditions were optimized by the sifting of temperature, time and the the concentration of all components. Then we assessed its specificity and sensitivity(take RT-PCR for contrast), and applied it to the inspection of clinical material. 【Result】 The Newcastle disease virus(NDV) RNA could be amplified by the optimized RT-LAMP at 63 ℃ within 1h and the amplification products could be observed under naked-eye. The diagnostic method was sensitive and specific, for the amplification results of H9N2 avian influenza virus(AIV), duck reovirns(DRV), Avian metapneumovirus(aMPV) and infectious bronchitis virus(IBV) were negative, and the detection limit of the system was found to be 1×10^{-3} RNA(0.1 pg/ μ L) sample, which was 10-fold higher than

* [收稿日期] 2011-05-31

[基金项目] 现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-43-34);公益性行业(农业)科研专项(201003012)

[作者简介] 鞠小军(1986—),男,山东安丘人,在读硕士,主要从事禽病学研究。E-mail:jhws1986@126.com

[通信作者] 刁有祥(1962—),男,山东胶州人,教授,博士生导师,主要从事禽病学研究。E-mail:yxdiao@163.com

that of the traditional RT-PCR. The positive rate of twenty-four duck samples suspected newcastle disease was 41.7%.【Conclusion】The RT-LAMP diagnostic method for Newcastle disease virus(NDV) in ducks was established and it appeared to be fast,accurate,highly sensitive and specific for the purpose.

Key words: duck; Newcastle disease virus; RT-LAMP; rapid detection

新城疫(ND)是一种急性、高度传染性疾病,主要侵害鸡和火鸡,亦可感染其他禽类及人类,是禽类养殖中的重要疫病之一,世界动物卫生组织(OIE)将其列为应呈报疫病^[1]。该病自 1926 年首次报道以来,至今仍在世界各地流行,时有爆发,给养禽业造成了严重的经济损失^[2]。近年来,我国鸭群感染新城疫病毒的病例在江苏、浙江、河北、山东等地日益增多,不同日龄的鸭均可感染,但以雏鸭最为易感,半月龄内雏鸭的发病率和死亡率最高,均可达 100%,给养鸭业带来了巨大的经济损失^[3]。

环介导等温核酸扩增技术(LAMP)最初是由 Notomi 等^[4]设计并应用于病毒及其他病原体基因的检测,其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase),于恒温条件下几十分钟内即可完成核酸的扩增反应,具有较高的敏感性和特异性。逆转录环介导等温核酸扩增技术(RT-LAMP)是在 LAMP 反应体系中加入一定量的逆转录酶,从而实现 RNA 到 DNA 的一步扩增。RT-LAMP 反应过程中可形成肉眼可见的焦磷酸镁白色沉淀^[5],据此可以判定管中的阳性反应;另外也可以在终产物中加入染料而直接用肉眼观察结果^[6]。近年来,已有一些成功应用该技术对病原体进行检测的文献报道^[7-13],但尚未见将其应用于鸭源新城疫检测的研究。为此,本试验建立了针对鸭源新城疫病毒的快速、灵敏、特异的 RT-LAMP 检测方法,现将结果报

道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 鸭源新城疫病毒 SDFCH 株;24 份鸭源新城疫疑似样品,来自山东部分商品肉鸭场;H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)、鸭呼肠孤病毒(DRV)、禽偏肺病毒(aMPV)、传染性支气管炎病毒(IBV)等,由山东农业大学禽病研究所分离保存。

