

## 鹅细小病毒 LAMP 快速检测方法的建立

尚毅<sup>1,2</sup>, 董嘉文<sup>2</sup>, 孙敏华<sup>2</sup>, 黄秋芳<sup>1,2</sup>, 吴玄光<sup>1</sup>, 胡奇林<sup>2</sup>

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院 兽医研究所, 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640)

**摘要:**根据 GenBank 中登录的鹅细小病毒 (GPV) VP3 基因序列, 利用 PrimerExplorer V3 软件在序列保守区域设计 1 套特异识别 VP3 基因序列中 6 个不同区段的环介导恒温扩增 (LAMP) 引物, 并以此套引物建立一种基于 LAMP 技术的 GPV 检测方法. 结果表明, 该方法灵敏度是普通 PCR 方法的 100 倍, 只能特异性扩增 GPV DNA, 其引物对于其他常见禽 DNA 病毒均无特异性扩增. 在反应体系中加入 SYBR GREEN I 染料后, 可通过肉眼观察有无荧光直接判定结果. 该方法特异性强、灵敏度高, 重复性好, 为快速检测鹅细小病毒提供了新方法和新思路.

**关键词:**鹅细小病毒; 环介导恒温扩增; 条件优化

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)01-0098-06

## Development and Evaluation of A Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of Goose Parvovirus

SHANG Yi<sup>1,2</sup>, DONG Jia-wen<sup>2</sup>, SUN Min-hua<sup>2</sup>, HUANG Qiu-fang<sup>1,2</sup>, WU Xuan-guang<sup>1</sup>, HU Qi-lin<sup>2</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** By using PrimerExplorer V3 software, a series of specific primers were designed based on the nucleotide sequences of goose parvovirus (GPV) VP3 gene available in GenBank. These primers targeted 6 distinct conserved sequences of VP3 gene, and serve primers to perform a loop-mediated isothermal amplification (LAMP). These primers were used to establish rapid LAMP detection of GPV. The results showed the LAMP method specifically amplified GPV but not other common avian disease DNA viruses; The method was 100 times more sensitive than the conventional PCR method. The amplification could be finished within 1.5 h with good specificity and high sensitivity. With the addition of SYBR GREEN dye in the reaction mixture, the results could be differentiated by naked eyes. The results also proved that LAMP method is a reliable and accurate assay for rapid detection of goose parvovirus. This assay offers a new technique and alternative for detecting goose parvovirus.

**Key words:** goose parvovirus; loop-mediated isothermal amplification; condition optimization

小鹅瘟又称德舍氏病<sup>[1]</sup>, 是由鹅细小病毒 (Goose parvovirus, GPV) 引起的雏鹅的一种急性或者亚急性败血性传染病. 本病以消化道, 尤其是小肠部位典型性纤维素性栓塞病变为特征, 致病性强, 死亡率高. 1956 年我国学者首次发现此病<sup>[2]</sup>. 1966 年以来, 欧、亚两洲十多个国家相继报道了雏鹅的类似疾病, 后经研究确定该病毒属于细小病毒科, 同时证明

了十多个国家所分离的病毒具有相似的血清型. 目前已建立的小鹅瘟实验室检测方法可分为血清学和分子生物学诊断方法. 血清学方法包括病毒中和试验、酶联免疫吸附试验、反向间接血凝试验、免疫酶琼脂扩散试验、免疫过氧化物酶染技术、免疫荧光技术、精子凝集抑制试验等<sup>[3-10]</sup>. 但上述方法均存在不同的缺点, 或者试验周期较长、或者操作繁琐、或者

收稿日期: 2010-05-10

作者简介: 尚毅 (1985—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 胡奇林 (1963—), 男, 研究员, E-mail: hq1562713@163.com

基金项目: 广东省科技计划项目 (2007B080401018)

