

新冠病毒的现场可视化 LAMP 检测 及其冷链食品分析应用

刘楠, 澹台玮, 王芳, 徐秦峰*

(陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021)

摘要: 建立了一种基于环介导等温扩增技术 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 和核酸分子“光开关” $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$ 相结合的新型冠状病毒高灵敏可视化检测方法。分别采用保温杯代替实验室恒温装置, 采用蓝光手电代替蓝光透射仪, 实现了新冠病毒的现场快速可视化 LAMP 检测。针对新型冠状病毒 N 基因设计特异性序列引物, 采用 $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$ 分子光开关的特性检测 LAMP 扩增产物, 结果可以借助蓝光手电直接通过肉眼观察是否出现红色荧光进行判定。该方法可检测到单个拷贝数的新型冠状病毒基因片段, 并具有高度特异性, 检验快速, 整个过程仅需 40 min 即可目视观察结果。对新冠病毒假病毒人工污染的模拟冷链食品进行检测, 结果与目前新型冠状病毒检测金标准实时荧光定量 PCR 法吻合度为 100%。该方法仅需保温杯和蓝光手电, 可以作为实时荧光 PCR 方法的补充, 为食品新冠病毒的现场筛查提供快速高效的技术支持。

关键词: 环介导等温扩增技术; 新型冠状病毒; $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$; 现场可视化 LAMP 检测; 冷链食品

文章编号: 1673-9078(2022)01-88-93

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1415

LAMP Assay for On-site Detection of SARS-CoV-2 and Its Application in Cold-chain Food Analysis

LIU Nan, TANTAI Wei, WANG Fang, XU Qinfeng*

(Shaanxi University of Science & Technology, School of Food and Biological Engineering, Xi'an 710021, China)

Abstract: A highly sensitive visualization method for SARS-CoV-2 detection, based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and molecular light switch $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$, was established. In this design, insulation cups replaced laboratory thermostats and blue flashlights replaced blue transilluminators, to realize the rapid on-site visual LAMP detection of SARS-CoV-2. Specific primers were designed for the N gene of SARS-CoV-2. LAMP amplification products were detected by $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$ with molecular light switch characteristics. Red fluorescence could be directly detected by naked eye using blue light flashlight. Single copy number SARS-CoV-2 gene fragments were detected with high specificity. The detection was rapid, requiring only 40 minutes to visually observe the results. The LAMP detection results for food samples artificially contaminated with SARS-CoV-2 pseudovirus were 100% consistent with the current gold-standard real-time fluorescent quantitative PCR method for SARS-CoV-2 detection. This method requires only insulation cups and blue flashlight, and can be used to supplement the real-time fluorescent PCR method to provide a fast and efficient on-site screening of food for SARS-CoV-2.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; SARS-CoV-2; $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$; on-site visual LAMP detection; cold chain food

引文格式:

刘楠, 澹台玮, 王芳, 等. 新冠病毒的现场可视化 LAMP 检测及其冷链食品分析应用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 88-93

LIU Nan, TANTAI Wei, WANG Fang, et al. Visualized LAMP assay for on-site detection of SARS-CoV-2 and its application to cold food [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 88-93

收稿日期: 2021-12-15

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1606302); 国家自然科学基金项目 (22074085)

作者简介: 刘楠 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, Email: 1065593975@qq.com

通讯作者: 徐秦峰 (1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全, Email: xuqinfeng@sust.edu.cn

2019年12月以来,由新型冠状病毒 SARS-CoV-2 感染引发的疫情已经在全球大面积流行^[1,2]。随着疫情的蔓延,许多冷链食品外包装检测出病毒阳性并成为关注的焦点^[3,4]。据报道自2020年7月以来,国内新冠肺炎病毒呈阳性事件与食品外包装相关的至少已有10件^[5]。各市从境外进口的各种海鲜产品、禽肉等冷冻食品外包装携带新冠肺炎病毒^[6]成为了疾病传播新

途径,给食品质量安全保障带来了新挑战。同时相关专家证明了新冠肺炎病毒可在冷链外包装上长时间存活,一般冰鲜水产品的运输温度在 0~4 °C、冷冻水产品和冷冻畜禽肉的运输温度在零下 18 °C 以下^[7,8],这种运输条件为新冠病毒提供了生存环境。海关总署要求部分海关在不影响正常贸易的情况下,对部分冷链食品开展新冠病毒核酸抽样检验工作。因此快速、高效的现场检验可为抽检工作提供便利。

