

环介导等温扩增技术在食品安全领域的应用进展

赵雨佳^{1*}, 梁亮¹, 范培蕾¹, 吕庆斌¹, 李冉¹, 刘然¹, 赵海波¹, 曲直²

(1.北京市计量检测科学研究院, 北京 100029)(2.北京大学人民医院, 北京 100044)

摘要: 食品安全不仅关乎人民身体健康, 同时影响地区经济发展。高效、便捷的检测方法是实现风险评估和安全监管的重要手段。传统的检测技术操作繁琐、耗时颇长, 难以满足市场上快速检测的需求。环介导等温扩增技术具有速度快、灵敏度高、特异性强和成本低廉等优点, 显现出巨大的商业应用潜力。该文综述环介导等温扩增技术的原理、分类、产物检测方法, 并重点分析基于颜色变化的比色法在环介导等温扩增技术中的应用, 结合近5年来该技术在食品安全检测领域的应用进展, 以期开发快速、现场、低廉的食品安全检测方法提供参考。

关键词: 环介导等温扩增; 食源性致病菌; 食品安全; 快检方法

文章编号: 1673-9078(2025)03-387-400

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.1560

Progress in Application of Loop-mediated Isothermal Amplification in Food Safety Inspection

ZHAO Yujia^{1*}, LIANG Liang¹, FAN Peilei¹, LYU Qingbin¹, LI Ran¹, LIU Ran¹, ZHAO Haibo¹, QU Zhi²

(1.Beijing Institute of Metrology, Beijing 100029, China)

(2.Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

Abstract: Food safety issues impact individual physical health and regional economic development. Efficient and convenient detection methods are key to achieving relevant risk assessment and safety regulation. Traditional detection techniques are cumbersome and time-consuming, and fail to meet the market demand for rapid detection. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a promising candidate method for commercial applications in food safety inspection owing to its high speed, high sensitivity, strong specificity, and low cost. This study reviews the principle, classification, and product detection methods of LAMP, with a focus on analyzing the application of colorimetry in LAMP, and summarizes progress made in food safety inspection in the past five years, aiming to provide a reference for developing fast, on-site, low-cost methods for food safety inspection.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; foodborne pathogen; food safety; rapid detection method

引文格式:

赵雨佳,梁亮,范培蕾,等.环介导等温扩增技术在食品安全领域的应用进展[J].现代食品科技,2025,41(3):387-400.

ZHAO Yujia, LIANG Liang, FAN Peilei, et al. Progress in application of loop-mediated isothermal amplification in food safety inspection [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 387-400.

收稿日期: 2023-12-27

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF0606105); 国家市场监督管理总局科技计划项目(2022MK002); 中国博士后面上基金(2023M730312)

作者简介: 赵雨佳(1989-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 生物计量, E-mail: zhaoyj@bjjl.cn

“民以食为天, 食以安为先”。食品安全不仅关系人民的身体健康和生命安全, 同时对国家的经济、贸易和工业产生重要影响, 是备受关注的重点民生问题^[1]。食品中的生物类危害因素有病原微生物、过敏原(异种蛋白)、转基因作物、生物掺假和亚致死型细菌等^[2]。高效的检测方法是防止有害

食品上市流通的重要手段,是保障安全监管的重要环节。目前,食品中生物危害因素的检测方法主要有微生物培养鉴定、高效液相色谱、表面增强拉曼光谱和酶联免疫吸附等,尽管这些方法准确、灵敏,但耗时长且设备昂贵,难以满足现场快速的检测需求。我国食品的生产加工和上市流通具有量大面广、经营分散的特点,因此发展快速、高效、低廉且便携的检测方法更适合我国国情,具有广阔的推广前景。

环介导等温扩增(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)是一种用于检测靶标 DNA 和 RNA 的恒温扩增核酸检测技术,能实现对痕量核酸的大量扩增,扩增效率可达 $10^9 \sim 10^{10}$,且对抑制物的耐受程度较高,可以简化核酸提取过程^[3]。因此,该技术自 2000 年首次发布就备受关注。LAMP 被广泛应用于食品安全领域,包括检测食品生物危害因子^[4,5](细菌、病毒、霉菌、寄生虫)、肉制品掺假^[6,7]、食物过敏原^[8,9]和食品新鲜程度^[10,11]等。本文简要介绍 LAMP 的设计原理和特点,重点讨论 LAMP 产物的可视化检测手段。通过分析近五年来 LAMP 在食品安全检测中的应用,形成检测流程图(图 1),以期为开发快速现场的食品安全检测方法提供参考。

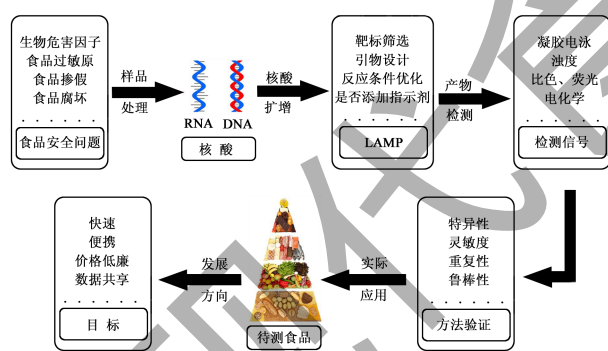


图 1 食品安全的 LAMP 检测流程

Fig.1 The procedure of food safe detection by LAMP

1 LAMP概述

LAMP 是日本学者 Tsugunori 等^[3]于 2000 年首次提出的一种核酸等温扩增技术,基于特殊的引物设计和具有链置换活性的 DNA 聚合酶,实现在恒温条件下快速连续扩增模板。其反应过程可以分为哑铃状模板构造和循环扩增。该技术针对靶序列的 6 个区域进行 4 条特殊引物的设计,使其产生哑铃状结构,进而高效扩增,扩增过程如图 2 所示。

LAMP 具有诸多优势^[3]: (1) 特异性强: 基于特殊的引物设计, 4 条引物识别靶序列上 6 个目标片段, 具有很强的特异性; (2) 灵敏度高: 反应呈指数放大, 扩增效率可达 $10^9 \sim 10^{10}$, 是常规 PCR 的 10~100 倍; (3) 速度快: 相较于 PCR 的三重温度循环, LAMP 扩增不需要反复的升降温过程, 通常在 1 h 内完成, 如果加入成环引物 (FL、BL) 可以进一步缩短扩增时间; (4) 耐受扩增抑制物: 某些样本通过简单的前处理即可作为模板使用, 省略繁琐的核酸提取环节; (5) 对设备的需求度低: 反应通常在 60~65 °C 恒温进行, 不需要精密控温的 PCR 仪, 水浴锅或恒温槽即可完成, 小型便携适合于现场检测; (6) 利于基层推广: 因为不需要精密仪器, 简化操作流程, 与 PCR 相比, LAMP 对人员的专业程度要求较低, 更利于在基层推广。上述优势促使 LAMP 成为应用最广泛的核酸等温扩增方法, 尤其适用于伴随诊断 (Point of Care Testing, POCT) 平台, 便于现场检测。目前, 已有日本荣研 Loopamp® MTBC Detection Kit (国械注进 20143405184)、百奥莱博非洲猪瘟 LAMP 检测试剂盒、普瑞邦食品过敏原 LAMP 试剂盒、翌圣 RT-LAMP Dye Assay Kit (UDG plus) 等多种 LAMP 检测试剂实现商业化。LAMP 商业化的进一步拓展, 会集中在优化样品前处理环节、提高检测灵敏度、通量、数据共享和标准化等方面。随着技术的更新发展, 常规 LAMP 逐步向反转录 LAMP、多重 LAMP、数字 LAMP、一步 LAMP 等更高通量、高精度、简化操作的方向发展。

1.1 常规 LAMP

常规 LAMP 的反应体系包括: 模板 (DNA)、具有链置换活性的 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase)、外引物 (F3、B3)、内引物 (FIP、BIP)、 Mg^{2+} 、dNTP 和缓冲液。其中, 引物是保证反应特异性的关键。设计引物时, 解链温度、末端稳定性、GC 含量以及二级结构等因素应重点考虑。可以通过在线软件 Primer Explorer (<http://primerexplorer.jp/e/>) 进行设计。在保证引物特异性的基础上, 通过调整体系中各组分的浓度以及反应温度和时间对所构建方法的扩增效率进行优化。LAMP 扩增产物是一系列不同大小的茎环状结构和花椰菜样多环结构的 DNA 复合物, 可通过凝胶电泳、浊度、比色、荧光等方式对产物进行检测。

