

胡 成, 朱善元, 左伟勇, 等. 鸭 I 型肝炎病毒一步法 RT-LAMP 可视化快速检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 613-618.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.024

## 鸭 I 型肝炎病毒一步法 RT-LAMP 可视化快速检测方法的建立

胡 成<sup>1</sup>, 朱善元<sup>2</sup>, 左伟勇<sup>2</sup>, 王安平<sup>2</sup>, 吴 双<sup>2</sup>, 洪伟鸣<sup>2</sup>, 成大荣<sup>1</sup>, 马丽丽<sup>3</sup>, 王永娟<sup>2</sup>

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009; 2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300; 3. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 本研究根据 GenBank 中登录的鸭 I 型肝炎病毒(DHV I) VP1 基因的高度保守序列, 设计了特异性的引物, 建立了一种灵敏、特异、高效的可视化体外环介导等温扩增方法(RT-LAMP)。结果表明, 该方法的灵敏性可达到 10 fg, 是常规一步法 RT-PCR 方法的 100 倍以上。全部反应可以在 1.0~1.5 h 内完成, 并可以直接通过肉眼观察颜色进行结果判定, 该方法对其他鸭常见的病原体检测结果全部为阴性, 该方法的建立为下一步研制鸭 I 型肝炎病毒的 RT-LAMP 快速检测试剂盒打下基础。

**关键词:** 鸭 I 型肝炎病毒; 环介导等温扩增; 可视化检测

**中图分类号:** S834 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)03-0613-06

## Development of an one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification fast assay for visualized detection of duck hepatitis virus type I

HU Cheng<sup>1</sup>, ZHU Shan-yuan<sup>2</sup>, ZUO Wei-yong<sup>2</sup>, WANG An-ping<sup>2</sup>, WU Shuang<sup>2</sup>, HONG Wei-ming<sup>2</sup>, CHENG Da-rong<sup>1</sup>, MA Li-li<sup>3</sup>, WANG Yong-juan<sup>2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China; 3. College of Veterinary Medicine, Agricultural University of Gansu, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Based on the sequences of duck hepatitis virus type I (DHV I) VP1 gene available in GenBank, a series of specific primers were designed and reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) was developed for visualized detection of DHV I. The results showed

that the detection limit of the DHV I by RT-LAMP was 10 fg, 100 time higher than that by normal one-step RT-PCR. The amplification could be finished within 1.0–1.5 h evaluated by naked eyes. The RT-LAMP developed in this study was specific and had no cross-reactivity with other pathogens of duck, laying a foundation for the development of RT-LAMP-based rapid detection kit.

**Key words:** duck hepatitis virus type I; reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

收稿日期: 2014-10-24

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31302096); 江苏省博士后科研资助计划(1401077B); 江苏农牧科技学院“凤凰人才工程”项目; 江苏农牧科技职业学院 2014 年度重点支持项目(NSFZD1405); 扬州朝天歌农牧科技有限公司横向合作课题(00010114012); 江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室开放课题(JSKLKF1403)

**作者简介:** 胡 成(1989-), 男, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医微生物学研究。

**通讯作者:** 王永娟, (E-mail) 43088591@qq.com

(RT-LAMP); visualized detection

鸭 I 型肝炎病毒 (Duck hepatitis virus type I, DHV I) 是一种高致死性、高传播性的病毒性传染病病原<sup>[1]</sup>。该病毒传播迅速, 主要侵害 4 周龄以内的雏鸭。病雏鸭的特征为意识紊乱, 急性肝炎, 肝脏肿大, 有出血斑点<sup>[2-3]</sup>。在新疫区, 本病的死亡率很高, 可达 90% 以上, 是危害养鸭业发展最为严重的传染病之一<sup>[4]</sup>。

DHV I 的传统检测方法有血清中和试验、琼脂扩散试验和酶联免疫吸附试验等, 这些检测方法虽然可以对病原做出诊断, 但是存在灵敏性不高, 试验时间长, 重复性低, 不易标准化等缺点, 在实际应用中有一定的局限性<sup>[5-7]</sup>。目前, 已建立的 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR 检测方法, 虽然灵敏性相对较高, 但是需要使用昂贵的仪器和试剂, 专业的人员, 试验周期较长, 不能适应基层兽医站和养殖场简便易行快速检测的需要<sup>[8-9]</sup>。