实时荧光 PCR 法是目前各医疗检测机构对新型冠状病毒感染检测的金标准^[9,10],但该方法需要较为昂贵的设备,且对人员操作技术要求较高,因此该方法适用于实验室的检测,不适用于现场快速检测^[11]。

环介导等温扩增 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 技术因其恒温操作而具有现场检测的条件,同时也具有快速准确的优点,目前已经成为检测病原微生物的重要分子工具。已有文献报道^[12-14],采用钙黄绿素检测 LAMP 扩增产物,实现了 1 h 内的新冠病毒的肉眼可视化检测,无需大型仪器设备。但由于钙黄绿素分子不稳定,并且其 stoke's 位移较小,蓝光激发时显示绿色荧光,存在颜色变化不够明显等问题。20 世纪 90 年代初期, Barton 课题组^[15]发现了 [Ru(phen)₂dppz]²⁺ 对双链 DNA 的分子的“光开关”效应, Ru(II)配合物水溶液本身不发光,当加入 dsDNA 分子时会发光,具有优良的水溶性和稳定性,Stoke's 位移大,通过蓝光激发光观察,呈现红色荧光,相较于传统 LAMP 染料的绿色荧光,颜色区分更明显,结果更易判定^[16-27]。

本研究建立了一种基于环介导等温扩增 LAMP 技术和金属 Ru(II)配合物染料相结合的新型冠状病毒可视化闭管检测方法。通过保温杯和蓝光手电代替实验室用电的恒温水浴锅和蓝光透射仪,开发了一种现场快速可视化 LAMP 检测试剂盒。该方法可为新型冠状病毒的食品现场检验工作提供一种快速、经济、便

捷的工具,同时也可应用于医疗、环境、食品卫生等其他领域。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

MyGo Pro 荧光定量 PCR 仪, IT-IS Life Science; PowerPac™ Basic 琼脂糖水平电泳仪, BIO-RAD; 保温杯, HUAWEI HiLink; 蓝光手电筒, AloneFire; MYSPIIN12 微型离心机, Thermo Fisher Scientific。

1.2 实验试剂

钌 (II) 配合物 [Ru(phen)₂dppz]²⁺ 试剂, Jena Bioscience 公司; dNTP 混合液、Solution Mix、MgSO₄、Bst 2.0 WarmStar® DNA 聚合酶、100×TE Buffer 均来自 New England Biolabs; 甜菜碱, Sigma 公司; (20×) EvaGreen, Biotium 公司; PCR 反应 mix (KT201)、DNA MarkerII、TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂盒、FastKing RT Kit (KR116), 天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖 (Biotech Grade)、新冠病毒 N 基因质粒、MERS 病毒质粒、金黄色葡萄球菌质粒、阪崎肠杆菌质粒以及新冠病毒假病毒,均来自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 引物的设计与合成

本研究针对新型冠状病毒基因在 NCBI 网站中登记号为 MN908947 的信息,选定新冠 N 基因对应序列,同时依据引物设计原则使用 PrimerExplorerV5 在线设计 LAMP 引物,包括外引物 F3、B3 和内引物 FIP、BIP。根据 T/CAQI 159-2020 食品及食品包装表面中新型冠状病毒采样与实时荧光 RT-PCR 检测方法选取 PCR 引物序列,包括正向引物 (F)、反向引物 (R) 和双标记荧光探针 (P)。选引物序列见表 1。

表 1 实验所用引物及探针序列

Table 1 Primers and probe used in the experiment

名称	序列(5'-3')
F3	AACACAAGCTTTCGGCAG
B3	GAAATTTGGATCTTTGTATCC
FIP	CGCATTGGCATGGAAGTCACTTTGATGGCACCTGTGTAG
BIP	TGCGCCAATGTTTGTAAATCAGCCAAGGAAATTTGGGGAC
F	GGGGAACCTTCTCTGCTAGAAT
R	CAGACATTTGCTCTCAAGCTG
P	FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGAIT-BHQ