灵敏度不高、或者需要特殊仪器设备等。近年来,斑点杂交法、核酸探针技术、聚合酶链式反应等各种分子生物学检测方法的建立为 GPV 的快速检测提供了极大的便利<sup>[11-14]</sup>。由 Notomit 等<sup>[15]</sup>于 2000 年建立的环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异性引物, 利用链置换 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase), 在恒温条件 (65 °C 左右) 高效扩增核酸, 具有特异性强, 灵敏度高, 扩增高效、快速, 操作简便等优点。且该方法不需要任何贵重的仪器和试剂, 在水浴锅中即可完成反应, 特别适合在野外现场和基层部门应用。迄今已建立了针对多种病原性细菌、真菌、病毒、寄生虫等的 LAMP 检测方法<sup>[16-23]</sup>。本研究依据 LAMP 原理, 针对鹅细小病毒 VP3 基因序列保守区域设计 LAMP 引物, 建立了一种快速、实用、灵敏的 GPV 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株

试验所用鹅细小病毒、番鸭细小病毒 (Muscovy duck parvovirus, MDPV)、鸭肝炎病毒 (Duck hepatitis virus, DHV)、鸡 J 亚群白血病病毒 (Subgroup J avian leukosis virus, ALV-J)、H5 亚型禽流感病毒 (Avian influenza virus subtype H5, AIV H5)、H9 亚型禽流感病毒 (avian influenza virus subtype H9, AIV H9) 均由广东省农业科学院兽医研究所禽病研究室鉴定并保存。

### 1.2 主要试剂与仪器

Bst DNA 聚合酶大片段为北京纽英伦生物技术有限公司产品 (New England Biolabs); 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒为上海生工生物工程技术有限公司产品; Ex Tag 酶、Pst I 限制性内切酶、dNTPs、DNA Marker DL2000 均为大连宝生物工程有限公司产品; TRIzol LS Reagent 为 Invitrogen 公司产品; 甜菜碱 (Betaine) 为天泽基因有限公司产品; 荧光染料 SYBR GREEN I 为杰特伟公司产品。PCR 仪; 水浴锅等。

### 1.3 引物设计与合成

利用 LAMP 引物在线设计软件 PrimerExplorer, 根据 GenBank 中的 GPV VP3 基因保守区域, 设计 1 套内外引物。其中 PCR 扩增片段为 404 bp, LAMP 扩增片段为 201 bp。经 DNA Star 软件分析 LAMP 扩增片段内含有 Pst I 酶切位点。

各引物序列如下: F3: 5'-CAGCACTACAGCAG-GAAT-3'; B3: 5'-TCCCTGCAGATATATATCCCT-3'; FIP: 5'-CGTTACAGTCCTACCATATGGTTTCCGGAAGAACAAGAAG-

TAGCA-3'; BIP: 5'-ATGAACAAAACACTACTACAGCTC-CGTTCTGCCAAACCATTCC-3'。其中, F3 和 B3 为外引物, FIP 和 BIP 为内引物。内引物稀释至 50 pmol/μL, 其余均稀释至 10 pmol/μL 使用。

### 1.4 病毒 RNA 及 DNA 的提取

1.4.1 RNA 的提取 参照 TRIzol LS Reagent 使用说明书进行病毒 RNA 的抽提。

1.4.2 DNA 的提取 参照 UNIQ-10 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒说明书进行病毒 DNA 的抽提。

### 1.5 LAMP 方法反应条件的优化及 LAMP 方法的建立

本试验采用 25 μL 反应体系, 其中包含以下组分: Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、甜菜碱、Bst DNA 聚合酶、ThermoPol 反应缓冲液、内引物、外引物及 GPV-DNA。

1.5.1 反应温度的优化 试验中扩增温度按照 58、61、63、65、67 °C 依次递增, 从 3 次重复试验中选定最佳反应温度。

1.5.2 Mg<sup>2+</sup> 浓度的优化 在选定的温度下, 将 Mg<sup>2+</sup> 的终浓度以 1、2、3、4 mmol/L 依次递增, 从 3 次重复试验中选定最佳 Mg<sup>2+</sup> 浓度。

1.5.3 dNTPs 浓度的优化 在选定的温度下, 其余条件不变, 将 dNTP 的终浓度以 100、200、300、400 μmol/L 依次递增, 从 3 次重复试验中选定最佳 dNTP 用量。

1.5.4 甜菜碱浓度的优化 在选定的温度下, 其余条件不变, 将甜菜碱的终浓度以 0、0.4、0.8、1.2 mol/L 依次递增, 从 3 次重复试验中选定最佳用量。