环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 是 2000 年由日本荣研化学株式会社开发的一种新型的恒温核酸扩增方法<sup>[10]</sup>。该技术依赖于能够识别靶序列上特异区域的引物和一种具有解旋功能的 *Bst* DNA 聚合酶, 能够在等温条件下, 短时间内实现核酸的指数级扩增<sup>[11]</sup>。以其简单、快速、高效、灵敏、特异等诸多优点<sup>[12-14]</sup> 受到越来越多兽医工作者的关注。在一些病原微生物的检测中已经开始得到推广应用<sup>[15-18]</sup>。目前, 国内尚无针对鸭 I 型肝炎病毒的一步法快速 RT-LAMP 检测方法。因此本研究设计了一套特异性引物, 拟建立了 DHV I 的可视化检测方法, 为研制 DHV I 的快

速检测试剂盒打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒株

鸭 I 型肝炎病毒 (DHV I AV2111) 购自中国兽医药品监察所; 新城疫病毒 (NDV)、番鸭细小病毒 (MDPV)、小鹅瘟病毒 (GPV) 和鸭瘟病毒 (DPV) 株均由本实验室分离、鉴定并于 -80 °C 保存。

### 1.2 试剂及器材

MgSO<sub>4</sub>、*Bst* DNA 聚合酶 (大片段)、Betaine 和 SYBR Green I 染料购自 New England Biolabs 公司; RT-PCR 检测试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 病毒基因组提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 限制性内切酶 *Sph*I、DNA marker 购自 TaKaRa 公司; dNTP、逆转录酶、RNA 酶抑制剂、DEPC 水购自 Sigma 公司; 其他试剂均为市售分析纯。

### 1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中登录的多条 DHV I 的基因序列, 选取一段高度保守的区域 (VP1 蛋白基因序列: EF442073.1), 使用在线引物设计软件 Primer Explorer V4 设计多套 LAMP 引物, 其中包括 2 条外引物 F3 和 B3; 2 条内引物 FIP (F1c+F2) 和 BIP (B1c+B2); 2 条环引物 LF 和 LB, 分别识别保守区域 8 个基因位点。引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成 (表 1)。

表 1 LAMP 引物序列

Table 1 Sequences of LAMP primers

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物长度 (bp)
FIP	GCCTCCCAACAGATGTTTAAACAAGAGACAGCTAATGTCCCG	42
BIP	AGGACTGTGCAACATGCTTCAAAGAACCGGATGAGAGAGG	40
F3	GCCAGTTTGCTTCCTGAA	18
B3	TTAACAATGGTAAGGATGATCTC	23
LF	TACAAGGTGAGTCTCGCACTC	21
LB	AGAGTTGGACCTCCAAGTTCCAGATA	26

## 1.4 病毒核酸的提取

参照生工柱式病毒抽提纯化试剂盒说明书及相关文献记载<sup>[19]</sup>,分别提取鸭 I 型肝炎病毒、新城疫病毒、番鸭细小病毒、小鹅瘟病毒和鸭瘟病毒的基因组,取 1  $\mu\text{l}$  样品利用分光光度仪测定病毒总含量,少量分装,于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.5 RT-LAMP 反应体系的建立及优化

1.5.1 镁离子浓度的优化 镁离子终浓度为  $3.5\sim 6.0\text{ mmol/L}$ ,以  $0.5\text{ mmol/L}$  梯度依次递增,重复进行 3 次平行反应。

1.5.2 引物浓度的优化 由于外引物对试验结果影响很小,所以试验中参照文献数据固定外引物,对内引物终浓度为  $0.8\sim 2.4\text{ }\mu\text{mol/L}$ ,以  $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$  梯度依次递增,重复进行 3 次平行反应。

1.5.3 dNTPs 浓度的优化 dNTPs 终浓度为  $0.8\sim 1.8\text{ mmol/L}$ ,以  $0.2\text{ mmol/L}$  梯度依次递增,重复进行 3 次平行反应。

1.5.4 甜菜碱浓度的优化 由于甜菜碱具有稳定酶活性的作用,同时又可以增强反应的特异性,甜菜碱终浓度为  $0.2\sim 0.7\text{ mol/L}$ ,以  $0.1\text{ mol/L}$  梯度依次递增,重复进行 3 次平行反应。