1.4 LAMP 体系的建立

LAMP 反应体系为 10 μL , 包括: 1 μL 10 \times Thermol Pol buffer, 外引物 F3 和 B3 (4 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.25 μL , 内引物 FIP 和 BIP (50 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.16 μL , 1.4 μL dNTPs (10 mmol/L), 1.6 μL 甜菜碱 (0.8 mol/L), 0.45 μL MgSO₄ (100 mmol/L), 0.4 μL BstDNA 聚合酶 (8 U/ μL)。阳性体系添加 DNA 模板 1.2 μL , 以双蒸水代替 DNA 作为阴性对照, 最后用水补齐到 10 μL 。钌(II)配合物[Ru(phen)₂dppz]²⁺添加至反应管内的吸头内^[28]。将反应管密封, 放置于保温杯中, 调节保温杯温度至 65 $^{\circ}\text{C}$, 恒温扩增反应 40 min, 反应结束后倒置混匀, 使反应产物与[Ru(phen)₂dppz]²⁺结合并混匀, 最后在蓝光手电下进行目视观察比色、分析。阳性结果在蓝光激发下显示红色, 阴性结果无色。具体步骤见图 1。

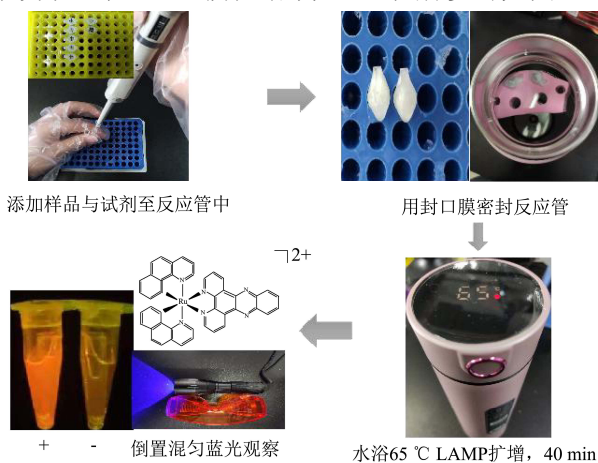


图 1 可视化现场检测试剂盒

Fig.1 Visualized LAMP kit for on-site detection

1.5 可视化现场检测试剂盒的可行性

添加 0.25 μL Eva Green (20 \times) 至反应体系中, 使用 MyGo 仪进行实时恒温 LAMP 反应观察实时荧光扩增曲线, 验证引物进行 LAMP 扩增反应的可行性。将在保温杯中 65 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 LAMP 恒温反应 40 min 扩增的反应管取出, 通过蓝光手电观察离心管荧光颜色, 用手机拍摄荧光照片, 并使用荧光光谱仪扫描光谱, 最后采用 2% 的琼脂糖凝胶进行确认在保温杯中进行了 LAMP 反应。

1.6 可视化 LAMP 方法的灵敏度与特异性

将 1.79×10^6 copies/ μL 的新型冠状病毒质粒按照 10 倍浓度梯度依次稀释为 1.79×10^6 、 1.79×10^5 、 1.79×10^4 、 1.79×10^3 、 1.79×10^2 、 1.79×10^1 、 1.79×10^0 copies/ μL 并设置空白对照, 每个梯度均取 1.2 μL 为模板, 验证方法的灵敏度。

应用构建好的 LAMP 可视化检测方法, 以目标病毒(新型冠状病毒质粒)为阳性模板, 以非目标(MERS 病毒、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌)的质粒, 分别作为待测样品模板, 双蒸水作为阴性对照 (NTC) 进行特异性验证。反应结束后, 通过蓝光激发光观察颜色变化。

1.7 人工污染冷链食品中新冠病毒的检测

以新冠病毒假病毒人工污染冰淇淋, 作为模拟冷链食品样品。然后通过 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 再通过 FastKing RT Kit (KR116) 试剂盒反转录为 DNA, 以反转录产物作为模板, 进行人工污染冷链食品中新型冠状病毒的可视化 LAMP 和实时荧光定量 PCR 检测。荧光定量 PCR: 5 μL KT201, 正向引物 (4 $\mu\text{mol/L}$)、反向引物 (4 $\mu\text{mol/L}$)、荧光探针 (4 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 最后用双蒸水补齐到 10 μL 。采用两步扩增, 95 $^{\circ}\text{C}$ -5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ -10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ -45 s, 共 35 个循环。