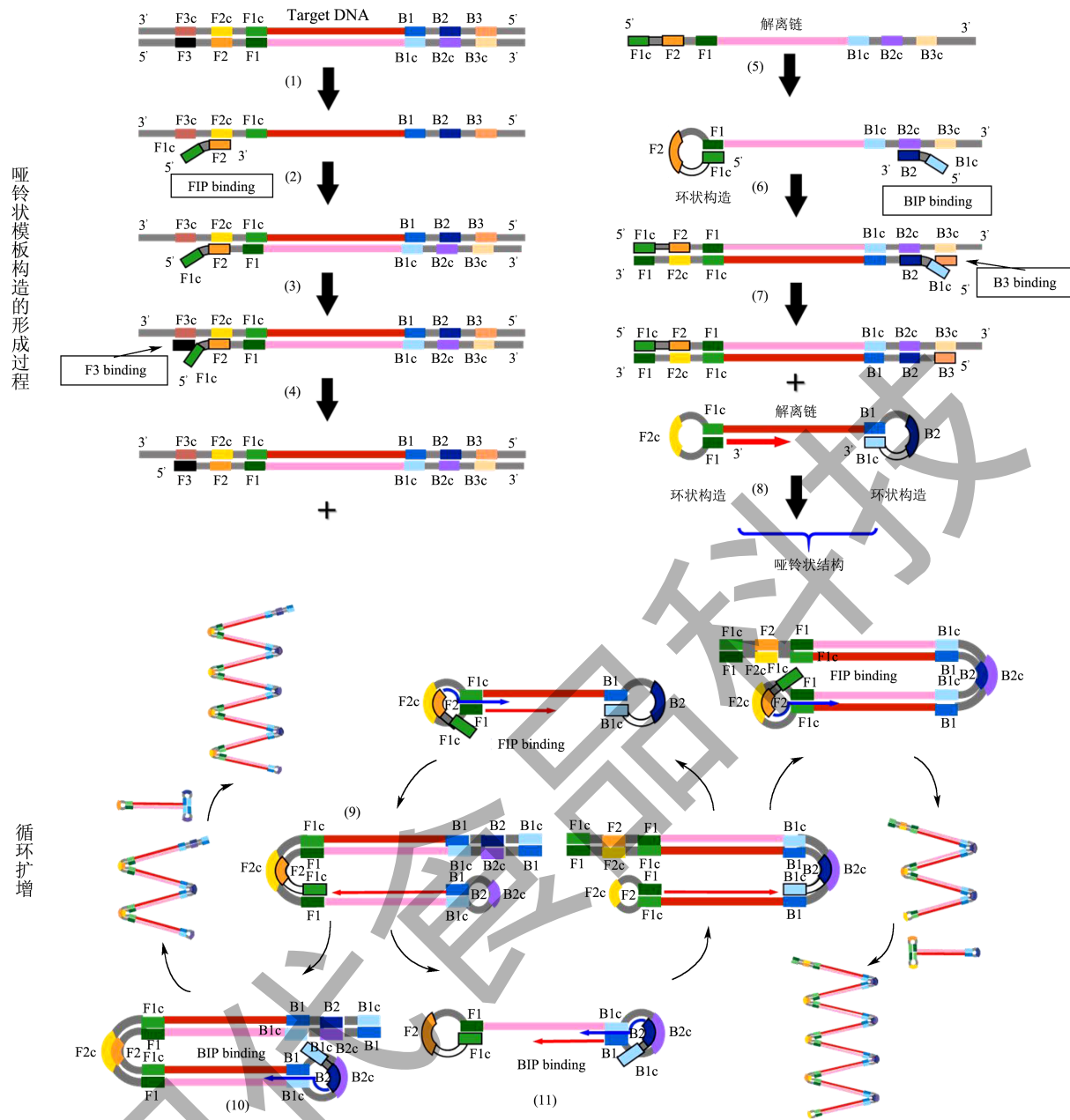


图 2 LAMP 扩增
Fig.2 LAMP amplification

目前，常规 LAMP 已被用于检测多种病原体，包括肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*)^[12]、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)^[13]、志贺菌 (*Shigella*)^[14] 等食源性细菌，稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)^[15]、鞘腐菌 (*Sarocladium oryzae*)^[15]、隐袭腐霉 (*Pythium insidiosum*)^[16] 等植物真菌，谷斑皮蠹 (*Trogoderma granarium*)^[17]、松针瘿蚊 (*Thecodiplosis japonensis*)^[18] 等导致植物疫病的昆虫和牛环形泰勒虫 (*Theileria annulata*)^[19]、毛滴虫 (*Trichomonas tenax*)^[20]、粪圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*)^[21] 等导致动物疫病的原

虫。此外，常规 LAMP 还可用于对花生、芝麻、大豆等食物过敏原的检测^[22]。常规 LAMP 操作简单，应用广泛，具有很好的普适性，缺点是只能靶向 DNA，无法对 RNA 进行检测。

1.2 反转录 LAMP

反转录 LAMP (Reverse Transcription LAMP, RT-LAMP) 是一种通过在 LAMP 反应体系中加入反转录酶，实现 RNA 检测的技术^[23]。与 RT-PCR 一样，RT-LAMP 利用反转录酶将 RNA 合成 cDNA，再利用 DNA 聚合酶进行扩增。恒温孵育条件下，

可以一步完成反转录和扩增,有利于快速检测 RNA 病毒。

目前,RT-LAMP 已被用于检测 II 型小樱桃病毒 (*Little Cherry Virus 2*)^[24]、大麦黄花叶病毒 (*Barley Yellow Mosaic Virus*)^[25]、番茄条纹病毒 (*Tomato Chlorotic Spot Virus*)^[26]、玉米黄花叶病毒 (*Maize Yellow Mosaic Virus*)^[27]、苹果花叶病毒 (*Apple Mosaic Virus*) 和李属坏死斑病毒 (*Prunus Necrotic Ringspot Virus*)^[28] 等严重影响经济作物产量的植物病毒,以及猪流感病毒 (*Swine Influenza Virus*)^[29]、罗湖病病毒 (*Tilapia Lake Virus*)^[30] 和禽流感病毒 (*Avian Influenza Virus*)^[31] 等影响养殖业的动物病毒。

1.3 多重 LAMP

多重 LAMP (Multiplex LAMP, mLAMP) 是一种能够同时检测多个靶标序列的 LAMP 方法,针对每个靶标分别设计引物,再通过对实验条件和反应体系的优化,分别鉴定扩增产物,最终筛选出最优的引物组合,实现对多个靶标的同时检测,该方法能显著提高检测的特异性和通量。

Ayaka 等^[32]开发了一种能够同时检测造成疫霉属及四种主要疫霉菌 (*P. ramorum*、*P. lateralis*、*P. kernoviae* 和 *P. nicotianae*) 的 mLAMP 方法。该方法以植物 *COXI* 基因作为内部质控,避免因酶失活或植物组织中扩增抑制剂导致的阴性结果。通过优化引物序列和浓度比例,检测灵敏度能达到 1 pg~100 fg 的病原菌 DNA。该方法从样品采集到出结果总计 120 min,是一种快速、准确的检测植物疫霉菌的方法,能有效防治严重的林木病害。

Dong 等^[33]基于 HFman 探针开发了一种 mLAMP 方法,能实现单管内对 SARS-CoV-2 病毒的 *ORF* 和 *E* 基因以及人的管家基因 β -actin 进行实时检测。该方法巧妙的利用高保真 DNA 聚合酶对 HFman 探针的切割作用,实现荧光信号的特异性放大。在 LAMP 初始阶段,引物与目标序列结合,启动 LAMP 过程。哑铃结构形成后,HFman 探针与哑铃结构的环区结合。当 HFman 探针特异性杂交到没有或与环区不匹配的序列时,被高保真 DNA 聚合酶识别切割,释放荧光信号,并暴露游离的 3'-OH 供 Bst DNA 聚合酶进一步扩增。杂交的内引物 (FIP、BIP)、环引物 (LF、LB) 和 HFman 探针 (与环引物序列相同) 通过 Bst DNA 聚合酶启动 DNA 延伸。在延伸过程中,随着荧光团从 HFman

探针中释放出来,荧光信号呈指数增长。与“金标准”RT-PCR 相比,该方法对鼻咽样本中提取的 RNA 具有良好的临床性能 (灵敏度 94.5%, 特异性 100%, $n=190$), 并且能够检测包含至少 α 和 δ 变异的序列。