1.5.5 反应温度的优化 以 DHV AV2111 RNA 为模板,反应温度为  $61\sim 66\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,以  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  梯度依次递增,重复进行 3 次平行反应。

1.5.6 最佳反应时间的确定 反应时间为  $15\sim 90\text{ min}$ ,以  $15\text{ min}$  梯度依次递增,重复进行 3 次平行反应。

1.5.7 扩增产物的检测 反应结束后肉眼直接观察反应管是否有混浊(短暂离心后可使焦磷酸镁沉于管底,更利于观察);吸取  $10\text{ }\mu\text{l}$  反应液于  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳观察;向剩余  $15\text{ }\mu\text{l}$  反应液中加入  $0.5\text{ }\mu\text{l}$  SYBR Green I 染料辅助观察。

1.5.8 扩增产物的酶切鉴定 用 SeqBilder 软件分析 RT-LAMP 目的片段中的酶切位点,并筛选出单一的 *SphI*(位点 *GCATG/C*)限制性内切酶。 $20\text{ }\mu\text{l}$  酶切体系如下:*SphI* ( $10\text{ U}$ )  $1\text{ }\mu\text{l}$ ,  $10\times$  缓冲液 H  $2\text{ }\mu\text{l}$ , RT-LAMP 产物  $5\text{ }\mu\text{l}$ , 超纯水  $12\text{ }\mu\text{l}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应  $2\text{ h}$ 。取  $10\text{ }\mu\text{l}$  的酶切产物于  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳观察。

## 1.6 RT-PCR 方法的建立

参照一步法 RT-PCR 检测试剂盒说明书。加入引物 F3 和 B3 及模板 RNA 各  $1\text{ }\mu\text{l}$ 。反应体系为  $25\text{ }\mu\text{l}$ ,于 PCR 仪上按如下程序进行扩增: $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育

$45\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ ,  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $30\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $40\text{ s}$ , 共 30 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $7\text{ min}$ 。

## 1.7 RT-LAMP 的灵敏性检验

将抽提的 DHV I 核酸模板进行 10 倍系列稀释成  $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $100\text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 $10\text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 $1\text{ pg}/\mu\text{l}$ 、 $100\text{ fg}/\mu\text{l}$ 、 $10\text{ fg}/\mu\text{l}$ 、 $1\text{ fg}/\mu\text{l}$  等 8 个浓度梯度。对各浓度 RNA 模板分别用所建立的 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测方法进行灵敏性对比试验。

## 1.8 RT-LAMP 的特异性试验

分别用抽提的鸭 I 型肝炎病毒、新城疫病毒、番鸭细小病毒、小鹅瘟病毒和鸭瘟病毒基因组,按照所建立的鸭 I 型肝炎病毒 RT-LAMP 检测方法,进行特异性试验。

## 1.9 RT-LAMP 重复性和稳定性试验

取等量 5 份不同代次的 DHV I 尿囊液,分别提取 RNA 进行 RT-LAMP 检测,观察结果。取等量 5 份不同代次的 DHV I 尿囊液,对每一代次重复 3 次进行 RT-LAMP 检测,观察结果,以确定该检测方法的重复性和稳定性。

# 2 结果与分析

## 2.1 RT-LAMP 反应条件

通过对各反应条件的调整优化,最终确定 RT-LAMP 反应体系为  $25\text{ }\mu\text{l}$ :包括 *Bst* DNA 聚合酶( $8\text{ U}/\mu\text{l}$ )  $1.0\text{ }\mu\text{l}$ 、 $10\times$  *Bst* Buffer  $2.5\text{ }\mu\text{l}$ 、dNTPs ( $10\text{ mmol/L}$ )  $3.5\text{ }\mu\text{l}$ 、Betaine ( $5\text{ mol/L}$ )  $2.0\text{ }\mu\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4$  ( $25\text{ mmol/L}$ )  $4.0\text{ }\mu\text{l}$ 、AMV ( $5\text{ U}/\mu\text{l}$ )  $1.0\text{ }\mu\text{l}$ 、Inhibitor ( $40\text{ U}/\mu\text{l}$ )  $1.0\text{ }\mu\text{l}$ 、FIP/BIP ( $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ )  $2.0\text{ }\mu\text{l}$ 、F3/B3 ( $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ )  $0.5\text{ }\mu\text{l}$ 、LF/LB ( $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ )  $0.2\text{ }\mu\text{l}$ 、模板 RNA  $1.0\text{ }\mu\text{l}$ ,加 DEPC 水补足至  $25\text{ }\mu\text{l}$ 。充分混匀。反应程序: $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应  $45\text{ min}$ ,  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  灭活  $5\text{ min}$ 。