2 结果与讨论

2.1 可视化 LAMP 检测方法的可行性

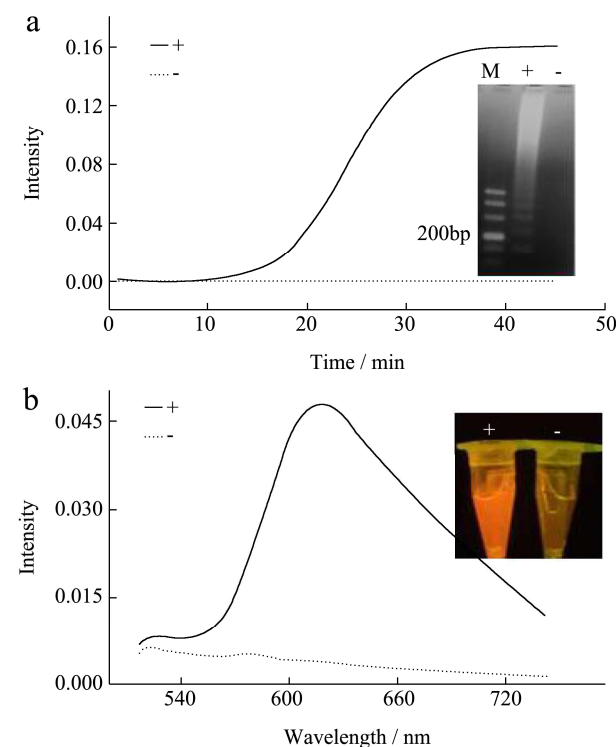


图 2 可视化现场检测试剂盒的可行性

Fig.2 Feasibility of visualized LAMP kit for on-site detection

注: 图 a 为 LAMP 扩增曲线和琼脂糖凝胶电泳; 图 b 为荧光发射曲线和 LAMP 扩增产物图。

采用实时荧光 PCR 仪, 进行恒温 LAMP 反应,

结果如图 2a 所示,在模板存在时能够观察到明显的扩增曲线,证明引物能够进行 LAMP 扩增反应。同时在保温杯中进行的 LAMP 扩增反应,其扩增产物的琼脂糖凝胶电泳,可清晰显示出 LAMP 扩增条带(图 2a),表明在保温杯中可以进行 LAMP 反应。同时在蓝光手电照射下,阳性反应管发射出明显的红色荧光信号,如图 2b 所示;无模板存在时,无荧光发射,所观察到的反应管的荧光颜色与荧光光谱信号强度保持一致。表明钌(II)配合物 $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$ 可用于 LAMP 扩增反应的可视化检测。相比于常见的钙黄绿素 stoke's 位移约为 $40\text{ nm}^{[13]}$,本实验中的 $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$ 试剂的 stoke's 位移则大于 150 nm ,采用蓝光激发时发射处于红色荧光区,颜色区分更为明显,可减少目视观察的主观性误差。

2.2 可视化 LAMP 检测方法的灵敏度与特异性检验

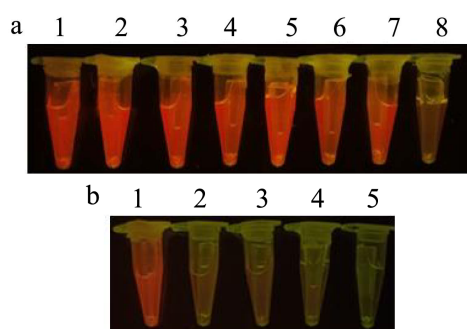


图3 扩增体系的灵敏度与特异性检验

Fig.3 Sensitivity and specificity test of amplification system

注:图a为灵敏度检验,1~8分别为模板浓度 1.79×10^6 、 1.79×10^5 、 1.79×10^4 、 1.79×10^3 、 1.79×10^2 、 1.79×10^1 、 1.79×10^0 copies/ μL 和阴性对照;图b为特异性检验,1~5分别为新冠病毒、MERS病毒、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌和阴性对照。