针对日益严峻的碳青霉烯耐药革兰氏阴性菌问题,Zhong 等^[34]开发了一种 mLAMP 方法能快速检测多粘菌素耐药基因 *mcr1*~*mcr5*。该方法能够实现对 *mcr-1*、*mcr-3* 和 *mcr-4* 的三重检测和 *mcr-2* 和 *mcr-5* 的双重检测方法。

1.4 数字 LAMP

数字定量是一种精确的绝对定量法,其灵敏度在分子水平^[35]。数字 LAMP (Digital LAMP, dLAMP) 是类比数字 PCR (Digital PCR, dPCR) 提出的概念,通过对反应体系的有限稀释,最终使微滴中至多包含 1 个模板分子,基于荧光信号确定阳性和阴性微滴,结合泊松分布和夏皮罗-威尔克法检验测定数据是否符合正态分布,最终实现对目标核酸的绝对数量^[36]。常规 dLAMP 的操作步骤如下:

(1) 将核酸样品与 LAMP 试剂充分混合;(2) 对混合好的 LAMP 反应体系进行分区或微滴化;(3) 加热反应;(4) 结束反应并扫描信号;(5) 计算阳性信号的比例,分析核酸的绝对数量。

与 dPCR 相比,dLAMP 对抑制剂耐受程度更高,即使试剂中含有腐植酸,dLAMP 也可以准确进行。这种对抑制剂的高度耐受使 dLAMP 能够扩增粗提取的核酸,而 dPCR 则很难。此外,dLAMP 可以在恒温下完成,不需要昂贵的热循环仪器,降低了反应成本。这些优点使 dLAMP 具有很大的潜力来解决现有 dPCR 的局限,并应用于食品中病原微生物的检测等领域。

Tao 等^[37]建立了一种直接检测牛奶中牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 的 dLAMP 方法,通过自动提取 DNA 和界面乳化技术,实现 2 h 内从牛奶到核酸的检测,灵敏度达到 14 CFU/mL,该方法能极大缩短鲜牛奶的检测周期,保障食品的快速流转。Daniel 等^[38]开发了一种对病毒载量进行绝对定量的 dLAMP 方法。该方法利用摇匀代替微流控泵,降低成本,并设计独特的双高度成像室以实现在一张手机照片中容纳全部样品,替代高分辨率显微镜或激光诱导荧光对液滴的单独成像,使方法更适用于 POCT。Oliveira 等^[39]将微流控技术与 dLAMP 进行整合,实现液滴生成、目标放大和绝对定量的一

体化。采用低成本的激光直接书写技术,在聚苯乙烯片材上构建多层 3D 芯片, dLAMP 直接在芯片上扩增。10 μL 体积的片上扩增,能在 60 min 内,达到 5 copies/ μL 的检测限,该技术被用于癌症生物标志物的 *c-MYC* 的定量。

1.5 一步 LAMP

一步 LAMP 是指简化甚至省略核酸提取步骤,以核酸粗提物作为模板,直接进行 LAMP 扩增的方法。由于省略了核酸提取过程,该方法能极大的节省时间,适用于快速检测等应用场景。

Zhang 等^[40]开发了基于免疫捕获简化核酸提取,实现裸眼检测沙门氏菌的一步 LAMP 方法。以沙门氏菌为抗原制备单克隆抗体,将高亲和力的单抗包被在免疫磁珠表面以捕获沙门氏菌,并将富集产物直接用于 LAMP 扩增,该方法在人工污染的水和牛奶中检测限达到 5 CFU/mL。单核苷酸多态性 (SNP) 是与许多生理和病理表型相关的分子标记。现场 SNP 检测的发展面临仪器昂贵和过程繁琐的挑战。Ding 等^[41]设计了一种基于探针增强的 SNP 分型检测,该方法将寡核苷酸探针与一步 LAMP 结合,通过分析扩增效率的巨大差异实现 SNP 区分,将该方法被应用于 CYP2C19*2 和 MDR1 C3435T 基因分型的药物基因组学检测,灵敏度达到 1 000 copies。缺失突变是癌症发生发展的重要因素,开发一种直接测定缺失突变的方法,对于临床实践具有重要意义。Liu 等^[42]利用 LAMP 对抑制物耐受性强的特点,建立了一种快速、灵敏的缺失突变检测方法,可在 30 min 内识别 0.1% 的目标变异,对于快速识别突变靶点具有重要意义。

2 LAMP 产物的检测方法

LAMP 的扩增产物有多种信号输出方式,包括电泳、浊度、比色、荧光、化学发光、电化学、表面增强拉曼色谱以及侧流层析试纸等。

2.1 凝胶电泳法

由于 LAMP 扩增产物是一系列不同大小的茎环状结构和花椰菜样多环结构的 DNA 复合物,因此其凝胶电泳图像呈现独特的降落伞状模式,具有多条明亮程度不一的电泳带。该方法已被用于检测海洋分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*)^[43], 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[44], 耐甲氧西林金黄色葡萄球

菌 (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*)^[45], 溶组织芽孢杆菌 (*Entamoeba histolytica*)^[46], 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)^[47] 和产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)^[48] 等多种病原体。然而通过凝胶电泳法检测 LAMP 产物,需要从反应管中取出部分产物进行电泳,该环节容易造成气溶胶扩散,污染环境,进而导致假阳性结果。其次,凝胶电泳使用溴化乙锭对 DNA 进行染色,而溴化乙锭有毒,会对操作人员造成危害。最后,凝胶电泳需要使用具有稳定电源供应的电泳仪,难以满足野外现场检测的需求。上述原因限制了凝胶电泳法在构建 LAMP 快检技术方面的应用。目前,凝胶电泳法的主要应用场景是在实验室对建立的 LAMP 技术进行性能验证。

2.2 浊度法

焦磷酸盐离子作为 DNA 聚合酶的副产物与镁离子在缓冲液中反应生成焦磷酸镁 ($\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$),由于 LAMP 产生大量的 DNA,焦磷酸盐离子浓度超过沉淀阈值,导致以扩增子浓度依赖的方式形成肉眼可见的焦磷酸镁白色沉淀^[49]。可以通过肉眼观察反应体系的浊度变化对其进行终点判读,也可通过日本荣研公司的浊度仪 LA-200、LA-320、LA-500, 650 nm 光照下,每 6 s 采集一次信号,绘制实时浊度曲线对扩增过程进行监测。该方法已被用于检测鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)^[50], 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)^[51], 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)^[52], 禽腺病毒 (*Fowl Adenovirus*)^[53] 和人乳头瘤病毒 (*Human Papillomavirus*)^[54] 等多种病原体。

浊度信号不需要额外添加指示剂 (颜色、荧光),不会抑制 LAMP 扩增效率,也不需要产物进行开盖处理,不会污染环境。反应结束后,对产物短暂离心,即可通过肉眼观察是否具有白色沉淀来判断结果,具有便宜、灵活、易操作等优点,适用于条件有限地区的现场检测。但是浊度信号来自 DNA 扩增的副产物,而非引物的特异性扩增,因此非特异性扩增或引物二聚体也能诱导焦磷酸镁沉淀,造成假阳性。所以,基于浊度的 LAMP 产物检测假阳性水平较高,需要通过引物设计、模板提纯等方式提高反应的特异性。此外,浊度法仅在短时间内稳定且存在主观误差和检出限高的缺点,限制了其在 LAMP 产物检测中的应用。

表 1 LAMP常用染料
Table 1 Dye used in LAMP

染料名称	白光下颜色变化	UV 下有无荧光	辅助剂	原理
钙黄绿素	橙色—黄绿色	有	MnCl ₂	金属离子指示剂
HNB	紫罗兰—天蓝色	无	无	金属离子指示剂
SYBR Green I、EvaGreen、SYTO	橙色—黄绿色	有	无	嵌合型荧光染料 与 dsDNA 结合发荧光
酚红、甲酚红	红色—黄色	无	无	pH 指示剂
中性红	橙色—粉色	无	无	pH 指示剂
甲酚紫	紫色—黄色	无	无	pH 指示剂
黄连素	无	有	无	自发型荧光染料 与 dsDNA 结合发荧光
TVR	无色—亮绿色	无	Tris-EDTA	/
VMD	浅灰色—深蓝色	有	MnCl ₂	混合钙黄绿素和 HNB