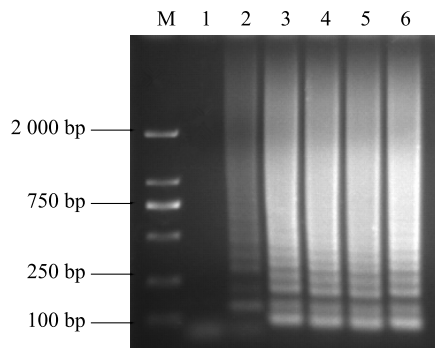
## 2.2 最佳反应时间

在反应进行  $45\text{ min}$  后,电泳检测有明显的条带,且随着时间延长,条带亮度并没有显著增强,因此选择  $45\text{ min}$  为最佳反应时间(图 1)。

## 2.3 特异性

2.3.1 产物酶切鉴定 用限制性内切酶 *SphI* 对 RT-LAMP 产物进行酶切鉴定,出现与预期大小  $218\text{ bp}$  相符合的酶切产物条带(图 2)。

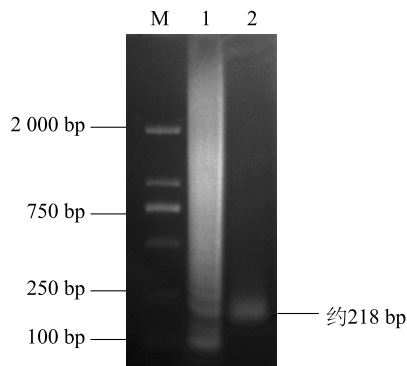
2.3.2 特异性检验 采用本试验建立的 RT-LAMP 方法进行检测,只有以 DHV AV2111 的 RNA 为模



M:250 bp-I DNA ladder;1~6 分别为反应时间为 15 min、30 min、45 min、60 min、75 min、90 min。

图 1 最佳反应时间的确定

Fig.1 Determination of the best reaction time



M:250 bp-I DNA ladder;1:RT-LAMP 产物;2:酶切产物。

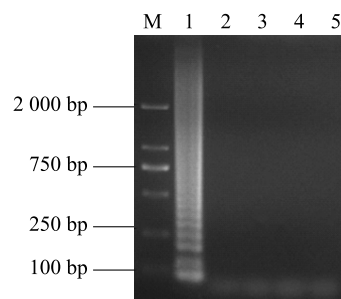
图 2 DHV I RT-LAMP 扩增产物酶切鉴定

Fig.2 Results of the specificity of DHV I RT-LAMP assay

板时,结果为阳性(肉眼观察反应管可见乳白色浑浊,加入 SYBR Green I 染料后呈现翠绿色,1.5% 琼脂糖凝胶电泳呈现特异性梯形条带),而以新城疫病毒、番鸭细小病毒、小鹅瘟病毒和鸭瘟病毒的 DNA/RNA 为模板进行检测时,结果均为阴性(肉眼观察反应管清亮透明、无乳白色浑浊,加入 SYBR Green I 染料后呈现橘红色,1.5% 琼脂糖凝胶电泳无特异性梯形条带出现)(图 3),表明该方法的特异性良好。

## 2.4 灵敏性

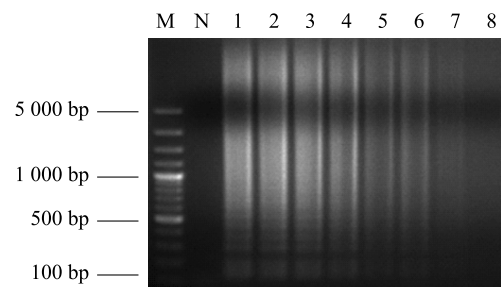
所建立的 RT-LAMP 对 DHV RNA 的最低检测限为 10 fg(图 4),而常规 RT-PCR 方法最低检测限为 1 pg(图 5),建立的 RT-LAMP 敏感性比常规 RT-PCR 高约 100 倍。