新型冠状病毒质粒的灵敏度检验结果如图 3a 所示,通过使用缓冲液对质粒进行 10 倍梯度稀释,在 8 号反应管空白对照显示阴性的情况下,新冠病毒浓度在 1.79×10^6 copies/ μL 至 1.79×10^0 copies/ μL 中检测结果均为阳性。因此 LAMP 可视化检测方法对新型冠状病毒的检测灵敏度为单个拷贝数。

针对新型冠状病毒质粒、MERS 病毒质粒、金黄色葡萄球菌质粒、阪崎肠杆菌质粒 DNA 进行 LAMP 扩增,采用超纯水作为空白对照。检测结果如图 3b 所示,含有新冠病毒质粒的可视化 LAMP 检测结果为阳性,而对于其他病毒和食源性病原菌以及空白对照的扩增结果均为阴性。因此证明该 LAMP 可视化检测方法对新冠病毒有引物特异性。

2.3 人工污染冷链食品中新冠病毒的检测结果

以新冠假病毒人工污染冷链食品,同时进行可视化 LAMP 扩增检测与实时荧光 PCR 检测,验证方法的实用性。如图 4a 和 4b 所示,新冠假病毒阳性对照和新冠假病毒人工污染的冰淇淋样品,均在 Ct 值 24 左右出现典型的扩增曲线,同时反应管中出现明显的红色荧光,冰淇淋阴性对照则无明显的扩增曲线和红色荧光出现,证明该方法可应用于冷链食品中新冠病毒的检测。

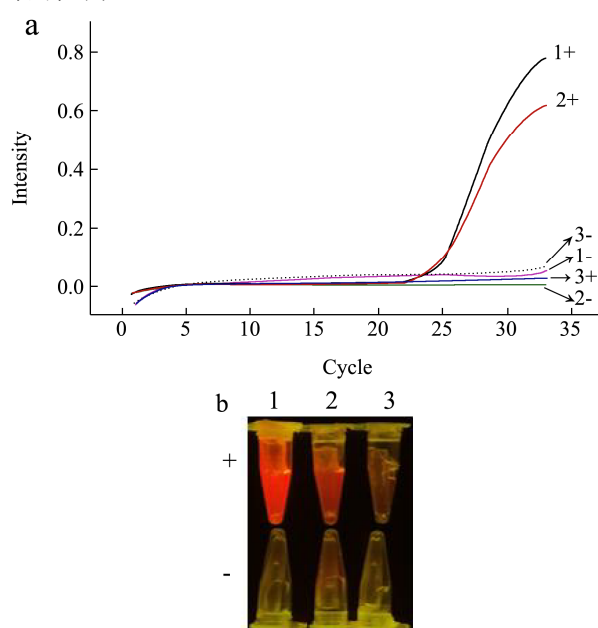


图4 人工污染的冷链食物样品检测结果

Fig.4 Test results of artificially contaminated cold food samples

注:图a为人工污染冷链食品中新冠病毒检测的实时荧光 PCR 扩增曲线;图b为人工污染冷链食品中新冠病毒的可视化 LAMP 扩增检测结果图,1为新冠假病毒阳性对照,2为新冠假病毒人工污染的冰淇淋样品,3为冰淇淋样品。

3 结论

本研究建立的基于 Ru(II)配合物 $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$ 染料的闭管可视化检测 LAMP 扩增新冠病毒的方法,反应温度为 $62\text{ }^\circ\text{C}$,反应时间仅需 40 min ,其检出性能与实时荧光定量 PCR 法相持平,可检测到模板浓度为单个拷贝数,并与 MERS 病毒、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌之间无交叉反应,具有较高的特异性。无需实验室的精密操作与仪器,仅利用保温杯和蓝光手电筒可进行现场可视化目视检测,成本低、高效快速。该方法可以为食品新冠检测筛查提供支持,适合在资源有限场所开展核酸检测或者家庭自检。

