

A 组轮状病毒可视化 RT-LAMP 方法的建立

朱青 覃玥 王业富*

(武汉大学生命科学学院 病毒学国家重点实验室 湖北 武汉 430072)

摘要: 【目的】建立一种利用颜色判定的快速、简单、灵敏度高的检测方法,即可视化的逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)方法,并应用于人 A 组轮状病毒的基因检测。【方法】针对 A 组轮状病毒 VP6 基因的 6 个保守区域设计 4 条特异性引物,在 64 °C 恒温条件下进行核酸扩增反应 1 h,在扩增前加入染料钙黄绿素(Calcein)作为反应指示剂,以钙黄绿素的颜色变化作为结果判定标准。评价该方法的特异性和灵敏度,并同时利用 RT-LAMP 和 RT-PCR 两种方法对 90 份临床腹泻样本中的病毒核酸进行检测。【结果】RT-LAMP 方法特异性较高,灵敏度可以达到 10^3 copies/ μ L RNA 分子水平,比 RT-PCR 高出 100 倍。对临床标本的检出率与 RT-PCR 方法相当。【结论】建立的 RT-LAMP 法灵敏度较高,特异性强,节省时间,结果可视化,具有野外检测和现场快速检测的潜力。

关键词: 可视化, 逆转录环介导等温扩增, A 组轮状病毒, 检测

Development of RT-LAMP for rapid visual detection of group A rotavirus

ZHU Qing QIN Yue WANG Ye-Fu*

(State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: [Objective] A rapid, simple and sensitive visual reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method was established to detect group A rotavirus. [Methods] The method employed a set of four specially designed primers that recognize six distinct sequences of the VP6 gene for amplification of nucleic acid under isothermal conditions at 64 °C for one hour. The amplification process of RT-LAMP was monitored by the addition of Calcein dye prior to amplification. The specificity and sensitivity of the RT-LAMP assay was assessed and the assay was further evaluated with 90 clinical specimens of diarrhea patients with RT-LAMP and RT-PCR detection. [Results] The results showed that the RT-LAMP was able to achieve a sensitivity of 10^3 copies/ μ L with a high specificity. The detection limit of RT-LAMP was 100-fold higher than that of RT-PCR. Positive rate of RT-LAMP in analysis of clinical specimens was approximately the same as that of RT-PCR as well. [Conclusion] The RT-LAMP assay has been proven to be a rapid, sensitive, specific and visual method for detection of the group A rotavirus, and that the RT-LAMP assay is potentially useful for the field detection and rapid detection on spot.

*通讯作者: Tel: 86-27-68754627; 信箱: wangyefu@whu.edu.cn

收稿日期: 2015-01-30; 接受日期: 2015-03-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-08

Keywords: Visual, Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, Group A rotavirus, Detection

轮状病毒(Rotavirus)是引起人类、哺乳动物和鸟类腹泻的重要病原体,属于呼肠孤病毒科轮状病毒属。其基因组是由 11 个不连续的双链 RNA 片段组成的,分别编码病毒蛋白 VP1-VP4、VP6、VP7 和病毒非结构蛋白 NSP1-NSP6^[1]。轮状病毒根据 VP6 抗原性的不同可以分为 A-G 7 个血清组,其中 A、B、C 组能够感染人类,A 组轮状病毒主要引起儿童腹泻,是世界范围内婴幼儿腹泻最重要的病原体^[2-4]。据统计每年几乎有 60 万的婴幼儿是因轮状病毒感染引起的腹泻而死亡的,大约占全世界每年婴幼儿死亡总数的 5%^[5],而在我国轮状病毒感染的发病率竟然高达 30%-40%,这种现状不仅对我国婴幼儿的生活质量构成了严重的威胁,而且也对我们的国家的医疗资源造成了巨大的损失^[6]。因此,对轮状病毒进行及时、准确的检测,对其预防控制和临床诊治至关重要。目前,常规的轮状病毒检测方法为 RT-PCR,但由于此技术需要昂贵的仪器设备和检测费用,并且耗时长,需要电泳判定结果,因此不利于轮状病毒的现场快速检测。