1.5.5 Bst DNA 聚合酶浓度的优化 在选定的温度下, 其余条件不变, 将 Bst DNA 聚合酶的终浓度以 0.08、0.16、0.24、0.32 U 依次递增, 从 3 次重复试验中确定其最佳用量。

1.5.6 引物比例及浓度的优化 在选定的温度下, 其余条件不变, 将内、外引物比例按 4:1、8:1、12:1、16:1 依次递增, 从 3 次重复试验中确定最佳比例。待确定最佳引物比例后将外引物终浓度按 0.2、0.4、0.6、0.8 μmol/L 依次递增, 内引物按相应的比例加入, 从 3 次重复试验中确定最佳引物浓度。

1.5.7 反应时间的优化 在选定的温度下, 其余条件不变, 扩增时间按照 15、30、45、60、75、90 min 依次递增, 从 3 次重复试验中确定最佳扩增时间。

1.5.8 优化反应条件后 LAMP 检测方法的建立 根据上述反应条件的优化结果, 确定最佳反应条件, 建立 LAMP 检测方法, 通过琼脂糖凝胶电泳观察试验结果。

### 1.6 LAMP 产物酶切鉴定

选择 25  $\mu\text{L}$  体系进行酶切鉴定. 取 5  $\mu\text{L}$  LAMP 反应产物, 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  H 缓冲液, 1  $\mu\text{L}$  *Pst* I 内切酶、16.5  $\mu\text{L}$  去离子水, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 4 h, 取 5  $\mu\text{L}$  产物进行琼脂糖凝胶电泳, 观察结果.

### 1.7 LAMP 的特异性检验

分别以 MDPV、DHV、ALV-J、H5 型、H9 型禽流感病毒核酸作为待检样品, 以 GPV DNA 为阳性对照, 以经 DEPC 处理的水为阴性对照, 经 3 次重复试验, 检验 LAMP 方法的特异性.

### 1.8 LAMP 灵敏度检验

将 GPV DNA 按  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  和  $10^{-9}$  进行稀释, 进行 3 次 LAMP 检测, 以确定 LAMP 方法的灵敏度.

### 1.9 LAMP 的重复性试验

对 8 份不同浓度的 GPV DNA 样品和 1 份 DEPC 水, 用已建立的 LAMP 方法进行 8 次独立试验, 以检验 LAMP 方法的重复性.

### 1.10 LAMP 方法的可视化处理

LAMP 反应结束后, 在反应管中加入 1:10 稀释的 SYBR GREEN I ( $10\ 000 \times$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 若结果为阳性, 则肉眼观察可见绿色荧光; 反之, 则没有荧光.

### 1.11 LAMP 与 PCR 检测临床病料结果的比较

将 30 份临床上疑似鹅细小病毒病病死鹅及番鸭的心、肝、脾等器官(待检病料由广东省农科院兽医研究所禽病研究室提供)剪碎, 用生理盐水制成 1:10 的匀浆, 反复冻融 3 次后将匀浆于 5 000 r/min 离心 10 min, 吸出上清液按 1.4.2 提取病毒 DNA, 分别用 PCR(参照胡奇林等<sup>[14]</sup>的方法)和本试验所建立的 LAMP 方法进行检测, 对 2 种方法检测结果不一致的样品用病毒分离和鉴定方法确定, 比较 2 种方法的敏感性.

## 2 结果

### 2.1 LAMP 检测方法的建立

根据反应条件的优化结果, 确定了最佳反应条件(表 1). 将反应体系中各组分配制好后, 放入水浴锅或 PCR 仪, 63  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h, 80  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 min 即可.

### 2.2 LAMP 产物的酶切鉴定

*Pst* I 特异性酶切结果证明扩增片段正确, 得到约 200 bp 大小的目的片段, 结果见图 1.

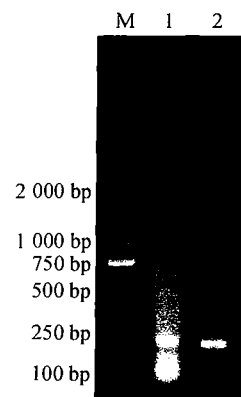
### 2.3 特异性检验结果

如图 2 所示, 只有 GPV 样品能扩增出阳性条带, 其他样品均为阴性, 表明引物对 GPV 具有专一性.