2.3 比色法

颜色变化是非常直观的信号，可以通过肉眼直接观察，无需特殊仪器，适用于现场检测。根据染料是否抑制反应，可分别在反应前、后添加。但反应后开盖添加染料，容易产生气溶胶，导致之后的检测假阳性。染料会对反应效率及结果判断造成影响。因此根据染料的作用特点进行合理的选择及应用，对 LAMP 结果的正确性和可靠性具有重要意义。染料的种类很多，应用较多的包括：钙黄绿素、羟基萘酚蓝（Hydroxy Naphthol Blue, HNB）、SYBR Green、Eva Green、SYTO、pH 指示剂、黄连素、TVR、和 VMD 等多种染料（表 1）。

2.3.1 钙黄绿素

钙黄绿素是一种自发荧光染料，与 Mg²⁺ 结合发出肉眼可见的黄绿色荧光，从橙黄色变为黄绿色，其反应原理如图 3 所示。使用钙黄绿素时体系中必须添加 Mn²⁺，钙黄绿素作为螯合剂会跟 Mn²⁺ 结合处于淬灭状态，不发出荧光；随着 LAMP 反应过程中产生的焦磷酸根与 Mn²⁺ 结合生成焦磷酸锰沉淀，解除淬灭状态；钙黄绿素与 Mg²⁺ 结合发出黄绿色荧光。钙黄绿素已被用于检测大肠杆菌 O157^[55]、结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）^[56]、核盘菌（*Sclerotinia sclerotiorum*）^[57]、鸡传染性喉气管炎病毒（*Avian Infectious Laryngotracheitis Virus*）^[58] 和克氏锥虫（*Trypanosoma cruzi*）^[59] 等多种病原体。钙黄绿素的使用对体系中 Mg²⁺ 浓度要求很高，较低的 Mg²⁺ 浓度会抑制 DNA 聚合酶活性，导致 LAMP 扩增效率降低；过高的 Mg²⁺ 浓度会出现非特异性扩

增，导致假阳性；所以体系中 Mg²⁺ 离子浓度需要优化。此外，钙黄绿素会抑制 LAMP 反应，通过和 dsDNA 的相互作用降低反应灵敏度。

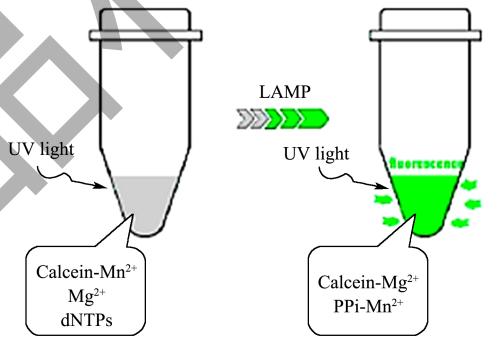


图 3 钙黄绿素检测 LAMP 产物的原理

Fig.3 The principle of calcein detect LAMP production

2.3.2 HNB

HNB 是一种金属离子指示剂，反应原理如图 4 所示。HNB 与 LAMP 反应体系中的 Mg²⁺ 结合呈紫罗兰色，随着扩增进行，体系中的 Mg²⁺ 生成焦磷酸镁沉淀，失去 Mg²⁺ 的 HNB 呈现天蓝色^[60]。HNB 已被用于检测猫冠状病毒（*Feline Coronavirus*）^[61]，犬副流感病毒 5（*Canine Parainfluenza Virus 5*）^[62]，牡蛎疱疹病毒 1（*Ostreid Herpesvirus 1*）^[63]，沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）^[64] 和钩端螺旋体（*Leptospira*）^[65] 等多种病原体。

HNB 在 LAMP 应用中有几点限制，（1）高浓度的 HNB 对 LAMP 反应有抑制作用，反应后加入，开盖过程容易产生气溶胶，污染实验室环境；（2）研究表明，HNB 终浓度不超过 120 μmol/L 时对扩增没有抑制^[60]，可在反应前加入，但低浓度 HNB

颜色区分不明显,难以通过肉眼观察判定;(3) HNB 不具有荧光,不能像钙黄绿素一样用荧光变化作为辅助判定;(4) HNB 不稳定,不易保存,需要现用现配,不便于使用。

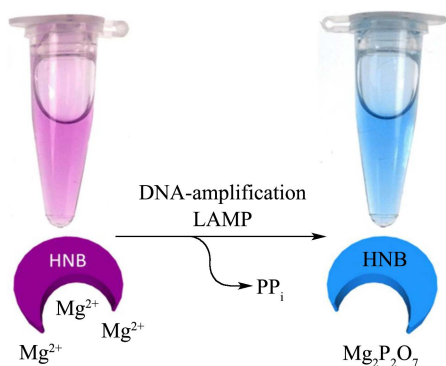


图4 羟基萘酚蓝检测 LAMP 产物的原理

Fig.4 The principle of HNB detect LAMP production

2.3.3 SYBR Green I

SYBR Green I 也常用于 LAMP 产物的测定,其反应原理如图 5 所示。将 SYBR Green I 加入到含有 LAMP 产品的反应管中,可见颜色由红橙色变为黄绿色,在紫外光下呈绿色荧光。SYBR Green I 已被用于检测诺氏疟原虫 (*Knowlesi Malaria*)^[66]、猪细小病毒 (*Porcine Parvovirus*)^[67]、虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*)^[68] 和 犬 肝 虫 (*Hepatozoon canis*)^[69] 等多种病原体。

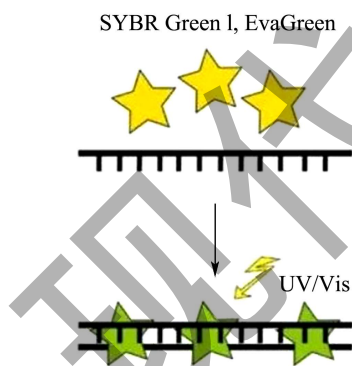


图5 SYBR Green I 检测 LAMP 产物的原理

Fig.5 The principle of SYBR Green I detect LAMP production

SYBR Green I 是一种嵌合荧光染料,会渗入 DNA 双链的小沟,与 dsDNA 结合后,荧光信号会增强 800~1 000 倍。与自发型以荧光染料钙黄绿素相比,SYBR Green I 的检测灵敏度高 10 倍。但嵌合荧光染料的使用具有两面性,反应前加入,会因其与对 dsDNA 分子的高亲和力而阻碍 Bst DNA 聚合酶的链置换活性,反应后开盖加入,存在气溶胶

污染实验室环境,进而导致假阳性的问题。一些研究通过将 SYBR Green I 内置于反应管盖上,待反应结束再将其与反应体系混匀,以解决上述问题。但实际操作中,染料会因高温而变干、凝固,所以要控制反应温度,尤其是 DNA 变性温度。此外,SYBR Green I 是与 dsDNA 结合并不是与特异性的扩增产物结合,引物二聚体或非特异性扩增产物也能与之结合并产生荧光,会造成假阳性的结果。因此,使用 SYBR Green I 对结果判读时,需要对建立的 LAMP 方法进行严格的特异性验证。除了 SYBR Green I, EvaGreen[®]^[70]、SYTO-9^[71] 和 SYTO-82^[72] 等荧光嵌合染料也被用于 LAMP 产物的显色检测。其中,SYTO-82 和 SYTO9 对反应的抑制性较小,检测灵敏度高^[72]。

2.3.4 pH 指示剂

LAMP 反应在合成 DNA 的过程中,释放的副产物包括 $P_2O_7^{4-}$ 和 H^+ , 因此反应液的 pH 值会随着反应进行而产生变化,由初始碱性变为酸性。可以通过 pH 敏感指示剂作为染料检测 DNA 扩增,实现肉眼对扩增结果可视化的判断,区分阳性和阴性结果。常用的 pH 敏感指示剂包括酚红 (Phenol Red)、甲酚红 (Cresol Red)、中性红 (Neutral Red) 和甲酚紫 (Cresol Purple)。使用 pH 指示剂作为染料时,体系应保持低浓度 Tris, pH 值在 8.8 以上, pH 指示剂浓度在 50~100 $\mu\text{mol/L}$ 。

目前, pH 指示剂作为染料已被用于 SRAS-CoV-2^[73]、疟原虫^[74]、牛环形泰勒虫 (*Theileria annulata*)^[75] 和 鸭 乙 型 肝 炎 病 毒 (*Duck Hepatitis B Virus*)^[76] 等多种病原体的终点可视化检测。