环介导的核酸等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification)是由 Notomi 等在 2000 年发明出来的一种新型的核酸扩增方法^[7]。该方法针对靶基因的 6 个保守区域设计 4 条特异性引物,利用 *Bst* DNA 聚合酶的链置换活性,64 °C 恒温条件下在水浴锅或恒温箱保温约 60 min 即可完成整个核酸扩增反应^[8]。加入逆转录酶后的逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)能针对 RNA 完成扩增。该反应能产生肉眼可见的反应副产物(白色焦磷酸镁沉淀),可以根据沉淀判断阳性反应;也可在反应体系中加入荧光指示剂钙黄绿素和氯化锰,在反应初期并不发出绿色荧光,反应后期由于焦磷酸根离子更易与锰离子结合而释放出钙黄绿素进而发出绿色的荧光,反应结束后直接用肉眼观察颜色变化,显示绿色为阳性反应,而橙色为阴性反应^[9-10]。近年

来已有较多文献报道该技术成功应用于多种病原体的检测^[11-16]。

本研究建立了基于钙黄绿素颜色变化的逆转录环介导等温扩增技术检测人 A 组轮状病毒基因,并对该方法的特异性和灵敏度进行了分析,整个检测反应只需 1 h,并且可以直接用肉眼判定阳性结果。

1 材料与方法

1.1 材料

AMV 反转录酶,购自美国 Invitrogen 公司; *Bst* DNA 聚合酶、dNTPs, 购自美国 NEB 公司; 甜菜碱、钙黄绿素, 购自美国 Sigma 公司; One-Step RT-PCR Kit、RNeasy Mini Kit, 购自 Qiagen 公司; 质粒载体 pUC57, 购自宝生物工程(中国)有限公司。

1.2 样本来源

用于 A 组轮状病毒特异性研究的 5 份对照病毒样本(A 组轮状病毒、GI 型诺如病毒、星状病毒、GII 型诺如病毒、甲肝病毒)及 90 份腹泻病人粪便样本由武汉市儿童医院提供。

1.3 病毒 RNA 的提取

取粪便标本加入适量无菌 PBS 缓冲液,在试管中充分振荡摇匀后离心,收集上清液,用 RNeasy Mini Kit 提取 RNA,操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.4 RT-LAMP 引物设计

在 NCBI 网站上下载所有 A 组轮状病毒株 VP6 基因的序列,利用 MEGA 3.1 进行同源性比对,选择 VP6 基因中高度保守的区域,采用 Primer Explorer 4.0 设计出 2 对针对靶基因的引物,包括 2 条外引物 F3 和 B3 及 2 条内引物 FIP 和 BIP。引物的合成和 PAGE 纯化由北京擎科新业生物技术有限公司完成,引物序列如表 1 所示。

1.5 标准品的制备

人工合成 A 组轮状病毒 VP6 基因,并反向互补插入 pUC57 载体的 *Sma*I 酶切位点得到重组质粒(由北京擎科新业生物技术有限公司合成),成功构

表 1 RT-LAMP 引物序列
Table 1 Sequences of RT-LAMP primers

Primer name	Sequence (5'→3')
F3	CCAGTTGGACCAGTATTTCC
B3	AGCGAATGTGAAATCATGTC
FIP	GCTACTGTAAAGACACGTTGCAAAT-CCAGGCATGAATTGGACT
BIP	AGAAGCATGTTGATTAAGTGAGGA-CTGAATGACTTGATATAGCTACA

建后的质粒进行体外转录,经纯化后利用 Quawell™ 核酸微量分析仪进行定量,并根据每微升的拷贝数(copies/μL)=6.02×10²³×浓度(mg/L)×10⁻⁹/(目的片段碱基数×340)公式计算。