1.1.2 主要试剂 AMV Rtase,购自 Promega 公司;Bst DNA polymerase、MgSO₄、Betaine,购自 New England Biolabs 公司;EcoR I、Hind III、10× M Buffer、dNTP、5× RT Buffer、MLV Rtase、10× PCR Buffer、Taq 酶等,购自大连宝生物工程有限公司;SYBR Green I 荧光染料,购自北京 Solarbio 公司;TransZol,购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 中登录的鸭源新城疫病毒 NP 基因(GenBank 登录号: HM188399.1),结合实验室测序结果,通过 MegA-line 找出相对保守序列,利用 Primer Explorer V4 在线软件设计了 3 套 LAMP 引物,通过特异性、同源性等方面的比较,挑选出其中 1 套(表 1),并在引物 FIP、BIP 中分别添加 EcoR I、Hind III 酶切位点(表 1 中下划线部分)。RT-PCR 引物利用 DNASTar 软件设计。以上所有序列均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 NP 基因 RT-LAMP 和 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of NP gene for RT-LAMP and RT-PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence	退火温度/℃ T _m
F3	5'-TTGCTGTTAGCGAGGATGC-3'	57.56
B3	5'-CTCGGACACTCCACTCCTA-3'	59.72
FIP	5'-CCTGCAAGGGCAACATGGTTTCGAATTCCAAACCACTCAGGCAAGGT-3'	72.60
BIP	5'-AACAGAATGAGGCCACACTGGCAAGCTTTTGTGAACTGGGGGCACAC-3'	72.60
Floop	5'-GGGAGCATAAGAGGGATATAAGAGC-3'	61.98
Bloop	5'-GTTCTTGAGATCGATGGTTTTGC-3'	58.39
Primer F	5'-GAGAATTCATGTCGTCTGTTTTCGA-3'	55.02
Primer R	5'-GGTCGACTCAGTACCCCCAGTC-3'	57.80

注:表中 F3、B3、FIP、BIP、Floop、Bloop 为 RT-LAMP 引物,其中 F3、B3 为外引物,FIP、BIP 为内引物,Floop、Bloop 为环引物;Primer F、Primer R 分别为 RT-PCR 的上下游引物。

Note:F3,B3,FIP,BIP,Floop,Bloop are primers for RT-LAMP,including outer primers F3,B3,inner primers FIP,BIP and loop primers Floop,Bloop;Primer F and Primer R are forward primer and reverse primer for RT-PCR.

1.2 鸭源新城疫病毒总 RNA 的提取

参照 Tranzol 试剂说明提取鸭源新城疫病毒 SDFCH 株的 RNA,加入经 DEPC 处理的灭菌超纯水 20 μL 溶解 RNA^[3]。

1.3 鸭源新城疫病毒 NP 基因 RT-LAMP 反应体系的建立及反应条件的优化

根据引物的退火温度,将反应温度按 61,62,63,64,65 $^{\circ}\text{C}$ 依次递增,多次重复试验以确定最佳扩增温度;反应时间按 20,40,60,80,100 min 递增,多次重复试验以确定最佳反应时间;对反应体系中各组分的浓度在以下范围内进行优化:MgSO₄ (0.2, 0.3,0.4, ..., 1.0 mmol/L)、Betaine (0.5,0.6,0.7, ..., 1.4 mol/L)、Bst DNA polymerase (5,6,7, ..., 10 U)、dNTP (1.0,1.1,1.2, ..., 2.0 mmol/L)、AMV Rtase(5,6,7, ..., 10 U),以确定各组分的最适浓度。

1.4 鸭源新城疫病毒 NP 基因的 RT-LAMP 扩增

以提取的病毒 RNA 为模板,并以等量经 DEPC 处理的灭菌超纯水代替 RNA 设立阴性对照,在上述确定的最佳反应体系和反应条件下进行 RT-LAMP 扩增,对扩增产物进行如下检测:

1.4.1 RT-LMP 扩增产物的可视化观察 观察扩增反应过程中有无焦磷酸镁白色沉淀产生;待扩增反应结束后,加入 1 μL SYBR Green I 染料,观察反应体系的颜色变化,置于紫外灯下观察是否有荧光产生。

1.4.2 RT-LMP 产物的琼脂糖凝胶电泳检测 RT-LAMP 扩增结束后,取 10 μL 样品于 15 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳,观察结果。

1.4.3 RT-LMP 产物的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定 按 20 μL 体系进行酶切反应,取 10 μL RT-LAMP 扩增产物,2 μL 10 $\times$ M Buffer,0.5 μL *EcoR* I,0.5 μL *Hind* III,补水至 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 12 h,20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,观察结果。回收酶切目的条带,将目的片段与 PMD18-T 载体连接,并将重组载体导入 DH5 α 感受态细胞中,挑取具有 Amp⁺ 抗性的细菌扩大培养。经阳性鉴定后,将菌液送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序,并将测序结果与 GenBank 中登录的鸭源新城疫病毒 NP 基因(GenBank 号:HM188399.1)进行比对。