表 1 LAMP 反应体系中各成分及体积

Tab. 1 The compositions concentration and volume of LAMP reaction

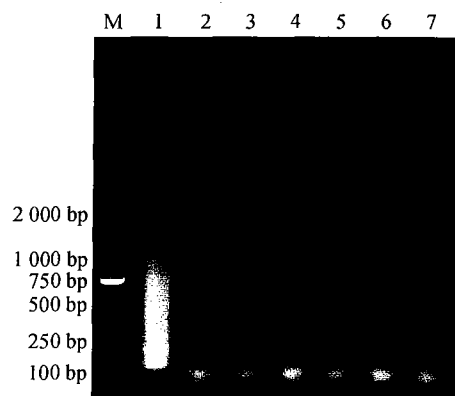
成分	V/ $\mu\text{L}$
F3、B3 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	各 1.5
FIP、BIP (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )	各 2.4
dNTP (2.5 mmol/L)	3.0
MgSO <sub>4</sub> (25 mmol/L)	2.0
10 $\times$ ThermoPol 反应缓冲液	2.5
<i>Bst</i> DNA 聚合酶 (8 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0
模板 DNA	2.5
甜菜碱 (5 mol/L)	2.0
DEPC 水	4.2
总计	25.0



M: DNA Marker DL 2000; 1: LAMP 扩增产物; 2: LAMP 扩增产物的 *Pst* I 酶切.

图 1 LAMP 产物的 *Pst* I 酶切鉴定

Fig. 1 Digest product with *Pst* I



M: DNA Marker DL 2000; 1~6: 分别为 GPV、MDPV、DHV、ALV-J、H5 型 AIV、H9 型 AIV; 7: 阴性对照.

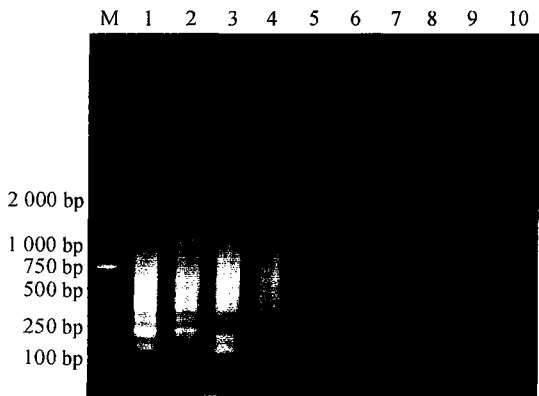
图 2 LAMP 产物的特异性检测结果

Fig. 2 The result of specificity of GPV-LAMP method

### 2.4 灵敏度检测结果

从图 3 可看出, 随着 GPV DNA 稀释度的增加, LAMP 扩增产物电泳亮度逐渐减弱; 此法对 GPV DNA 最低检测限为  $10^{-7}$ . 同一样品采用常规 PCR, 其最低检测限为  $10^{-5}$  (图 4), 表明 LAMP 方法比

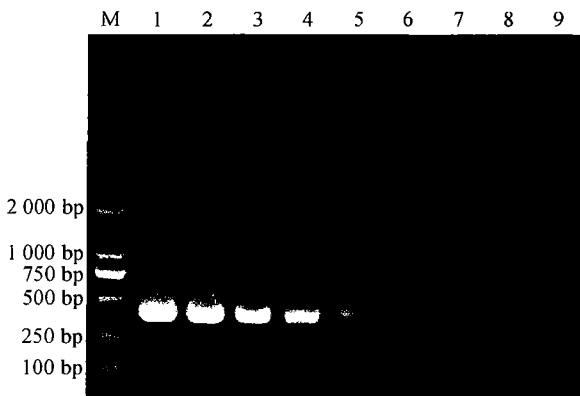
PCR 方法灵敏度高 100 倍.



M; DNA Marker DL 2000; 1 ~ 9: 分别为质粒 DNA  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$  稀释倍数; 10: 阴性对照.