1.6 RT-LAMP 检测方法的建立

初步设定 RT-LAMP 反应 25 μL 体系组成如下: 1×ThermoPol buffer, 1.0 mmol/L dNTPs, 8 mmol/L Mg²⁺, 1.0 mol/L 甜菜碱, 25 μmol/L 钙黄绿素, 0.5 mol/L MnCl₂, 0.8 μmol/L 内引物(FIP 和 BIP), 0.2 μmol/L 外引物(F3 和 B3), 10 U AMV 逆转录酶, 8 U *Bst* DNA 聚合酶, 5 μL RNA 模板, 补充 DEPC 水至 25 μL。反应条件为: 65 °C 1 h, 80 °C 5 min 灭活酶, 终止 RT-LAMP 反应。本实验中分别设置不同的 dNTPs 浓度(0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L)、Mg²⁺浓度(2、4、6、8、10、12、14 mmol/L)、内外引物浓度比(1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1), 不同反应时间(10、20、30、40、50、60、70、80 min)和不同反应温度(62、63、64、65 和 66 °C), 观察反应管的颜色变化, 绿色为阳性反应, 橙色为阴性反应。同时取 5 μL 的反应产物在含溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶中电泳, 在紫外灯下观察电泳结果。通过研究各个因素对 RT-LAMP 的影响从而获得最佳的 RT-LAMP 反应体系。

1.7 RT-LAMP 检测方法的特异性

分别以轮状病毒标准品、A 组轮状病毒、星状病毒、GII 型诺如病毒核酸为模板, 按照 RT-LAMP 反应体系进行检测, 分析其特异性。

1.8 RT-LAMP 和 RT-PCR 灵敏度的比较

将轮状病毒的标准品 RNA 进行 10 倍梯度稀释

为 10⁹、10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² 拷贝, 并以稀释过的 RNA 作为模板, 按照 RT-LAMP 反应体系进行检测, 分析其灵敏度。同时以 F3 和 B3 为引物对轮状病毒的标准品 RNA 进行 RT-PCR 扩增, 分析其灵敏度。比较 RT-LAMP 和 RT-PCR 的灵敏度差异。25 μL RT-PCR 反应体系为: 5×One Step RT-PCR 缓冲液 5 μL、dNTPs (10 mmol/L) 1 μL、One Step RT-PCR 混合酶 1 μL、引物(F3 和 B3, 10 μmol/L) 各 2 μL、模板 5 μL、DEPC 水 9 μL。反应条件为: 50 °C 30 min; 95 °C 15 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

1.9 RT-LAMP 检测腹泻病人粪便样本

利用 RT-LAMP 对 90 份腹泻病人粪便样本提取出的核酸进行检测, 同步进行 RT-PCR 检测, 将两者的结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 RT-LAMP 检测方法的建立

分别设置不同的 dNTPs、Mg²⁺浓度, 不同内外引物浓度比, 不同反应时间和反应温度, 通过研究各个因素对 RT-LAMP 的影响从而获得最佳的 RT-LAMP 反应体系。图 1-5 显示优化的反应结果, 最佳人 A 组轮状病毒 RT-LAMP 检测体系为 25 μL: 1×ThermoPol buffer, 1.4 mmol/L dNTPs, 6 mmol/L Mg²⁺, 1.0 mol/L 甜菜碱, 25 μmol/L 钙黄绿素, 0.5 mol/L MnCl₂, 1.6 μmol/L 内引物(FIP 和 BIP), 0.8 μmol/L 外引物(F3 和 B3), 10 U AMV 逆转录酶, 8 U *Bst* DNA 聚合酶, 5 μL RNA 模板。反应条件: 64 °C 1 h。

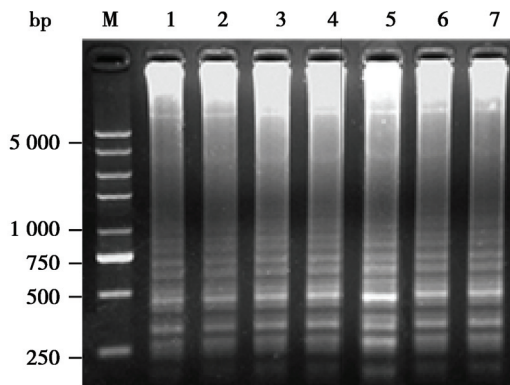


图1 dNTPs的浓度对RT-LAMP反应的影响

Figure 1 Effect of dNTPs on the RT-LAMP reaction

注: M: DNA marker S plus; 1-7: dNTPs的浓度分别为0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L时的扩增产物。

Note: M: DNA marker S plus; 1-7: Amplification products of dNTPs concentration, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 mmol/L, respectively.