M:250 bp-I DNA ladder;1:鸭肝炎病毒;2:鸭瘟病毒;3:番鸭细小病毒;4:新城疫病毒;5:小鹅瘟病毒。

图 3 RT-LAMP 方法检测 DHV I 的特异性

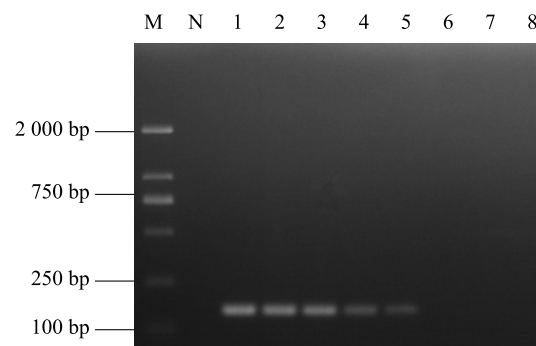
Fig.3 Specificity of RT-LAMP assay for DHV I



M:100 bp Plus DNA ladder;N:阴性对照;1:10 ng;2:1 ng;3:100 pg;4:10 pg;5:1 pg;6:100 fg;7:10 fg;8:1 fg。

图 4 RT-LAMP 方法检测 DHV I 的灵敏性

Fig.4 Sensitivity of RT-LAMP assay for DHV I



M:250 bp-I DNA ladder;N:阴性对照;1:10 ng;2:1 ng;3:100 pg;4:10 pg;5:1 pg;6:100 fg;7:10 fg;8:1 fg。

图 5 RT-PCR 方法检测 DHV I 的灵敏性

Fig.5 Sensitivity of RT-PCR assay for DHV I

## 2.5 重复性和稳定性

取等量 5 份不同代次的 DHV I 尿囊液,分别提



取 RNA 进行 RT-LAMP 检测,结果显示,5 份检测结果均没有明显差异;取等量 5 份不同代次的 DHV I 尿囊液,对每一代次重复三次进行 RT-LAMP 检测,结果显示,3 次重复间没有明显差异。

### 3 讨论

鸭病毒性肝炎是由鸭肝炎病毒(DHV)引起的雏鸭的一种具有高度传播性、高度致死性传染病。DHV 分为 I 型、II 型和 III 型,三个型之间无交叉保护作用。I 型 DHV 呈现世界性分布,并常和其他病毒、细菌混合感染,对养鸭业危害严重,造成了巨大的经济损失<sup>[20-21]</sup>。本研究建立的 DHV I 检测方法对基层和临床快速诊断和疾病处置具有一定的指导意义。

LAMP 技术是一种新型核酸扩增技术。与其他检测方法相比,该方法具有特异性强,灵敏度高,扩增高效、快速,步骤简单等诸多优点。该技术主要利用了 *Bst* DNA 聚合酶在特异性引物的存在下于 61 ~ 66 °C 具有解旋功能和瀑布式扩增功能,在等温的情况下即可实现核酸的变性与扩增。LAMP 的关键点是引物设计和评估,需要设计出针对基因保守片段的 6 条引物且识别 8 个特异性的位点。常规的 LAMP 只需要 F3、B3 和 FIP (F1c+F2)、BIP (B1c+B2)即可实现目的基因的扩增<sup>[22-24]</sup>。但是为了提高反应效率,加快检测速度,本研究在 F1c+F2 之间增加了 LF 引物,在 B1c+B2 之间增加了 LB 引物,大大提高了 LAMP 的反应速度,在 30 ~ 45 min 即可实现目的基因的扩增检测。

本研究分别利用肉眼颜色观察和琼脂糖凝胶电泳的检测方法对 DHV I RT-LAMP 反应引物、体系进行检测和分析,得到了高效、特异性扩增 DHV I 的 RT-LAMP 引物,最佳的反应体系配比和最短有效反应时间,建立了可视化的检测 DHV I 的 RT-LAMP 方法,只有鸭 I 型肝炎阳性样本能进行核酸的特异性扩增,其他常见家禽病原均不发生非特异性反应;DHV I 核酸在该体系中 63 °C 孵育 45 min,即可判断结果,比目前的 PCR 方法更为便捷,且检出限量达到 10 fg,显示出极高的灵敏性。