参考文献

- [1] Broughton J P, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 870-875
- [2] 丁崇正. 新冠疫情下食品安全检测的重要性[J]. *科技创新与应用*, 2020, 30: 70-71
DING Chongzheng. Importance of food safety testing under COVID-19 [J]. *Technology Innovation and Application*, 2020, 30: 70-71
- [3] 齐人杰, 刘弘. 食品及接触介质中 SARS-CoV-2 存活的影响因素、风险评估及预防的研究进展[J]. *环境与职业医学*, 2021, 38(8): 915-920
QI Renjie, LIU Hong. Research progress on factors, risk assessment, and prevention strategies associated with SARS-CoV-2 survival in food and media [J]. *Journal of Environmental and Occupational Medicine*, 2021, 38(8): 915-920
- [4] 贾海先, 赵耀. 新冠肺炎通过冷链食品传播的风险研判研究进展[J]. *中国卫生监督杂志*, 2021, 28(4): 310-315
JIA Haixian, ZHAO Yao. Research progress on risk assessment of COVID-19 transmission through cold chain food [J]. *Chinese Journal of Health Inspection*, 2021, 28(4): 310-315
- [5] 张艺兵, 吴伟, 王燕, 等. 基于危害分析与关键控制点原理的进出口冷链食品生产加工企业新型冠状病毒肺炎疫情防控应用研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2021, 33(1): 40-43
ZHANG Yibing, WU Wei, WANG Yan, et al. Study on epidemic prevention and control of COVID-19 in import and export cold chain food production and processing enterprises which based on hazard analysis critical control point principle [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2021, 33(1): 40-43
- [6] 郭美月, 胡媛, 徐露, 等. 2020 年湖北省襄阳市 601 份冷冻食品新冠肺炎病毒检测结果分析[J]. *病毒学报*, 2021, 37(2): 288-291
GUO Meiyue, HU Yuan, XU Lu, et al. The 601 frozen foods in Xiangyang city, Hubei province analysis of detection results of inflammatory virus in 2020 [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2021, 37(2): 288-291
- [7] 张玮珊, 胡新玲, 律娜, 等. 新型冠状病毒对冷链运输食品质量安全的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(17): 6735-6742
ZHANG Weishan, HU Xinling, LV Na, et al. Influence of SARS-CoV-2 on the quality and safety of cold chain transportation food [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(17): 6735-6742
- [8] 于凡, 沈玲羽, 田祎, 等. 进口冷链水产品新型冠状病毒污染传播探讨[J]. *中华流行病学杂志*, 2021, 42(6): 992-1001
YU Fan, SHEN Lingyu, TIAN Yi, et al. Exploration on contamination and transmission of SARS-CoV-2 in imported cold chain aquatic products [J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2021, 42(6): 992-1001
- [9] T/CAQI 159-2020. 食品及食品包装表面中新型冠状病毒采样与实时荧光 RT-PCR 检测方法[S]
T/CAQI 159-2020. Sampling and Real-time RT-PCR Assay for Detection of SARS-CoV-2 in Food and Food Packaging Surface [S]
- [10] 张友春, 汪睿, 朱永良. 新型冠状病毒实验室检测方法研究进展[J]. *预防医学*, 2020, 32(4): 361-365
ZHANG Youchun, WANG Rui, ZHU Yongliang. Research progress of laboratory testing methods for SARS-CoV-2 [J]. *Preventive Medicine*, 2020, 32(4): 361-365
- [11] Lin Y, Shanshan W, Xiaowen H, et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform [J]. *Clinical Chemistry*, 2020, 66(7): 975-977
- [12] Yan C, Cui J, Huang L, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop - mediated isothermal amplification assay [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020, 26(6): 773-779
- [13] 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
- [14] 博奥生物集团有限公司. 感染性疾病分子诊断整体解决方案-六项呼吸道病毒核酸检测试剂盒(恒温扩增芯片法) [EB/OL]. [2020-06-07]. <http://www.capitalbiotech.com/product-content.html?id=1668>
Boao biological Group Co., Ltd. Molecular diagnosis of infectious diseases overall solution six respiratory virus nucleic acid detection kit (isothermal amplification chip) [EB/OL]. [2020-06-07]. <http://www.capitalbiotech.com/product-content.html?id=1668>
- [15] Friedman A E, Chambron J C, Sauvage J P, et al. A molecular light switch for DNA: Ru(bpy)₂(dppz)²⁺ [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1990, 112(12): 4960-4962
- [16] Xu Q F, Dong J, Ma X Y, et al. Structurally defined Ru(II) metallointercalators for real-time monitoring of DNA