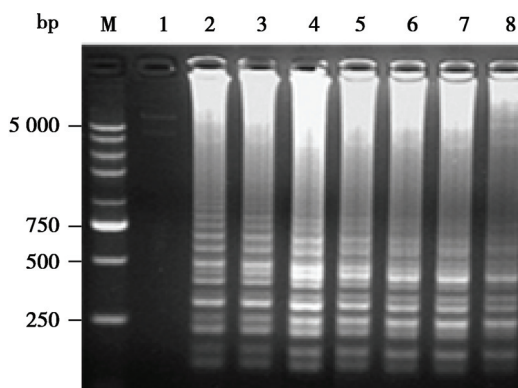


图2 Mg²⁺的浓度对RT-LAMP反应的影响

Figure 2 Effect of Mg²⁺ on the RT-LAMP reaction

注: M: DNA marker S plus; 1-8: Mg²⁺的浓度分别为0、2、4、6、8、10、12、14 mmol/L时的扩增产物。

Note: M: DNA marker S plus; 1-8: Amplification products of Mg²⁺ concentration, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 mmol/L, respectively.

2.2 RT-LAMP 检测方法的特异性

分别以轮状病毒标准品、A组轮状病毒、星状病毒、GII型诺如病毒核酸为模板,按照2.1所述RT-LAMP反应体系进行检测,结果如图6所示。图6A的电泳结果表明,只有轮状病毒标准品和A组轮状病毒出现了特异性扩增产物,呈现出了RT-LAMP反应典型的梯状条带,而对照组的病毒

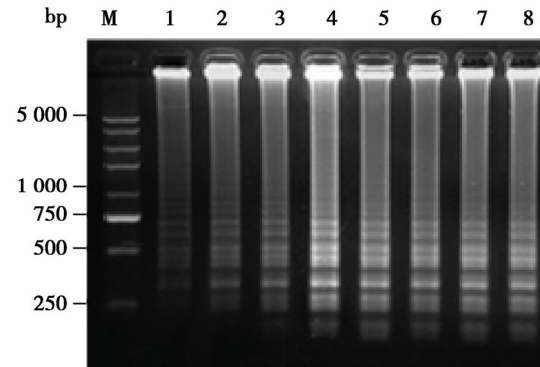


图3 外引物和内引物的浓度比对RT-LAMP反应的影响

Figure 3 Effect of ratio of outer and inner primers on the RT-LAMP reaction

注: M: DNA marker S plus; 1-8: 外引物和内引物的浓度比分别为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8时的扩增产物。

Note: M: DNA Marker S plus; 1-8: Amplification products of ratio of outer and inner primers concentration, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, respectively.

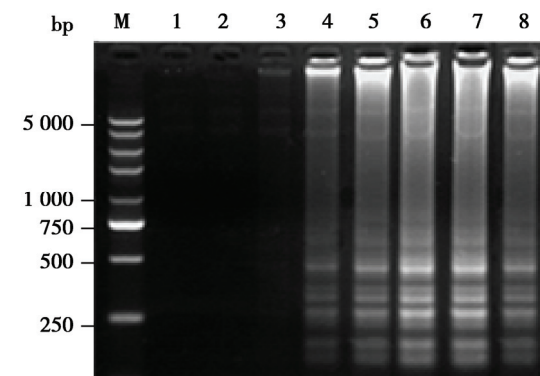


图4 时间对RT-LAMP反应的影响

Figure 4 Effect of reaction time on the RT-LAMP reaction

注: M: DNA marker S plus; 1-8: 时间分别为10、20、30、40、50、60、70、80 min时的扩增产物。

Note: M: DNA marker S plus; 1-8: Amplification products of time, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 min, respectively.