图 3 LAMP 对 GPV 的灵敏性检测结果

Fig. 3 The result of sensitivity of GPV-LAMP method



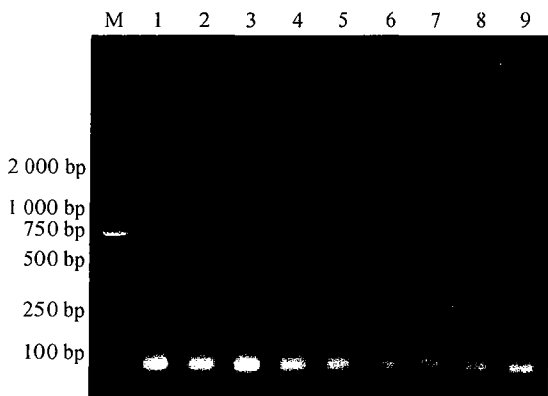
M; DNA Marker DL 2000; 1 ~ 8: 分别为质粒 DNA  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  稀释倍数; 9: 阴性对照.

图 4 PCR 对 GPV 的灵敏性检测结果

Fig. 4 The result of sensitivity of GPV-PCR method

### 2.5 LAMP 的重复性试验结果

以 GPV DNA 为模板的 8 次重复试验结果均相同,表明本研究建立的 LAMP 检测方法具有较高的稳定性. GPV DNA 重复性检测试验结果见图 5.



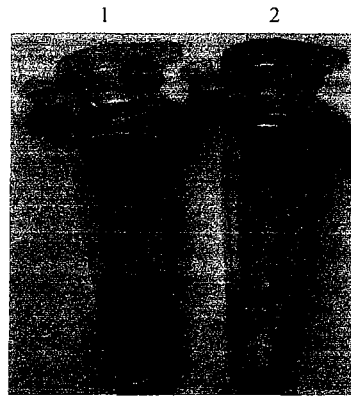
M; DNA Marker DL2000; 1 ~ 8: GPV DNA LAMP 检测结果; 9: 阴性对照.

图 5 GPV DNA 重复性检测结果

Fig. 5 The result of GPV DNA duplicate detection by PCR

### 2.6 LAMP 方法的可视化处理结果

LAMP 反应结束后,在 RT-LAMP 反应管中添加 SYBR GREEN I 荧光染料,通过肉眼观察,阳性样品管能够发出特异绿色荧光,而对照管及阴性管则没有荧光(图 6),表明添加 SYBR GREEN I 后所呈现的颜色反应具有特异性.



1: LAMP 阴性扩增产物; 2: LAMP 阳性扩增产物.

图 6 LAMP 产物的可视化处理结果

Fig. 6 Amplified products visualized by adding SYBR GREEN I at the end of the reaction

### 2.7 LAMP 与 PCR 对临床样品检测结果的比较

用 LAMP 与 PCR 两种方法对 30 份临床疑似病例心、肝、脾组织混合样品进行了检测(表 2),由表 2 可见 LAMP 检测方法阳性率为 23.3% (7/30), PCR 检测方法阳性率为 20% (6/30). 经 PCR 检测为阳性的待检病料经 LAMP 方法检测结果均为阳性. 经 PCR 检测为阴性而 LAMP 方法检测为阳性的 2 份病料,取其上清液各接种 4 枚 12 日龄无 GPV 和 MDPV 母源抗体番鸭胚尿囊腔,结果番鸭胚分别于接种后 72、96 h 死亡,观察可见死胚出现绒毛尿囊膜水肿,胚体呈鲜红色,心肌和肝脏变性. 收集胚体尿囊液进行病毒鉴定,结果 1 份为阳性、1 份为阴性,表明 LAMP 检测方法存在 1 个假阳性结果.

表 2 LAMP 与 PCR 对 GPV 临床检测结果比较

Tab. 2 The comparison of the detection results of GPV clinical samples by LAMP and PCR

LAMP	PCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	6	1	7
阴性	0	23	23
合计	6	24	30