1.5 RT-LAMP 的特异性试验

利用本试验建立的 RT-LAMP 方法,对鸭源新城疫病毒 SDFCH 株 RNA 模板进行扩增,并以 H9N2 亚型 AIV、DRV、aMPV、IBV 作为对照样品,

检验建立的 RT-LAMP 方法的特异性。

1.6 RT-LAMP 的敏感性试验

以按 10⁻¹,10⁻², ..., 10⁻⁶ 稀释的鸭源新城疫病毒 RNA 为模板,分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测,分析 RT-LAMP 的灵敏性。

RT-PCR 采用两步法。

RT 反应体系为:5 $\times$ RT Buffer 2 μL ,dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 1 μL ,RNase Inhibitor(40 U/ μL) 0.25 μL ,MLV Rtase(200 U/ μL) 0.5 μL ,Primer F (25 $\mu\text{mol/L}$)1 μL ,病毒 RNA 5.25 μL ,总体积 10 μL 。混匀后,置 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,然后 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 终止反应。

PCR 扩增体系为:10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μL ,dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2 μL ,Primer F(25 $\mu\text{mol/L}$)1 μL ,Primer R(25 $\mu\text{mol/L}$)1 μL ,cDNA 2 μL ,Taq 酶(5 U/ μL)0.3 μL ,ddH₂O 16.2 μL ,总体积 25 μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.7 RT-LAMP 对临床样品的检测

应用建立的 RT-LAMP 方法,对实验室送检的 24 份疑似鸭源新城疫样品进行检测,同时使用常规 RT-PCR 进行检测并比较。

2 结果与分析

2.1 RT-LAMP 反应体系和反应条件的优化

通过对反应体系和反应条件的调整,优化的反应体系见表 2。反应条件为 63 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,然后经 80 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 终止反应。

2.2 RT-LAMP 试验结果的判定

通过比浊法观察,反应过程中阳性反应管离心后管底有白色沉淀;经 SYBR Green I 染色,发现阳性管中的溶液变绿(图 1-A),在紫外光下发出明亮的绿色荧光。琼脂糖凝胶电泳可见阳性呈弥散性条带(图 2-B)。

2.3 RT-LAMP 扩增产物的酶切与测序鉴定

由图 3 可见,扩增产物经 *EcoR* I、*Hind* III 酶切后,可见 2 条电泳条带。酶切条带的测序结果表明,其与 GenBank 中登录的鸭源新城疫病毒 NP 基因的序列(HM188399.1)一致。

2.4 RT-LAMP 的特异性试验

图 4 表明,应用本试验建立的 RT-LAMP 方法,对新城疫病毒 SDFCH 株的检测结果为阳性,而对 H9N2 亚型 AIV、DRV、aMPV、IBV 的检测结果均为阴性。

表 2 RT-LAMP 的最佳反应体系

Table 2 Composition of the best RT-LAMP reaction

成分 Ingredient	体积或浓度 Volume or concentration	成分 Ingredient	体积或浓度 Volume or concentration
10×Buffer	2.5 μL	Bst DNA polymerase(8 U/μL)	1.0 μL
Primer mixture	1.0 μL	AMV Rtase(8 U/μL)	1.0 μL
MgSO ₄ (25 mmol/L)	0.6 mmol/L	RNA	5.0 μL
Betaine (5 mol/L)	1.0 mol/L	H ₂ O	5.4 μL
dNTP (10 mmol/L)	1.4 mmol/L	总体积 Total volume	25 μL

注:Primer mixture 为外引物、内引物及环引物的混合物。其组成成分及浓度为: F3 和 R3 均 20 μmol/L;FIP 和 BIP 均 40 μmol/L;Floop 和 Bloop 均 20 μmol/L。

Note:Primer mixture is the mixture of outer primers,inner primers and loop primers. The composition and concentration are as follows:F3 and R3,20 μmol/L,FIP and BIP,40 μmol/L,Floop and Bloop,20 μmol/L.