均呈阴性,说明本文建立的RT-LAMP检测方法具有很高的特异性。图6B显示反应管的颜色,只有轮状病毒标准品和A组轮状病毒反应管出现了绿色荧光,其他病毒反应管为橙色,由此可见琼脂糖凝胶电泳结果与扩增产物反应管的颜色变化相一致。

2.3 RT-LAMP和RT-PCR灵敏度的比较

对轮状病毒的标准品RNA进行10倍梯度稀释

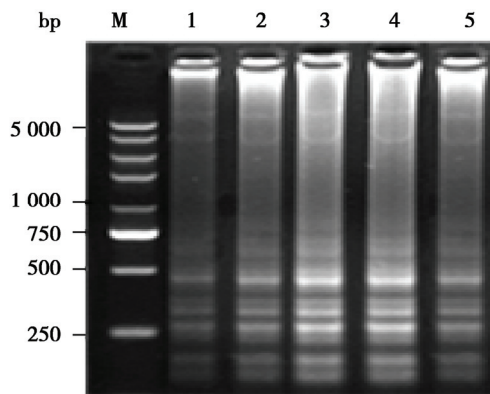


图 5 温度对 RT-LAMP 反应的影响

Figure 5 Effect of temperature on the RT-LAMP reaction

注: M: DNA marker S plus; 1-5: 温度分别为 62、63、64、65、66 °C 时的扩增产物。

Note: M: DNA marker S plus; 1-5: Amplification products of annealing temperature, 62, 63, 64, 65, 66 °C, respectively.

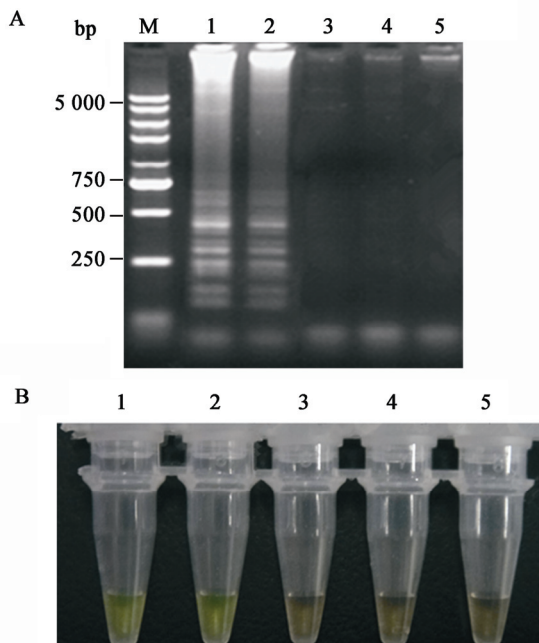


图 6 RT-LAMP 的特异性检测

Figure 6 Specificity of RT-LAMP

注: A: M: DNA marker S plus; 1-4: 分别为阳性标准品、轮状病毒、星状病毒、GII 型诺如病毒的扩增产物电泳结果; 5: 阴性对照。B: 1-4: 分别为阳性标准品、轮状病毒、星状病毒、GII 型诺如病毒扩增产物的可视化结果; 5: 阴性对照。

Note: A: M: DNA marker S plus; 1-4: Electrophoresis results of RNA templates of Positive control, Rotavirus, Astrovirus, Norovirus genotype GII, respectively; 5: Negative control. B: 1-4: Detection by naked eyes of RNA templates of Positive control, Rotavirus, Astrovirus, Norovirus genotype GII, respectively; 5: Negative control.

为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 拷贝, 并分别进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测, 结果如图 7、8 所示。检测结果表明 RT-LAMP 的灵敏度达到了 10^3 拷贝, RT-PCR 的灵敏度达到了 10^5 。因此本实验所建立的 RT-LAMP 检测法比 RT-PCR 灵敏性高 100 倍。

2.4 RT-LAMP 检测腹泻病人粪便样本

同时利用 RT-LAMP 和 RT-PCR 对 90 份腹泻病人粪便样本提取出的核酸进行检测, 结果如表 2 所示。

检测结果表明, 对于 90 份腹泻患者的粪便标本, RT-LAMP 的阳性检出率为 24%, 而 RT-PCR 的阳性检出率为 20%。比较表 2 显示的检测结果, 根据 McNemar 检验, 得 $\chi^2=2.25$, $P>0.1$, 可认为两种方法在阳性检出率上无显著差异, 即表明 RT-LAMP 方法与 RT-PCR 检测 A 组轮状病毒阳性检出率相当。