2.3.5 其他染料

黄连素是一种小藜碱,能特异性的与 dsDNA 结合,UV 下发出明亮的荧光。2015 年, Jens 等^[77]首次利用黄连素作为 LAMP 扩增产物的染料,检测马铃薯纺锤块茎类病毒 (*Potato Spindle Tuber Viroid*)。TVR (Tris-EDTA Visual Reagent, TVR) 是 JXD 公司开发的一系列 Tris-EDTA 指示剂,扩增系统中一旦出现 dsDNA,染料基团就能与之结合,呈现亮绿色。2019 年, Yuan 等^[53]利用 TVR 染料实现对禽腺病毒的 LAMP 终点可视化检测。将两种不同颜色的染料进行混合,提高检测效率也是一种有效的可视化策略。2019 年, Pang 等^[78]开发了一种 LAMP 终点检测视觉混合染料 VMD,成分为钙黄绿素和 HNB,这两种成分在 VMD 中的最佳终浓度

为 25 $\mu\text{mol/L}$ 、300 $\mu\text{mol/L}$ 。由于在 LAMP 反应过程中形成了 HNB Mn^{2+} ，VMD 表现出优越的视觉性能，在自然光下从浅灰色 (-) 变为深蓝色 (+)。与传统的单一钙黄绿素或 HNB 染料相比，VMD 的弱阳性结果为紫色，使其更容易被肉眼区分。视觉灵敏度可达 20.9 copies/ μL ，与基于荧光的灵敏度相当。

2.4 荧光法

荧光作为输出信号包括可视化荧光染料和荧光探针，本节专指荧光探针。传统 LAMP 难以实现实时监控和多重检测，且依赖浊度、染料作为输出信号是一种非特异性的方式，容易导致假阳性结果。基于探针的 LAMP 检测方法具有更强的特异性，能满足实时监控和单管多重检测的需要。

2011 年，Kubota 等^[79]开发了最早的基于荧光探针的 LAMP 方法，该方法由部分互补的荧光探针和猝灭探针组成。在荧光探针的 5' 端标记荧光基团并与环引物 (LF 或 LB) 设计在一起。在淬灭探针的 3' 端标记猝灭基团。在没有目标 DNA 的情况下，淬灭探针和荧光探针 (非环区) 互补，荧光因杂交而猝灭。在目标 DNA 存在的情况下，LAMP 被启动。新合成的 DNA 链取代淬灭探针，释放荧光信号。2012 年，Nathan 等^[80]提出 DARQ 探针。探针的设计方法是在 FIP 的 5' 端标记一个淬灭基团，并添加一个额外的 3' 荧光基团标记探针，与 FIP 的 F1c 互补。在没有目标 DNA 的情况下，双链线性 DNA 探针不产生荧光信号。在 LAMP 扩增过程中，新合成的 DNA 链取代 3' 荧光基团标记的探针，释放荧光信号。

除了部分互补的探针设计，酶介导识别和切割探针以释放荧光基团的策略也被应用于 LAMP。自 2021 年，三种高保真 DNA 聚合酶介导的实时 LAMP 方法被用于 SARS-CoV-2 的检测^[33,81,82]。在一条探针的两端分别标记荧光基团和猝灭基团。引入少量高保真 DNA 聚合酶以实现实时监控。在 LAMP 扩增过程中，探针特异性结合在哑铃结构的环区，高保真 DNA 聚合酶识别并切割用荧光基团标记的错配碱基，释放荧光信号。去除 3' 标记的碱基后，探针暴露一个 3'-OH，进而作为引物使 Bst DNA 聚合酶启动新的 DNA 合成。2021 年，TaqMan-LAMP 被开发用于 H1N1 型副黏病毒的检测^[83]，该方法创新性的使用了 Bst 5.0/5.1 DNA 聚合酶，该酶具有 5'-3' 外切酶活性。选择位于 F1 和 F2 之间的序列作为 TaqMan 探针的靶标，内部引

物 FIP 退火至 F2c，促进 DNA 合成。当 Taqman 探针特异性结合靶标时，Bst 5.0/5.1 DNA 聚合酶可切割 Taqman 探针，释放荧光信号，在指数扩增阶段，TaqMan 探针的持续结合和裂解导致荧光信号的连续产生。

2.5 侧流层析试纸法

在无需仪器的前提下，简便快捷地判读结果是 LAMP 方法改进的重要方向。LAMP-LFD 方法是在侧向流动试纸条 (Lateral Flow Dipstick, LFD) 上锚定特定的抗体，与 LAMP 产物上标记的抗原反应，形成的颜色变化，在 LFD 的检测线和质控线上显示以完成结果判读。该方法选用的抗原通常是荧光素，因此只需用不同的荧光素标记的探针与荧光素标记 LAMP 产物进行杂交，即可摆脱对仪器设备的依赖，同时抗原抗体结合的特异性能在很大程度上降低检测的假阳性。该方法目前已成功用于对细胞质支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*)^[84]、梭状杆菌 (*Clostridium piliforme*)^[85]、弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)^[86] 以及猪流行性腹泻病毒 (*Porcine Epidemic Diarrhea Virus*)^[87] 等病原微生物的检测。

3 LAMP在食品安全领域的应用

检测时间是决定该方法的实用性和推广前景的重要参考，LAMP 方法可以在 1 h 内完成检测且操作简单，不需要特殊仪器，非常符合我国国情，适用于食品生产加工和上市流通环节的现场快速检测。食品安全的危害因素主要包括食源性致病菌、食物过敏、掺假和腐败等。前文已介绍大量 LAMP 在病原体 (病毒、支原体、细菌、真菌、寄生虫) 检测方面的应用，所以本节重点介绍 LAMP 方法在食品过敏性成分、转基因成分、掺杂掺假、新鲜程度和抗生素耐药等方面的应用进展。

3.1 食品中的过敏性成分

食物过敏是对某些食物的异常免疫反应 (牛奶、鸡蛋、花生、大豆、核桃、榛子和芝麻)，它们会引起恶心等过敏症状。例如，花生中导致过敏的蛋白质有 Arah1、Arah2、Arah3 和 Arah6，芝麻中的 2S 蛋白也是一种主要过敏原^[88]。食物过敏是全球性的食品安全问题。目前，尚无完备的食物过敏治疗方案，只能通过避免接触过敏原来减少食物过敏的发生。加工制品是当代快节奏饮食环境下的主体消耗品，过敏性成分能轻易隐匿于各类加工制

品,增加食物过敏的风险。目前,我国采用行业标准 SN/T 4419-2016 出口食品常见过敏原 LAMP 系列检测方法,对食物中过敏性成分进行定性分析,该标准包括 22 个检测对象,分别为开心果、腰果、胡桃、榛果、杏仁、扁桃仁、巴西坚果、澳洲坚果、栗子、大豆、羽扇豆、花生、葵花籽、芝麻、大麦、小麦、荞麦、芥末、胡萝卜、芹菜、牛奶和虾。LAMP 法检测食品中过敏性成分的原理是基于对过敏原特有核酸的检测,判断是否存在过敏性成分。

标准中给出的方法是通过 SYBR Green I 荧光染料进行终点可视化检测,灵敏度较低。2018 年,Sheu 等^[89]开发了一种快速检测加工制品中花生过敏原的 LAMP 方法,该方法的检测限低至 0.1%,且与其他坚果无交叉反应,具有很好的能够用前景。2020 年,Stefanie 等^[9]开发了与测流层析技术结合的 LAMP-LFD 方法,用于对食品中对可造成过敏的大豆成分进行检测。该方法靶向大豆 *ORF160b* 基因,灵敏度能达到每公斤食品中 10 mg 大豆,具有很好的应用和推广价值。Yuan 等^[22]设计了一种微流控芯片,能实现对花生、芝麻等致敏成分的检测,检出限为 0.4 ng/ μ L。Zhang 等^[8]通过混合两种染料,拓宽颜色变化范围和对比度,获得色差为 10 的紫色到绿色,实现对三种重要过敏成分(核桃、榛子和花生)的检测,其灵敏度与实时荧光 LAMP 相当。