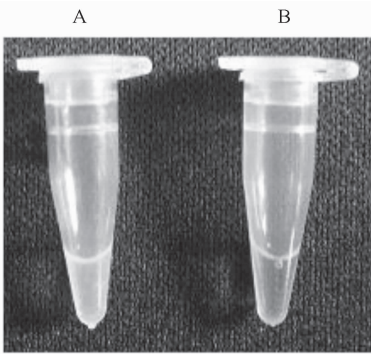


图 1 鸭源新城疫病毒 NP 基因 RT-LAMP 的可视化检测

A. 阳性对照;B. 阴性对照

Fig.1 Visualized assay of the RT-LAMP for Newcastle disease virus in duck

A. Positive control;B. Negative control

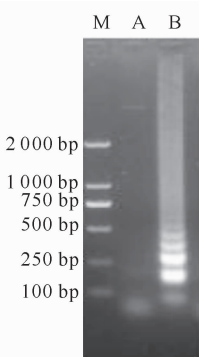


图 2 鸭源新城疫病毒 NP 基因 RT-LAMP 产物的电泳检测

M. Marker;A. 阴性对照;B. RT-LAMP 产物

Fig.2 Agarose gel analysis of RT-LAMP amplification for Newcastle disease virus in duck

M. Marker;A. Negative control;B. Product of RT- LAMP

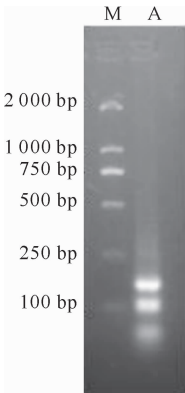


图 3 鸭源新城疫病毒 NP 基因 RT-LAMP 扩增产物的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定

M. Marker DL2000;A. RT-LAMP 产物的双酶切产物

Fig.3 Enzyme digestion analysis of the NP gene RT-LAMP product for Newcastle disease virus in duck

using *EcoR* I and *Hind* III

M. Marker DL2000;A. Enzyme digestion analysis of RT-LAMP product

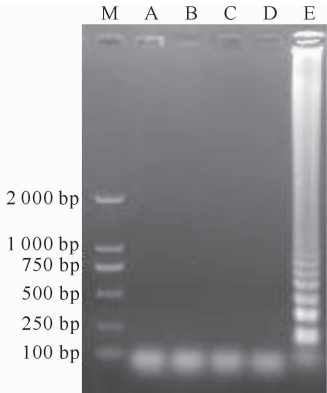


图 4 鸭源新城疫病毒 RT-LAMP 检测方法的特异性试验结果

M. Marker DL2000;A. H9N2 亚型禽流感病毒; B. 鸭呼肠孤病毒;C. 禽偏肺病毒;D. 传染性支气管炎病毒;E. 鸭源新城疫病毒

Fig.4 Speciality of the RT-LAMP experiment for Newcastle disease virus in duck

M. Marker DL2000;A. AIV(H9N2);B. DRV; C. aMPV;D. IBV;E. NDV(duck)

2.5 RT-LAMP 的敏感性试验

提取鸭源新城疫病毒 RNA,分别进行 10 倍系列稀释,并以稀释后的 RNA 样品作为模板,按 1.6 所述方法进行 RT-LAMP 的敏感性测试,同时采用 RT-PCR 方法对上述样品进行检测,并对二者结果

