

核酸等温扩增技术及其在中药分子鉴定中的应用研究概况

吴文如¹, 杨璐¹, 周华²

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 中药质量研究国家重点实验室, 澳门科技大学, 澳门 000853

摘要: 中药品种的准确鉴定是中药质量控制的首要环节, 寻找高效、便捷、准确的鉴定方法, 是中药鉴定技术的发展趋势。相对于以表型标记为鉴定特征的传统方法, DNA 分子遗传标记鉴定技术具有更加准确、可靠的特点, 适用于近缘混淆及多来源品种的鉴定, 但同时受 PCR 技术的限制, 存在成本高、步骤复杂、时间长的缺点, 无法实现快速鉴定。环介导等温扩增是一种新型核酸扩增技术, 具有高特异性、高灵敏性、简便、快速、低成本等优点, 成为继 PCR 技术之后的又一新兴技术, 可成功实现对中药材的快速分子鉴定。通过对常见的核酸等温扩增技术及其在中药材分子鉴定研究中的应用情况进行综述, 为中药材的快速分子鉴定体系研究提供参考。

关键词: 环介导等温扩增; 核酸等温扩增技术; 中药鉴定; 分子鉴定; 快速鉴定

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)23-4289-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.028

Isothermal nucleic acid amplification technology and its application in molecular identification of Chinese materia medica

WU Wen-ru¹, YANG Lu¹, ZHOU Hua²

1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau 000853, China

Abstract: Accurate identification of varieties is the most important part of quality control of Chinese materia medica (CMM). To find an efficient, convenient, and accurate identification method is the development trend of identification technology of CMM. Compared with the traditional identification method based on phenotypic markers, DNA molecular marker technology is more accurate and reliable, suitable for the identification of closely related species and sample with confusion and multiple sources, but unable to realize the rapid identification due to the limits of the PCR technology, such as high cost, complex procedures, and the drawback of long time. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel nucleic acid amplification technology, with the advantages of high specificity, high sensitivity, simple, rapid, low cost, etc., become another new technology after PCR to realize the rapid molecular identification of CMM successfully. In this paper, the common isothermal amplification of nucleic acid technology and its application in the study of molecular identification of Chinese herbal medicines were reviewed analysis, to provide a reference for the study of rapid molecular identification system of Chinese herbal medicines.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; isothermal nucleic acid amplification technology; identification of Chinese materia medica; molecular identification; rapid identification

中药材的品种真伪和质量优劣, 直接关系到治疗效果。因此, 保证中药品种的准确鉴定是中药质量控制的首要环节。相对于传统表型标记方法, 中药 DNA 分子标记鉴定技术是指通过直接分析遗传

物质的多态性来对外在性状表现规律进行鉴别, DNA 分子作为遗传信息的载体, 信息量大, 在同种内具有高度的遗传稳定性, 且不易受外界环境因素和生物发育阶段及器官组织差异的影响, 因此具有

收稿日期: 2016-07-11

基金项目: 澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室开放课题 (MUST-SKL-2016-07); 广州中医药大学留学人员科技活动资助计划 (薪火计划) (XH20140109)

作者简介: 吴文如 (1976—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药分子鉴定研究, Tel: (020)39358296 E-mail: wuwenru@gzucm.edu.cn

高度特异性。DNA 分子标记方法的兴起和逐步成熟,使得中药材以组织解剖学、化学等客观指标为依托的现代质量评价方法得到了有益的补充,并以此为突破口来解决品种鉴定中的一些难题。国内外已经利用不同 DNA 分子标记技术对几百种中药材进行了鉴别研究。《中国药典》也于 2010 年版正式将其纳入法定中药鉴定方法^[1]。中药鉴定的发展趋势是寻找高效、便捷、准确的鉴定方法,但目前一般的 DNA 分子标记鉴别方法受 PCR 扩增技术限制,不仅存在需大量昂贵的实验仪器的缺点,而且操作检测步骤复杂,时间还是长于其他常规鉴别方法,大大限制了其作为快速鉴定方法的使用和推广。

以环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术为代表的核酸等温扩增技术的问世,解决了核酸分子标记鉴别方法上的诸多难题,使其进行快速鉴定成为可能。LAMP 是一种快速的核酸扩增技术,利用特异引物及链置换 DNA 聚合酶在恒温条件下自循环几十分钟,就可完成核酸扩增反应。LAMP 法操作十分简单,对仪器设备要求低,结果的检测也很简便快捷,十分适合基层快速鉴别。与传统 PCR 技术相比,核酸等温扩增具有快速高效,且不需要专用的仪器等优点^[2]。LAMP 方法因其具有高特异性、高灵敏性、简便、快速、低成本等特点,已在病原体检测和疾病的快速基因诊断等诸多领域应用,取得了可喜的成就。有学者利用 LAMP 技术成功进行了人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.、何首乌 *Polygonum multijiorum* Thunb.、冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 以及蒲公英 *Taraxacum formosanum* Kitamura 等中药材的快速分子鉴定。综合来看, LAMP 法具有的简便、快速、灵敏等特点,可以实现对中药材的快速鉴定,在中药鉴定中有着广阔的应用前景。鉴于此,本文对常见的核酸等温扩增技术及其在中药材分子鉴定研究中的应用进展进行综述及分析,为中药材的快速分子鉴定体系研究提供参考。

1 常见的核酸等温扩增技术

基因扩增技术是分子生物学领域的一项重要研究手段,人们已经建成了多种方法,其中 PCR 技术得到了广泛的应用,但该方法需要特殊的仪器、模板的热变性及长时间的温度循环,不利于在基层实验室推广。20 世纪 90 年代以来,以核酸等温扩增技术为基础的检测技术得到了迅猛的发展,与 PCR 技术相比,核酸等温扩增技术的特点是在特