3.2 食品中的转基因成分

转基因作物的商业化在全球范围内不断增加,其种植面积从 1996 年的 170 万公顷增加到 2017 年的 1.898 亿公顷^[90]。常见的转基因作物包括玉米、大豆、水稻、油菜、木瓜等。虽然转基因作物的种植面积和种类不断扩大,但其安全性一直备受争议,因此食品中转基因成分的检测颇受重视。基于核酸的 LAMP 技术被广泛应用于转基因大豆、玉米、油菜的检测。Liu 等^[91]将 CRISPR-Cas12a、LAMP 与 FLA 结合,开发了 LAMP-CRISPR-Cas12a-FLA 方法,用于 *CP4-EPSPS* 和 *Cry1Ab/A* 基因的现场检测,检测限达到 100 拷贝,适用于工作站、执法现场和地方检验检疫部门。Patrick 等^[92]以 35S 启动子和 NOS 终止子作为靶标设计引物,通过实时生物发光和荧光检测,实现对转基因玉米的检测。Zhou 等^[93]开发了快速检测转基因甘蔗中 *bar* 基因的 LAMP 法,检出限低至 10 copies,灵敏度比传统 PCR 提高了 10 倍。Reona 等^[94]开发了 LAMP-FLA 方法检测转基因大豆和玉米,采用单链标记杂交技

术对 35S 启动子、NOS 终止子、*Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 基因之间的共同序列及 *ga21* 特异性序列进行检测,检出限为 0.5%,可用于转基因作物的快速筛选。

3.3 食品掺杂掺假

食品掺杂掺假具有十分恶劣的影响,因此发展快速、低成本的检测方法是顺势所趋。陈珍金等^[6]开发基于 LAMP 快速检测鼠的线粒体基因(大鼠环氧化酶基因 KP244683.1 和小鼠的 16S rRNA 基因 KY018919.1)的方法,以 SYTO-9 荧光染料作为 DNA 扩增指示剂,通过优化反应条件,大鼠、小鼠的鼠源性掺假成分检测限分别为 0.1%、0.5%,实现对市售羊肉制品中是否掺杂鼠源性成分的判定。朱凯等^[7]开发 LAMP 快速检测肉制品中猪肉成分的方法,针对猪线粒体色素细胞 *b* 基因设计引物,以 4-(2-吡啶偶氮)-间苯二酚钠盐为指示剂,能准确检测出常见肉类中猪肉是否掺杂,灵敏度为 10 pg/ μ L,该方法优化了线粒体 DNA 的提取步骤,极大缩短检测时间,可检测的掺假率为 1%,具有商业价值。

3.4 食品新鲜程度和亚致死型细菌

由于冷鲜鸡的新鲜度与假单胞菌的数量具有高度的正相关性。因此,张晋豪等^[10]建立一种基于 LAMP 快速检测假单胞菌数量,从而实现对冷鲜鸡新鲜度检测的方法。该方法以假单胞菌 16S rDNA 为靶标设计引物,肉眼观察 HNB 的颜色变化(蓝—紫),并通过分光光度计检测 646 nm 处吸光度值,共同判断反应结果,通过优化反应条件,检测限达到 3.05×10^2 CFU/mL。LAMP 检测结果与感官评定结果一致,表明该研究建立的基于 LAMP 快速评价冷鲜鸡新鲜度的方法,具有代替传统检测方法的可能性,应用前景广阔。

亚致死型细菌是细菌在不良生存条件下的一种自我保护状态,虽然其丧失了在选择性基上生长繁殖的能力,但仍保留毒力和致病性,在适宜的生长条件下,亚致死型细菌能够复苏,并迅速达到致病剂量^[95]。传统的培养法难以检测亚致死状态的病原菌,使其成为逃避检测的“隐性污染源”。叠氮溴化丙锭(Propidium Monoazide, PMA)是一种核酸交联染料,能够选择性地透过死细胞膜,但不能透过活细胞膜,因此可用于对细胞生存状态的判定^[96]。强光照射可使进入细胞的 PMA 与 DNA 共价交联,阻碍死细胞中目标 DNA 的扩增,同时完全钝化游离的 PMA,以避免出现“假阴性”的结果。

亚致死型细菌是一种细胞膜没有损伤的活菌, 将 PMA 与核酸扩增技术相结合, 可以区分亚致死型细菌和死菌。曹潇等^[97]开发了一种 PMA-LAMP 检测方法, 在 3 $\mu\text{g/mL}$ PMA 条件下, 650 W 卤素灯下曝光 5 min, 能抑制 1.2×10^7 copies/mL 死菌的核酸扩增, 以 *muc* 基因为靶标, 对亚致死状态金黄色葡萄球菌的检出限为 34 CFU/mL, 对速冻水饺和奶粉样品的检出限分别为 17 CFU/mL 和 1.70×10^2 CFU/mL。

4 结论与展望

食品安全是保障人民健康和安全的关键环节, 意义重大。基于核酸的 LAMP 方法能实现在分子水平上检测有害物质, 预防食品安全问题的发生。LAMP 因具有快速、灵敏、特异、便携和操作简单等优点, 适合于现场检测, 符合我国国情, 因此在食品安全领域中具有重要意义。为推进 LAMP 的商业化应用, 未来可以在以下方面加强研究: (1) 简化样品的前处理步骤, 包括非预增菌处理, 显著缩短检测时间; (2) 与 CRISPR 系统联用, 进一步放大靶标信号, 实现对痕量核酸的检测; (3) 提高 LAMP 检测的通量, 提高检测效率; (4) 与微流控技术结合, 开发 LAMP 芯片, 进一步实现设备的小型化和便携化; (5) 与大数据和智能手机相结合, 实现数据共享, 使监控系统更智能化; (6) 开发商业化试剂盒, 降低对操作人员的技术要求, 实现标准化。随着 LAMP 技术的不断完善与推广, 该技术在食品安全检测领域将得到更为广泛的应用。

参考文献

- [1] 陈香玉, 龚晶, 陈俊红. 新冠疫情常态化防控背景下我国食品安全追溯体系建设的思考[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1): 352-358.
- [2] 夏慧丽, 朱春红. 2017年我国食品安全质量状况分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(8): 194-199.
- [3] TSUGUNORI N, HIROTO O, HARUMI M, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.
- [4] TIAN Z, YANG L L, QI X, et al. Visual lamp method for the detection of *Vibrio vulnificus* in aquatic products and environmental water [J]. BMC Microbiology, 2022, 22(1): 256.
- [5] YANG B, SHI Z W, MA Y, et al. Lamp assay coupled with CRISPR/Cas12a system for portable detection of african swine fever virus [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(4): e216-e223.
- [6] 陈珍金, 张璜, 石磊, 等. 利用 LAMP 技术快速检测羊肉制品中的鼠源性成分[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 322-327.
- [7] 朱凯, 康怀彬, 王德国. 可视化 LAMP 检测常见肉制品中猪肉成分[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 296-302.
- [8] ZHANG F, GAO C S, BAI L L, et al. Dual-color blending based visual lamp for food allergen detection: a strategy with enlarged color variation range and contrast [J]. Food Chemistry X, 2021, 13: 100201.
- [9] STEFANIE M A, CHRIS A H, CLARISSA L, et al. Lamp-based on isothermal amplification of multicopy gene *orf160b*: applicability for highly sensitive low-tech screening of allergenic soybean (*Glycine max*) in food [J]. Foods, 2020, 9(12): 1741.
- [10] 张晋豪, 王浩东, 刘欣悦, 等. 基于 LAMP 技术快速检测冷鲜鸡新鲜度[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 351-359.
- [11] HASAN S, NESLIHAN T K. Detection of potato ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 20393.
- [12] CHEN Y F, LI H, YANG L, et al. Rapid detection of *Clostridium botulinum* in food using loop-mediated isothermal amplification (lamp) [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(9): 4401.
- [13] CORALIE L, MÉLINDA C, CLAIRE D, et al. A lamp-based assay for the molecular detection of group b *Streptococcus* [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2023, 42(10): 1245-1250.
- [14] RAMYA R, WANG S, NANDINI D, et al. Evaluation of lamp for detection of *Shigella* from stool samples in children [J]. Access Microbiology, 2020, 2(11): 1-9.
- [15] PRASANNAKUMAR M K, PARIVALLAL P B, PRAMESH D, et al. Lamp-based foldable microdevice platform for the rapid detection of *Magnaporthe oryzae* and *Sarocladium oryzae* in rice seed [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 178.
- [16] ZIN M H, TIWA R, THIDARAT R, et al. Loop-mediated isothermal amplification (lamp) for identification of *Pythium insidiosum* [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2020, 101: 149-159.
- [17] LEA R, ARATI A, LINDA S, et al. A lamp (loop-mediated isothermal amplification) test for rapid identification of khapra beetle (*Trogoderma granarium*) [J]. Pest Management Science, 2021, 77(12): 5509-5521.
- [18] JIAO J P, REN L L, CHEN R M, et al. A lamp assay for the detection of *Thecodiplosis japonensis*, an alien gall midge species pest of pine trees [J]. Insects, 2022, 13(6): 540.
- [19] SANJEEV K, SANJHI P, VIKRANT S, et al. An endpoint