本试验将肉眼沉淀观察法、染料辅助观察法相结合,并分别与琼脂糖凝胶电泳法对比:其中肉眼沉淀观察法在反应产物较少时存在假阴性

的可能,而 SYBR Green I 染料辅助观察法与琼脂糖凝胶电泳结果高度一致,说明 SYBR Green I 染料辅助观察法可作为一种检测方法,这样不仅省去了传统的琼脂糖凝胶电泳的过程,节省了时间和费用,同时也保护了环境和操作人员,更加方便基层和现场快速检测。

本试验建立的 DHV I RT-LAMP 检测方法简便、快速、灵敏、特异,具有较高的实用性,适合在基层兽医站和养殖场推广使用,为 DHV I 的综合防治和早期诊断提供了便利。

### 参考文献:

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:北京科学出版社,1997:67-78.
- [2] DING C, ZHANG D. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1[J]. Virology, 2007, 361(1): 9-17.
- [3] 罗玉均,张桂红,陈建红,等. I 型鸭肝炎病毒 R 株全基因组分析与检测技术的研究[J]. 中国农业科学,2008,41(9):2835-2842.
- [4] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno-and serotype when compared to duck hepatitis virus type I type strains[J]. Archives of virology, 2007, 152(11): 2059-2072.
- [5] 陈博言. 应用酶联免疫吸附试验检测雏鸭肝炎病毒抗原[J]. 畜牧与兽医,1989,21(5):200-201.
- [6] LEVINE P P F J. A hitherto -undescribed virus disease of ducks in North America [J]. Cornell Veterinarian,1950,40(4):71-86.
- [7] 孙泉云,李劲松. 间接血凝试验检测鸭肝炎病毒抗体的研究[J]. 上海畜牧兽医通讯,1996(5):6-7.
- [8] 何冉娅,罗玉均,孙 伟,等. I 型鸭病毒性肝炎病毒和新型鸭肝炎病毒鉴别 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医,2009(5):14-16.
- [9] 谢丽基,谢芝勋,庞耀珊,等. 鸭 I 型肝炎病毒荧光定量 RT-PCR 方法建立及初步应用[J]. 中国家禽,2012(10):23-26.
- [10] 刘业兵,张 磊,孙跃辉,等. 可视化的 RT-LAMP 方法检测禽白血病病毒[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(1):150-156.
- [11] 张兴娟,孙 元,刘大飞,等. 猪瘟病毒野毒株 RT-LAMP 可视化检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2009(11):864-868.
- [12] 李兆龙,陈仕龙,林锋强,等. 禽新型黄病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(4):659-663.
- [13] 贺 楠,雷质文,梁成珠,等. LAMP 方法检测霍乱弧菌的研究[J]. 中国热带医学,2009(1):23-26.
- [14] 李 伟,李 刚,范晓娟,等. 快速检测小反刍兽疫病毒 RT-LAMP 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2009(5):374-378.
- [15] 谢丽基,谢芝勋,刘加波,等. 鸭 I 型肝炎病毒 RT-LAMP 可视

- 化检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2012(2): 112-115.
- [16] YAN L, PENG S, YAN P, et al. Comparison of real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification and real-time reverse transcription polymerase chain reaction for duck Tembusu virus[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 182(1): 50-55.
- [17] JI J, XIE Q M, CHEN C Y, et al. Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Poultry Science, 2010, 89(3): 477-483.
- [18] SONG C, WAN H, YU S, et al. Rapid detection of duck hepatitis virus type- I by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 182(1): 76-81.
- [19] 王永娟, 朱善元, 左伟勇, 等. 鸡  $\alpha$ -干扰素成熟肽的原核表达及其多价血清的制备[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 34(1): 32-35, 40.
- [20] SANDHU T S, SHAW K Y S A. Duck hepatitis In: Y M Saif (eds). Diseases of poultry [M]. 11th ed. Iowa St: University Press Ames, 2003.
- [21] 张艳芳, 罗 薇, 刘内生, 等. 鸭肝炎病毒的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011(7): 171-175.
- [22] 王 丽, 李 琳, 山崎伸二, 等. 新型恒温核酸扩增法快速检测副溶血性弧菌的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 382-385.
- [23] 车勇良, 陈如敬, 王隆柏, 等. 副猪嗜血杆菌可视化 LAMP 检测方法的建立与应用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(12): 61-66.
- [24] 郭盼盼, 黄书林, 张跃民, 等. 环介导等温扩增技术快速诊断猪肺炎支原体[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(4): 822-826.

(责任编辑: 陈海霞)