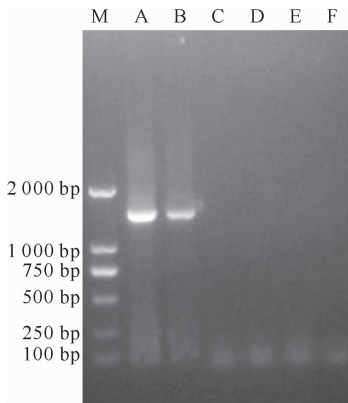


图 5 鸭源新城疫病毒的 RT-PCR 检测
M. Marker DL2000;A~F. $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释的 RNA
Fig. 5 Results of the RT-PCR experimen for
Newcastle disease virus in duck
M. MarkerDL2000;A~F. $10^{-1} \sim 10^{-6}$ RNA

2.6 RT-LAMP 的临床应用

利用 RT-PCR 和 RT-LAMP 分别对送检的 24 份疑似鸭源新城疫样品进行检测,结果显示,RT-PCR 方法检出 6 份阳性,RT-LAMP 方法检出 10 份阳性,阳性检出率分别为 25% 和 41.7%,说明本试验建立的 RT-LAMP 方法较 RT-PCR 方法更为敏感。

3 讨 论

RT-LAMP 技术是一新型的核酸扩增技术,具有快速、特异性高和成本低等优点,并可在恒温条件下进行扩增反应,加入环引物 Floop 和 Bloop 后还可以提高扩增效率,与传统 RT-PCR 法相比,可节省一半以上的时间。

在新城疫病毒各个结构蛋白中,F 蛋白和 HN 蛋白的变异相对较大,与病毒毒力、病毒嗜性密切相关;NP 蛋白的主要功能是与 P 和 L 蛋白结合来包裹基因组 RNA,形成一个螺旋的核糖核蛋白复合物,在基因组 RNA 转录和复制的过程中起模板作用^[14]。NP 基因全长 1 470 bp,编码 489 个氨基酸,NP 基因保守性较高,不同毒株之间的同源性为 99.3%~100%。因此,本试验将 RT-LAMP 扩增的靶基因选择在 NP 基因的保守区段上,建立了扩增鸭源新城疫病毒的 RT-LAMP 检测方法。该方

进行比较。图 5、6 结果显示,RT-PCR 产物大小为 1 470 bp;RT-PCR 和 RT-LAMP 2 种检测方法能检测到的模板 RNA 稀释度分别为 10^{-2} (1 pg/ μ L) 和 10^{-3} (0.1 pg/ μ L),可见相比于普通 RT-PCR,RT-LAMP 检测方法的灵敏性较高,达 10 倍左右。

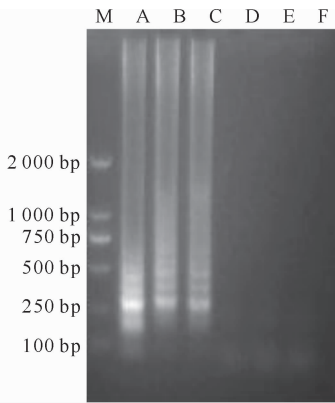


图 6 鸭源新城疫病毒的 RT- LAMP 检测
M. MarkerDL2000;A~F. $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释的 RNA
Fig. 6 Results of the RT-LAMP experiment for
Newcastle disease virus in duck
M. MarkerDL2000;A~F. $10^{-1} \sim 10^{-6}$ RNA

法具有较高的敏感性和特异性,反应结果可通过电泳法、比浊法和荧光染料法进行判定^[15]。

本试验发现,RT-LAMP 反应过程中形成的焦磷酸镁沉淀较难通过肉眼观察,加入荧光染料后不容易区分阳性和阴性,因此为了避免误判,建议采用电泳法对反应结果进行判断。同时,加样过程中应注意防止污染,也可将荧光染料事先加入到反应体系中。另外,本试验建立的方法能同时对鸡新城疫病毒进行检测,这可能是由于新城疫病毒 NP 基因的同源性较高所致。