## 3 讨论与结论

LAMP 是近年来新出现的一种检测方法,具有操作简单、快速高效、高特异性及高灵敏度等优点. 建立 LAMP 检测方法必须从其反应条件,如引物设计、

目的基因序列长度、环状结构大小、反应体系等方面进行摸索和优化<sup>[24]</sup>。

LAMP 反应成分较为复杂,在对 LAMP 反应条件进行优化时,应重点考虑对影响整个反应的主要成分如  $Mg^{2+}$  浓度、甜菜碱浓度及内、外引物浓度比例的优化。其中  $Mg^{2+}$  含量是影响 LAMP 扩增的主要因素, $Mg^{2+}$  浓度越低,反应特异性越强,但扩增效率明显下降; $Mg^{2+}$  浓度升高,虽扩增效率有所提高,但特异性却受到影响。本试验从 3 次重复试验中选定最佳  $Mg^{2+}$  浓度,在特异性与扩增效率之间确定最佳平衡点。甜菜碱的作用是保持酶的活性与稳定性,试验结果表明在不加入甜菜碱的情况下也有 LAMP 扩增,加入甜菜碱后可以明显增加扩增效率。一般来说,外引物与内引物的浓度比为 1:4 ~ 1:10,本试验结果表明在外引物与内引物浓度比达到 1:16 时,扩增效率较 1:4 ~ 1:12 时有所下降。总之,LAMP 体系中成分较多,各成分浓度、比例的改变会对反应的重复性、稳定性造成较大影响。

对各养殖场送检的病料分别进行 LAMP 和 PCR 检测,其中 LAMP 方法检出率为 23.3%,PCR 方法检出率为 20.0%,且经 PCR 检测为阳性的待检病料经 LAMP 方法检测结果均为阳性,表明 LAMP 方法较 PCR 方法敏感性高。但值得注意的是,对 PCR 检测为阴性而 LAMP 方法检测为阳性的 2 份病料,经病毒分离和鉴定后,结果 1 份为阳性、1 份为阴性,表明 LAMP 方法存在假阳性。

由于 LAMP 检测方法灵敏度高,本研究所建立 LAMP 方法的灵敏度是 PCR 方法的 100 倍,即对微量核酸就有很好的扩增效果,若反应体系中受到待检 DNA 的污染,则很容易出现假阳性结果。其次,在实际操作中各种实验器具及试剂易受到待检样品污染也是容易出现假阳性结果的原因之一。因此在试验过程中要特别注意严谨操作,应采取各种措施保持试验器具及试剂不受污染,如分开使用不同的超净工作台加待检样品与反应体系中其他成分等。

本研究成功建立了 GPV-LAMP 快速检测方法。结果表明该方法具有较高的特异性和敏感性,其敏感性是普通 PCR 的 100 倍,且整个扩增反应可在 1.5 h 内完成。在反应体系中添加 SYBR GREEN I 荧光染料后,可通过肉眼观察有无荧光直接判定结果,避免了电泳过程中其他杂质 DNA 的污染,并使得整个检测过程更加快速、高效。在对临床样品的检测试验中,通过 LAMP 检测方法 with PCR 检测方法的对比,

结果表明本研究所建立的 LAMP 检测方法具有较高的临床使用价值,适用于实验室条件较差的基层和野外现场对 GPV 进行快速检测。

#### 参考文献:

- [1] KISRY J. Derzsy's disease of geese [M] // McFEWAN J B, Mc-NULTY M C. Virus Infectious of Birds. Netherlands: Elsevier Publishers BV, 1993: 153-165.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 165-168.
- [3] 赵坤, 张慧辉. 鹅细小病毒感染的诊断与治疗 [J]. 动物科学与动物医学, 2000, 17(2): 44.
- [4] 张耀成, 李东政, 梁盛冒. 60 日龄肉鹅发生小鹅瘟的诊治 [J]. 中国动物检疫, 2001, 18(2): 33.
- [5] 李新华. 应用斑点酶免疫吸附试验快速诊断小鹅瘟 [J]. 中国兽医科技, 1998, 28(1): 13-18.
- [6] 徐为燕, 周阳生. 小鹅瘟病毒反向间接血球凝集实验的初步报告 [J]. 畜牧兽医学报, 1981, 12(1): 23.
- [7] 秦爱建. 免疫鹅琼脂扩散实验在小鹅瘟诊断中的应用 [J]. 中国预防兽医学报, 1993, 15(1): 30-31.
- [8] ROSZKOWSKI J. Application of the immunoperoxidase technique for the detection of Derzsy's disease virus antigen in cell culture and goslings [J]. Avian Pathology, 1982, 11(4): 571-578.
- [9] 潘玉民, 董玉平, 石全瑞, 等. 小鹅瘟免疫荧光诊断方法的研究 [J]. 中国兽医科技, 1990, 21(10): 6-8.
- [10] 盛佩良. 雏鹅小鹅瘟的诊断 [J]. 畜牧与兽医, 1990, 23(1): 46.
- [11] 余兵, 王永坤, 朱国强. 应用核酸斑点杂交法检测鹅细小病毒 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(5): 453-454.
- [12] 布日额, 王君伟, 吴金花, 等. 鹅细小病毒 VP1-VP3 非重叠序列地高辛探针的制备和应用 [J]. 中国兽医杂志, 2005, 41(1): 7-10.
- [13] SIRIVAN P, OBAYASHI M. Detection of goose and muscovy duck parvovirus using polymerase chain reaction-restriction enzyme fragment length polymorphism analysis [J]. Avian Disease, 1998, 42(1): 133-139.
- [14] 胡奇林, 陈少莺. 应用 PCR 快速鉴别番鸭和鹅细小病毒 [J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(6): 447-450.
- [15] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 63.
- [16] FANG Xue-en, XIONG Wei, LI Jian, et al. Loop-mediated isothermal amplification establishment for detection of pseudorabies virus [J]. J Virological Methods, 2008, 151(1): 35-39.