3 结论

轮状病毒的基因型和亚型比较多, 而且不同型的轮状病毒核苷酸序列差异较大, 所以设计出一套能扩增出所有轮状病毒毒株的 RT-LAMP 引物是极其困难的, 鉴于感染人类的主要是 A 组轮状病毒, 因此本实验只针对 A 组轮状病毒, 以 VP6 基因为靶区域设计 2 对特异性引物, 建立了一步法 RT-LAMP 的检测方法, 并通过钙黄绿素染料将反应结果以颜色变化直观呈现。钙黄绿素在反应前加入, 反应结束后无需开盖即可观察结果, 减少气溶胶污染。相比于一般采用常规 RT-PCR 的方法,

表 2 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测结果比较
Table 2 Comparison of RT-LAMP and RT-PCR for detection of Rotavirus A in 90 fecal specimens

RT-LAMP	RT-PCR		Total
	Positive	Negative	
Positive	18	4	22
Negative	0	68	68
Total	18	72	90

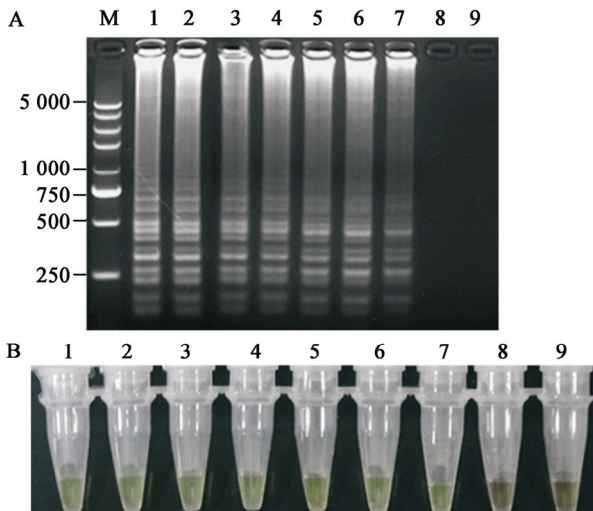


图7 RT-LAMP的灵敏度检测

Figure 7 Sensitivity of RT-LAMP

注: A: M: DNA marker S plus; 1-8: 轮状病毒 RNA 浓度分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies/ μ L 时 RT-LAMP 扩增产物电泳结果; 9: 阴性对照。B: 1-8: 轮状病毒 RNA 浓度分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies/ μ L 时扩增产物的可视化结果; 9: 阴性对照。

Note: A: M: DNA marker S plus; 1-8: Electrophoresis results of RNA concentration of 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 copies/ μ L, respectively; 9: Negative control. B: 1-8: Detection by naked eyes of RNA concentration of 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 copies/ μ L, respectively; 9: Negative control.

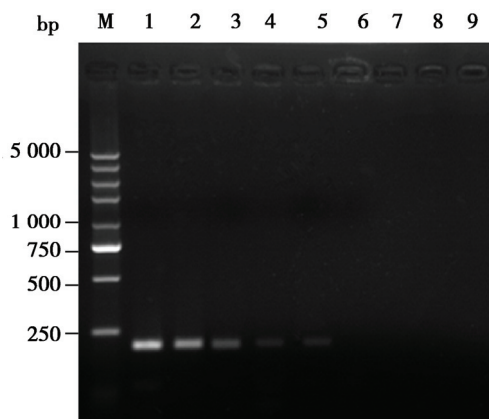


图8 RT-PCR灵敏度的检测

Figure 8 Sensitivity of RT-PCR

注: M: DNA marker S plus; 1-8: 轮状病毒 RNA 浓度分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copies/ μ L 时 RT-PCR 扩增产物电泳结果; 9: 阴性对照。

Note: M: DNA marker S plus; 1-8: Electrophoresis results of RNA concentration of 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 copies/ μ L, respectively; 9: Negative control.