综上所述,本试验建立的鸭源新城疫病毒的 RT-LAMP 检测方法,具有成本低、灵敏度高、特异性强、反应迅速和快速简便的优点,基本符合临床检验的要求,有望在鸭新城疫病毒的快速检测和防治方面发挥一定的作用。

[参考文献]

[1] Salf Y M. Disease of poultry [M]. 11thed. Ames:Iowa State University Press,2003;64-87.
[2] 刘 梅,韦玉勇,戴亚斌,等.一株鸭源新城疫病毒强毒株的分离与初步鉴定 [J]. 中国动物传染病学报,2010,18(2):67-71.
Liu M,Wei Y Y,Dai Y B,et al. Isolation and preliminary identification of a virulent Newcastle disease virus isolate of duck origin [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2010,18(2):67-71. (in Chinese)

- [3] 李建侠,刁有祥,刘霞,等. 鸭副粘病毒病 RT-PCR 诊断方法的建立与应用 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(11): 31-35.
- Li J X, Diao Y X, Liu X, et al. Establishment and application of RT-PCR diagnostic method for duck paramyxovirus disease [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2010, 38(11): 31-35. (in Chinese)
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 63.
- [5] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. J Biochem Bioph Meth, 2004, 59(2): 145-157.
- [6] Toriniwa H, Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification [J]. Microbiol Immunol, 2006, 50(5): 379-387.
- [7] Curtis K A, Rudolph D L, Owen S M. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. J Virol Methods, 2008, 151(2): 264-270.
- [8] 高晓宇, 曹荣峰, 张桂红, 等. 犬流感病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(1): 36-39.
- Gao X Y, Cao R F, Zhang G H, et al. Establishment of rapid reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for detection of canine influenza virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2010, 32(1): 36-39. (in Chinese)
- [9] Kelly A C, Donna L R, Michele O S. Sequence-specific detection method for reverse transcription, Loop-mediated isothermal amplification of HIV-1 [J]. Journal of Medical Virology, 2009, 81: 966-972.
- [10] 何逸民, 邹国秋, 张得玉, 等. 猪圆环病毒 2 型环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法的研究 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(12): 7-10.
- He Y M, Zou G Q, Zang D Y, et al. Research of loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of porcine circovirus type 2 [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 45(12): 7-10. (in Chinese)
- [11] 彭宜, 谢芝勋, 刘加波, 等. H9 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 可视化检测方法的建立 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(1): 19-22.
- Peng Y, Xie Z X, Liu J B, et al. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of H9 subtype avian influenza virus [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(1): 19-22. (in Chinese)
- [12] 杜鹃, 宋永, 刘立科, 等. 流行性乙型脑炎病毒一步法 RT-LAMP 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(10): 773-776.
- Du J, Song Y, Liu L K, et al. Development of one step RT-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Japanese encephalitis virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2010, 32(10): 773-776. (in Chinese)
- [13] 谢青梅, 曹永长, 张祥斌, 等. H5 亚型禽流感病毒的逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP) 检测技术 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30(1): 41-46.
- Xie Q M, Cao Y C, Zhang X B, et al. Rapid diagnosis of H5 subtype avian influenza virus by RT-loop-mediated isothermal amplification [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2010, 30(1): 41-46. (in Chinese)
- [14] 闻晓波, 吴芬芳, 闫丽辉, 等. 新城疫病毒 F₄₈E₉ 株 M 和 NP 基因的原核表达 [J]. 中国兽医科学, 2008, 38(3): 181-185.
- Wen X B, Wu F F, Yan L H, et al. Expression of M and NP genes of Newcastle disease virus F₄₈E₉ strain in Escherichia coli [J]. Chinese Veterinary Science, 2008, 38(3): 181-185. (in Chinese)
- [15] 唐熠, 谢芝勋, 熊文婕, 等. I 群禽腺病毒环介导等温扩增检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2010, 40(7): 713-716.
- Tang Y, Xie Z X, Xiong W J, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of aviadenovirus group I [J]. Chinese Veterinary Science, 2010, 40(7): 713-716. (in Chinese)