- visualization loop-mediated isothermal amplification (lamp) for detecting *Bubaline theileriosis* [J]. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 2022, 11(1): 67.
- [20] MAURICE A M, JEVAN C, YANG N, et al. A loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay specific to *Trichomonas tenax* is suitable for use at point-of-care [J]. Microorganisms, 2022, 10(3): 594.
- [21] BEATRIZ C V, BEGOÑA F S, ARLETTE N, et al. First field study using strong-lamp for diagnosis of *Strongyloidiasis* in cubal, angola [J]. Parasites & Vectors, 2023, 16(1): 393.
- [22] YUAN D, KONG J L, LI X X, et al. Colorimetric lamp microfluidic chip for detecting three allergens: peanut, sesame and soybean [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 8682.
- [23] DORIAN T and LEI Y. Mini review: recent progress in rt-lamp enabled covid-19 detection [J]. Sensors and Actuators Reports, 2020, 2(1): 100017.
- [24] RACHID T, YOIKA F, GERTIE P, et al. An advanced one-step rt-lamp for rapid detection of little cherry virus 2 combined with high-throughput sequence-based phylogenomics reveal divergent flowering cherry isolates [J]. Plant Disease, 2022, 106(3): 835-845.
- [25] CHEN Z W, MAO S H, ZHANG W, et al. Rapid visual detection method for barley yellow mosaic virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (rt-lamp) [J]. Plant Disease, 2021, 105(9): 2658-2663.
- [26] SALIH Y, SCOTT A, OZGUR B. Field-portable, rapid, and low-cost rt-lamp assay for the detection of tomato chlorotic spot virus [J]. Phytopathology, 2023, 113(3): 567-576.
- [27] LI X Q, HU W L, LI Y, et al. Development of an rt-lamp assay for the detection of maize yellow mosaic virus in maize [J]. Journal of Virological Methods, 2022, 300: 114384.
- [28] LATIEF A W, PRIYANKA J, JAWAID A K. Development of one step colorimetric rt-lamp assays for rapid detection of apple mosaic virus and prunus necrotic ringspot virus [J]. Journal of Virological Methods, 2023, 316: 114729.
- [29] ABHIJEET B, LES J, HAILEY K B, et al. Detection of swine influenza virus in nasal specimens by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (rt-lamp) [J]. Journal of Virological Methods, 2021, 288: 114015.
- [30] THEERAWUT P, PATTARASUDA R, SRI R K R, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (rt-lamp) assay for the specific and rapid detection of tilapia lake virus [J]. Immunology and Infection, 2020, 18: 159.
- [31] SUZANNA M S, JOANNA S, THANH H N. Rt-lamp as diagnostic tool for influenza-a virus detection in swine [J]. Veterinary Sciences, 2023, 10(3): 220.
- [32] AYAKA H, LI M Z, KAYOKO O, et al. Multiplex lamp detection of the genus phytophthora and four phytophthora species *P. ramorum*, *P. lateralis*, *P. kernoviae*, and *P. nicotianae*, with a plant internal control [J]. Microbes and Environments, 2021, 36(2): ME21019.
- [33] DONG Y J, ZHAO Y J, LI S W, et al. Multiplex, real-time, point-of-care rt-lamp for SARS-Cov-2 detection using the hfman probe [J]. ACS Sensors, 2022, 7(3): 730-739.
- [34] ZHONG L L, ZHOU Q, TAN C Y, et al. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (multi-lamp) assay for rapid detection of mcr-1 to mcr-5 in colistin-resistant bacteria [J]. Infection and Drug Resistance, 2019, 12: 1877-1887.
- [35] ALEXANDER A M. Digital pcr: a brief history [J]. Biomolecular Detection and Quantification, 2014, 1(1): 1-2.
- [36] YUAN H, CHAO Y C, HO C S. Droplet and microchamber-based digital loop-mediated isothermal amplification (dlamp) [J]. Small, 2020, 16(9): e1904469.
- [37] TAO Y, YUN J L, WANG J, et al. High-performance detection of *Mycobacterium bovis* in milk using digital lamp [J]. Food Chemistry, 2020, 327: 126945.
- [38] DANIEL W W, KRZYSZTOF L, VENICE S, et al. Viral load quantitation at the point-of-care with shaken digital droplet rt-lamp [J]. Lab Chip, 2023, 23(15): 3479-3486.
- [39] BEATRIZ O, BRUNO V, ALEXANDRA R F, et al. Fast prototyping microfluidics: integrating droplet digital lamp for absolute quantification of cancer biomarkers [J]. Sensors (Basel), 2020, 20(6): 1624.
- [40] ZHANG L, DU X, CHEN C, et al. Development of a rapid, one-step-visual method to detect *Salmonella* based on ic-lamp method [J]. Iranian Journal of Veterinary Research, 2020, 21(1): 20-25.
- [41] DING S, CHEN R, CHEN G Y, et al. One-step colorimetric genotyping of single nucleotide polymorphism using probe-enhanced loop-mediated isothermal amplification (pe-lamp) [J]. Theranostics, 2019, 9(13): 3723-3731.
- [42] LIU X N, ZHANG C, ZHANG S N, et al. One-step determination of deletion mutation based on loop-mediated isothermal amplification [J]. Analytical Biochemistry, 2021, 616: 114087.
- [43] FENG Y M, WANG M M, JIANG H Q, et al. Comparative evaluation of lamp and nested pcr for the rapid diagnosis of *Mycobacterium marinum* infection [J]. Infection and Drug Resistance, 2023, 16: 1601-1609.
- [44] REIHANEH R, ZAHRA K P, NASSIM G, et al. Rapid and simple detection of *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification assay in urine specimens [J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2018, 10(4): 269-272.
- [45] CHEN C G, ZHAO Q Y, GUO J W, et al. Identification of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) using simultaneous detection of mecA, nuc, and femB by loop-mediated isothermal amplification (lamp) [J]. Current Microbiology, 2017, 74(8): 965-971.
- [46] FRIDAH M, CECILIA K M, JOHNSON K, et al. Stem loop-mediated isothermal amplification test: comparative analysis with classical lamp and pcr in detection of *Entamoeba histolytica* in kenya [J]. BMC Research Notes, 2017, 10(1): 142.
- [47] SIDDIQUE M P, JANG W J, LEE J M, et al. GroEL is a suitable genetic marker for detecting *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(2): 106-113.
- [48] RADHIKA B, VINOD K N, SREENIVASULU D, et al. Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin gene in lambs by loop mediated isothermal amplification [J]. Veterinary World, 2016, 9(1): 60-64.
- [49] MORI Y, NAGAMINE K, TOMITA N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 289(1): 150-154.
- [50] WANG S Y, LIU N, ZHENG L Y, et al. A lab-on-chip device for the sample-in-result-out detection of viable *Salmonella* using loop-mediated isothermal amplification and real-time turbidity monitoring [J]. Lab Chip, 2020, 20(13): 2296-2305.
- [51] JUN S, TAKUYA M, NORIHITO T, et al. A novel detection procedure for mutations in the 23S rRNA gene of mycoplasma pneumoniae with peptide nucleic acid-mediated loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 141: 90-96.
- [52] LIN M Y, LIU W, WANG P, et al. Rapid detection of *ermB* gene in *Clostridium difficile* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Medical Microbiology, 2015, 64(8): 854-861.
- [53] YUAN X Y, WANG Y L, MENG K, et al. Lamp real-time turbidity detection for fowl adenovirus [J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 256.
- [54] RATCHANIDA K, PATCHAREE J, CHOTECHANA W, et al. High sensitivity, loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric gold-nanoparticle probes for visual detection of high risk human papillomavirus genotypes 16 and 18 [J]. Journal of Virological Methods, 2016, 234: 90-95.
- [55] WANG Z W, CUI X P, HU A, et al. Establishment of real-time fluorescence and visual lamp for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and kits construction [J]. Letters in Applied Microbiology, 2023, 76(11): 122.
- [56] ANISH K, EKTA K, RAJ S, et al. Diagnosis of osteoarticular tuberculosis: multi-targeted loop-mediated isothermal amplification assay versus multiplex pcr [J]. Future Microbiology, 2021, 16: 935-948.
- [57] EDILAINE M G G, DAVID S J F, DAVID L, et al. Real-time quantitative and ion-metal indicator lamp-based assays for rapid detection of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Disease, 2020, 104(5): 1514-1526.
- [58] YU J F, XIE J, CAO Y, et al. A modified loop-mediated isothermal amplification method for detecting avian infectious laryngotracheitis virus [J]. Animal Biotechnology, 2021, 32(6): 766-773.
- [59] SUSANA A B, MÓNICA L M, ALEJANDRO F B, et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (lamp) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2017, 11(7): e0005779.
- [60] MOTOKI G, EIICHI H, ATSUO O, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue [J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167-172.
- [61] ANGELICA S, STEFANIA L, ALESSIA G, et al. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 243: 105-108.
- [62] KIM J M, KIM H R, BAEK J S, et al. Simple and rapid colorimetric detection of canine parainfluenza virus 5 (*Orthorubulavirus mammalis*) using a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Pathogens, 2023, 12(7): 921.
- [63] MAJA A Z M, LETITIA M S, ANNA T, et al. A single-tube hnb-based loop-mediated isothermal amplification for the robust detection of the ostreid herpesvirus 1 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6605.
- [64] CHOOPARA I, ARUNRUT N, KIATPATHOMCHAI W, et al. Rapid and visual Chlamydia trachomatis detection using loop-mediated isothermal amplification and hydroxynaphthol blue [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(1): 51-56.
- [65] SYED A A, GURPREET K, NONGTHOMBAM B, et al. Rapid and visual detection of *Leptospira* in urine by ligh-lamp assay with pre-addition of dye [J]. Molecular and Cellular Probes, 2017, 36: 29-35.
- [66] MENG Y L, CHOO H O, YEE L L. Validation of SYBR green I based closed-tube loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay for diagnosis of *Knowlesi malaria* [J]. Malar Journal, 2021, 20(1): 166.
- [67] ZHAO K, HU R L, NI J P, et al. Establishment of a porcine