- [5] VAUGHAN T J, JAMES P S, PASCALL J C, et al. Expression of the genes for TGF alpha, EGF and the EGF receptor during early pig development [J]. *Development*, 1992, 116 (3): 663-669.
- [6] ZIJLSTRA R T, ODLE J, HALL W F, et al. Effect of orally administered epidermal growth factor on intestinal recovery of neonatal pigs infected with rotavirus [J]. *Pediatric Gastroenterol Nutr*, 1994, 19(4): 382-390.
- [7] 范志勇, 王康宁, 周定刚. 不同水平表皮生长因子对早期断奶仔猪生产性能、血清理化指标及免疫功能的影响 [J]. *动物营养学报*, 2005, 17(3): 39-43.
- [8] HOLLIS D E, CHAPMAN R E, PANARETTO B A. Morphological changes in the skin and wool fibres of Merino sheep infused with mouse epidermal growth factor [J]. *Aust J Biol Sci*, 1983, 36(4): 419-434.
- [9] MOORE G P M, PANARETTO B A, ROBERTSON M. Effects of epidermal growth factor on hair growth in the mouse [J]. *J Endocrinol*, 1981, 88(2): 293-299.
- [10] MOORE G P M, PANARETTO B A, ROBERTSON D M. Inhibition of wool growth in Merino sheep following administration of mouse epidermal growth factor and a derivative [J]. *Aust J Biol Sci*, 1982, 35(2): 163-172.
- [11] 杨桂香, 黄伟华, 彭险峰. 猪表皮生长因子在大肠杆菌中的表达 [J]. *华南农业大学学报*, 2006, 4(27): 90-93.
- [12] CREGG J M. Recent advances in the expression of foreign genes *Pichia pastoris* [J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 905-910.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 102 页)

- [17] HAN Fei-fei, GE Bei-lei. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting vibrio vulnificus in raw oysters [J]. *Foodborne Pat Hogens and Disease*, 2008, 5(3): 311-320.
- [18] WEI Xiao-na, ZHENG Ze-jun, ZHANG Li-huan, et al. Sensitive and rapid detection of aeromonas caviae in stool samples by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(1): 113-116.
- [19] ZHAO Xi-hong, WANG Li, LI Yan-mei, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 5(37): 2183-2188.
- [20] KAWAI Y, MIYASHITA N, KISHI F, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of chlamydomphila pneumonia [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28: 801-805.
- [21] 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 [J]. *Parasitol Res*, 2009, 104: 1527-1533.
- [22] LI Qiang, XUE Chun-yi, QIN Jian-ping, et al. An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of Newcastle disease virus [J]. *Arch Virol*, 2009, 154: 1433-1440.
- [23] CHEN Chang-mu, CUI Shang-jin, ZHANG Chao-fan, et al. Development and validation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of PRRSV [J]. *Virus Genes*, 2010, 40: 76-83.
- [24] BLOMSTROM A, HAKHVERDYAN M, REID M, et al. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus [J]. *J Virol Methods*, 2008, 147 (1): 188-193.

【责任编辑 柴 焰】