RT-LAMP 检测耗费时间短, 结果直观。

本实验中影响 RT-LAMP 扩增的主要因素是 dNTPs、 Mg^{2+} 浓度, 内外引物浓度比, 反应时间和反应温度。其中 dNTPs 作为 RNA 扩增的主要底物, 浓度过低会降低反应产物含量, 浓度过高减少了游离镁离子浓度, 从而抑制反应扩增, 本实验中确定为 1.4 mmol/L。 Mg^{2+} 浓度对扩增反应具有重要的影响, 浓度过高会产生非特异性扩增, 浓度过低影响产物含量, 本实验确定最佳浓度为 6 mmol/L。RT-LAMP 反应中外引物在哑铃结构形成以前参与反应, 而在后面的循环扩增反应中只有内引物参与反应, 故内外引物比例不同影响实验结果, 本实验确定的最佳比例为 2:1。*Bst* DNA 聚合酶的最适反应温度为 65.8 °C, 当温度升高或降低时都会导致酶的活性降低, 实验结果表明轮状病毒最适反应温度为 64 °C。RT-LAMP 反应产物量随着时间增多, 本实验确定的最佳时间为 1 h。本研究中反应前在体系中加入染料——钙黄绿素, 其与锰离子结合, 并不发出荧光, 随着核酸的大量扩增, 产生的焦磷酸根离子更容易与锰离子结合从而释放出钙黄绿素, 游离的钙黄绿素就可以发出荧光, 当镁离子存在时, 这种荧光得到加强, 通过肉眼即可观察到, 所以绿色为阳性反应, 橙色为阴性反应。

实验结果表明, 本研究所建立的 RT-LAMP 检测体系特异性好, 灵敏度达到了 1 000 copies/ μ L, 比普通 RT-PCR 高出 100 倍。针对 90 份临床腹泻样本的检测结果表明, RT-LAMP 与 RT-PCR 一样可以满足临床检测的需要, 而且该方法仅需要在 64 °C 条件下反应 1 h, 条件温和, 耗时短, 而且不需要昂贵的 PCR 仪器, 只需恒温水浴锅即可。检测结果依赖颜色变化呈现, 无需电泳, 具有直观可靠、方便快捷、特异性高、鉴定简便等优点。该方法具有明显的优势, 适合于野外检测和现场快速检测。

参考文献

- [1] Hoshino Y, Jones RW, Kapikian AZ. Characterization of neutralization specificities of outer capsid spike protein VP4 of selected murine, lapine, and human rotavirus strains[J]. *Virology*, 2002, 299(1): 64-71

- [2] Zhang XH, Zhou X, Yu L. The study on molecular mechanism of interaction between rotavirus and receptors on cellular surface[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2012, 40(6): 58-63 (in Chinese)
张旭辉, 周旭, 余黎. 轮状病毒与细胞表面受体相互作用的分子机制研究[J]. *微生物学免疫学进展*, 2012, 40(6): 58-63
- [3] Kirstein CG, Clare DA, Lecce JG. Development of resistance of enterocytes to rotavirus in neonatal, agammaglobulinemic piglets[J]. *Journal of Virology*, 1985, 55(3): 567-573
- [4] Trask SD, Kim IS, Harrison SC, et al. A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(4): 1764-1770
- [5] Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(2): 304-306
- [6] Tian T. Detection of three food-borne virus by RT-PCR-reverse blot hybridization[D]. Zhenjiang: Doctoral Dissertation of Jiangsu University, 2010 (in Chinese)
田甜. 三种食源性病毒 RT-PCR-反向斑点杂交检测方法的建立[D]. 镇江: 江苏大学博士学位论文, 2010
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63
- [8] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16(3): 223-229
- [9] Blomstrom AL, Hakhverdyan M, Reid SM, et al. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 147(1): 188-193
- [10] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(5): 877-882
- [11] Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, et al. Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 145(2): 162-168
- [12] Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 151(2): 264-270
- [13] Thai HTC, Le MQ, Vuong CD, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(5): 1956-1961
- [14] Toriniwa H, Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *Microbiology and Immunology*, 2006, 50(5): 379-387
- [15] Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, et al. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(6): 1815-1823
- [16] Parida M, Horioka K, Ishida H, et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(6): 2895-2903

编辑部公告**《微生物学通报》英文刊名**

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。