- amplification reactions [J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(14): 8777-8782
- [17] Guan Y L, Ling L S, Liang N J, et al. Ruthenium(II) complexes with dppz: from molecular photoswitch to biological applications [J]. Dalton Transactions: An International Journal of Inorganic Chemistry, 2016, 45(34): 13261-13276
- [18] 澹台玮,徐秦峰,张文娟,等.羊乳中牛乳成分的可视化环介导等温扩增检测方法[J].陕西科技大学学报,2020,38(1):71-75,80
TANTAI Wei, XU Qinfeng, ZHANG Wenjuan, et al. Establishment of visual loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2020, 38(1): 71-75, 80
- [19] 江再茂,马雪萍,殷竹君,等.单管可视化环介导等温扩增技术快速检测恶性疟原虫[J].现代生物医学进展,2014,14(26): 5014-5018
JIANG Zaimao, MA Xueping, YIN Zhujun, et al. A closed-tube isothermal amplification method for highly sensitive and visualized detection of *Plasmodium falciparum* [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(26): 5014-5018
- [20] 李博,邹秉杰,马雪萍,等.用于新型冠状病毒检测的核酸等温扩增技术研究进展[J].病毒学报,2021,37(1):191-200
LI Bo, ZOU Bingjie, MA Xueping, et al. Research progress of nucleic acid isothermal amplification technology for new coronavirus detection [J]. Chinese Journal of Virology, 2021, 37(1): 191-200
- [21] Li B F, Zhou X M, Liu H X, et al. Simultaneous detection of antibiotic resistance genes on paper-based chip using Ru(phen)₂dppz²⁺ turn-on fluorescence probe [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(5): 4494-4501
- [22] Zhang M Y, Ye J, He J S, et al. Visual detection for nucleic acid-based techniques as potential on-site detection methods. A review [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1099: 1-15
- [23] Ling L S, He Z K, Zeng Y E, et al. Spectral studies on the interaction of DNA and Ru(bipy)₂(dppz)²⁺ [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 1999, 55(A): 1297-1302
- [24] Ling L S, Song G W, He Z K, et al. A novel method to determine DNA by use of molecular "light switch" of Ru(phen)₂(dppz)²⁺ [J]. Microchemical Journal, 1999, 63: 356-364
- [25] Ling L S, He Z K, Song G W, et al. Determination of DNA by use of the molecular "light switch" complex of Ru(bipy)₂(dppz)²⁺ [J]. Microchimica Acta, 2000, 134: 57-62
- [26] Ling L S, He Z K, Song G W, et al. A novel method for determination of DNA by use of molecular "light switch" complex of Ru(Bipy)₂(Dppx)²⁺ [J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 403: 209-217
- [27] Ling L S, He Z K, Song G W, et al. High sensitive determination of DNA by use of molecular "light switch" complex of Ru(phen)₂(dppx)²⁺ [J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 436: 207-214
- [28] 澹台玮.乳及乳制品中牛羊源性成分的现场 LAMP 检测方法研究[D].西安:陕西科技大学,2020
TANTAI Wei. Study on LAMP method for on-site detection of bovine and goat derived components in milk and dairy products [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2020

(上接第 295 页)

- [25] 张建梅,罗艳艳,罗海青,等.超微粉碎对黑蒜粉末物理性质及抗氧化能力的影响[J].食品工业科技,2018,39(10):51-57
ZHANG Jianmei, LUO Yanyan, LUO Haiqing, et al. Effects of ultrafine grinding on physical properties and antioxidant capacity of black garlic powder [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(10): 51-57
- [26] 唐明明,孙汉巨,赵金龙,等.超微粉碎对水芹粉末理化性质及抗氧化活性的影响[J].现代食品科技,2019,35(7):55-65
TANG Mingming, SUN Hanju, ZHAO Jinlong, et al. Effect of ultrafine grinding on physicochemical properties and antioxidant activity of water cunnery powder [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(7): 55-65
- [27] 王学瑛,高智翔,王子迎,等.不同品种蓝莓果实品质指标比较和综合评价[J].合肥师范学院学报,2020,38(3):11-15
WANG Xueying, GAO Zhixiang, WANG Ziyang, et al. Comparison and comprehensive evaluation of fruit quality indexes of different blueberry varieties [J]. Journal of Hefei Normal University, 2020, 38(3): 11-15