- parvovirus (ppv) lamp visual rapid detection method [J]. Journal of Virological Methods, 2020, 284: 113924.
- [68] SATHISH K T, NAVANEETH K A, JOSEPH S R J, et al. Visual loop-mediated isothermal amplification (lamp) for the rapid diagnosis of *Enterocytozoon hepatopenaei* (ehp) infection [J]. Parasitol Research, 2018, 117(5): 1485-1493.
- [69] MANRAJ D S, HARKIRAT S, NIRBHAY K S, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification technique for the rapid visual detection of *Hepatozoon canis* infection [J]. Acta Parasitologica, 2020, 65(1): 151-155.
- [70] SE H L, YUN H B, YANG H K, et al. One-pot reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (rt-lamp) for detecting MERS-Cov [J]. Front Microbiology, 2017, 7: 2166.
- [71] HU Y H, WAN Z Z, MU Y L, et al. A quite sensitive fluorescent loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of respiratory syncytial virus [J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2019, 13(12): 1135-1141.
- [72] THAN L Q, TIEN A N, DANG D B, et al. Classification of multiple DNA dyes based on inhibition effects on real-time loop-mediated isothermal amplification (lamp): prospect for point of care setting [J]. Front Microbiology, 2019, 10: 2234.
- [73] GEOVANI T M, MATEUS C S, BRUNA O C, et al. A new rt-lamp-on-a-chip instrument for SARS-Cov-2 diagnostics [J]. Microchemical Journal, 2022, 180: 107600.
- [74] LEE P Y Z, MENG Y L, SYAZA I B R, et al. End-point detection of loop-mediated isothermal amplification (lamp) on malaria by direct observation with colorimetric dyes [J]. Experimental Parasitology, 2022, 239: 108310.
- [75] SANJHI P, VIKRANT S, DAYA S, et al. Rapid diagnosis of *Theileria annulata* by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay [J]. Veterinary Parasitology, 2020, 285: 109224.
- [76] JI J, XU X, WU Q Q, et al. Simple and visible detection of duck hepatitis b virus in ducks and geese using loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Poultry Science, 2020, 99(2): 791-796.
- [77] JENS F, NINA C X, MARCUS F, et al. Shining a light on lamp assays a comparison of lamp visualization methods including the novel use of berberine [J]. Biotechniques, 2015, 58(4): 189-194.
- [78] PANG B, YAO S, XU K, et al. A novel visual-mixed-dye for lamp and its application in the detection of foodborne pathogens [J]. Analytical Biochemistry, 2019, 574: 1-6.
- [79] KUBOTAA R, ALVAREZW M, SUD W, et al. FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (lamp) [J]. Biological Engineering Transactions, 2011, 4(2): 81-100.
- [80] NATHAN A T, ZHANG Y H, THOMAS C E J. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification [J]. Biotechniques, 2012, 53(2): 81-89.
- [81] DING S, CHEN G Y, WEI Y H, et al. Sequence-specific and multiplex detection of covid-19 virus (SARS-Cov-2) using proofreading enzyme-mediated probe cleavage coupled with isothermal amplification [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021, 178: 113041.
- [82] KEAN H O, MENG Ying M L, JIA R M, et al. A sensitive and specific fluorescent rt-lamp assay for SARS-Cov-2 detection in clinical samples [J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(1): 448-463.
- [83] LIANG R Y, LIANG L, REN X X, et al. Development of a taqman loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of pigeon paramyxovirus type 1 [J]. Archives of Virology, 2021, 166(6): 1599-1605.
- [84] ZHANG J, CAO J J, ZHU M S, et al. Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (lamp-lfd) to detect *Mycoplasma ovipneumoniae* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35(2): 31.
- [85] TAO J H, YAN H Q, CHEN S S, et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification-lateral flow dipstick (lamp-lfd) method for detecting *Clostridium piliforme* [J]. Veterinary Medicine and Science, 2023, 3: 1-12.
- [86] XUE Y J, KONG Q M, DING H J, et al. A novel loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow-dipstick (lamp-lfd) device for rapid detection of *Toxoplasma gondii* in the blood of stray cats and dogs [J]. Parasite, 2021, 28: 41.
- [87] SUPATRA A, PONGBUN T, SINTAWEE K, et al. Development of duplex lamp technique for detection of porcine epidemic diarrhea virus (pedv) and porcine circovirus type 2 (pcv2) [J]. Current Issues in Molecular Biology, 2022, 44(11): 5427-5439.
- [88] HUANG T Z, LI L Z, LIU X, et al. Loop-mediated isothermal amplification technique: principle, development and wide application in food safety [J]. Analytical Methods, 2020, 12(46): 5551-5561.
- [89] SHEU S C, TSOU P C, LIEN Y Y, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (lamp) assays for the rapid detection of allergic peanut in processed food [J]. Food Chemistry, 2018, 257: 67-74.
- [90] ALIREZA A, AFSANEH S. Targeted detection of single-nucleotide variations: progress and promise [J]. ACS Sensors, 2019, 4(4): 792-807.
- [91] LIU H, HU X W, ZENG H J, et al. A rapid and high-throughput system for the detection of transgenic products

- based on lamp-CRISPR-Cas12a [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 7: 100605.
- [92] PATRICK H, GUY K, LAURENCE T, et al. Optimised lamp allows single copy detection of 35sp and nost in transgenic maize using bioluminescent assay in real time (bart) [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 17590.
- [93] ZHOU D G, WANG C F, LI Z, et al. Detection of bar transgenic sugarcane with a rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Front Plant Scientific, 2016, 7: 279.
- [94] REONA T, YUKARI K, YASUTAKA M, et al. Rapid screening detection of genetically modified crops by loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(29): 7839-7845.
- [95] SALMA M, MICHEL D, SAMI M. Inactivation of the gene *katA* or *sodA* affects the transient entry into the viable but non-culturable response of *Staphylococcus aureus* in natural seawater at low temperature [J]. Marine Pollution Bulletin, 2010, 60(12): 2209-2214.
- [96] CAWTHORN D M and WITTHUHN R C. Selective pcr detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(4): 1178-1185.
- [97] 曹潇,赵力超,杨翠琪,等.基于叠氮溴化丙锭与恒温核酸扩增技术快速检测亚致死状态食源金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学,2016,37(24):149-155.