定温度条件下实现核酸的扩增。由于扩增反应的全过程在同一温度下进行,可以通过加热模块、水浴锅等简单的,甚至非专业的设备完成反应,大大缩短了反应时间,因而能满足现代分子检测技术“快速简便”的需求,具有较大的实际应用价值^[3]。目前,常见的核酸等温扩增技术有如下 6 种。

1.1 依赖核酸序列扩增(nucleic acid sequence based amplification, NASBA)技术

NASBA 是一项以 RNA 为模板的快速等温扩增技术,又称自主序列复制系统或再生长序列复制技术^[4],特别适用于 RNA 分子的检测。利用 T7RNA 聚合酶仅在结合核酸上相应位点才能起作用的特点,将结合位点序列与靶序列相连,然后产生靶分子的 RNA 拷贝,形成反转录和 RNA 转录的连续循环,从而使靶序列扩增。NASBA 技术已成功应用于病毒、细菌、寄生虫和细胞因子等的检测,并已被列为我国禽流感检测的国家标准^[5]。然而针对以干燥药材和饮片为主要存在形式, RNA 已经完全降解的中药样品,该技术显然并不适用。

1.2 滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)技术

RCA 是借鉴自然界中环状病原微生物 DNA 分子的滚环式的复制方式而设计的一种等温核酸扩增方法,在恒温的条件下,当有环形 DNA 模板和聚合酶时,基于连接酶连接、引物延伸、与链置换扩增反应,可以产生大量的与环型探针互补的重复序列^[6]。这种方法不仅可以直接扩增 DNA 和 RNA,还可以实现对靶核酸的信号放大,灵敏度达到 1 个拷贝的核酸分子,因此在全基因组扩增、单核苷酸多态性、DNA 芯片、蛋白质芯片等检测方面中具有很大的应用价值。然而目前 RCA 的检测也还存在诸多不足:模板 DNA 需事先环化、锁式探针合成的费用较高、易产生背景信号干扰、RCA 的结果目前没有理想的质控指标以及反应时间偏长(一般 4 h 以上)。因此,要想发展成为普通实验室的诊断技术,还应在探针设计和实验室质控等方面做进一步的探索研究^[7]。

1.3 单引物等温扩增(single primer isothermal amplification, SPIA)技术

SPIA 主要是通过一条 3'端是 DNA 片段、5'端是 RNA 片段的混合引物, RNase H 及具有强链置换活性的 DNA 聚合酶实现 DNA 的体外线性等温扩增。SPIA 扩增反应一般在 55~65 °C 进行,全程需要 30 min,反应过程中, RNase H 不断降解引物与

模板 DNA 所产生的 DNA/RNA 杂合链中的 RNA 部分,使未结合的引物能够不断获得结合位点并与模板进行链置换合成,并在模板链末端或链终止序列结合处终止,最终扩增出大量的具有高度忠实性的 cDNA 单链^[8]。该技术在 RNA 扩增方面具有较大优点,然而其引物合成相对复杂,反应需要碱基修饰,且无法进行实时定量分析,因此目前仍难以应用在中药材分子鉴定研究方面。

1.4 依赖于解旋酶的等温扩增 (helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA) 技术

HDA 仿真自然界生物体内 DNA 复制的自然过程,在恒温条件下利用解旋酶解开 DNA 双链,同时 DNA 单链结合蛋白稳定解开的单链,为引物提供结合的模板,然后由 DNA 聚合酶催化合成互补链。新合成的双链在解旋酶的作用下又解成单链,并作为下一轮合成的模板进入上述的循环扩增反应,最终实现靶序列的指数式增长^[9]。

1.5 链置换扩增 (strand displacement amplification, SDA) 技术

SDA 是一种基于酶促反应的 DNA 体外等温扩增技术^[10]。在靶 DNA 两端带上被化学修饰的限制性核酸内切酶识别序列,核酸内切酶在其识别位点将链 DNA 打开缺口, DNA 聚合酶继之延伸缺口 3' 端并替换下一条 DNA 链。被替换下来的 DNA 单链可与引物结合并被 DNA 聚合酶延伸成双链。该过程不断反复进行,使靶序列被高效扩增。目前该技术无法用于长片段扩增,一般不超过 200 bp,产物不均一,电泳法检测时出现拖尾现象,引物设计复杂,限制条件较多,使用范围比较窄^[11]。

除了以上列举的技术以外,近年来还发展了一些其他的核酸等温扩增技术,如快速等温检测放大 (rapid isothermal detection and amplification, RIDA) 技术、切刻内切酶核酸恒温扩增 (nickase mediated amplification, NEMA) 技术、重组酶介导扩增 (recombinase-aid amplification, RAA) 技术^[8]等。综合来看,这些方法或者基于 DNA/RNA 生物合成机制研究的新发现,或者利用具有特殊功能的核酸酶,均能将微量标本进行快速扩增,但都在特异性、简便程度、温度、试剂和仪器要求等方面各有缺点。

1.6 LAMP 技术

Notomi 等^[12]于 2000 年开发了一种新颖的核酸等温扩增方法 LAMP,其特点是针对靶基因的 6 个

区域设计 4 条特异引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase) 在等温条件 (65 °C 左右) 保温几十分钟,即可完成核酸扩增反应,不需要模板的热变性、长时间温度循环、繁琐的电泳、紫外观察等过程。

引物设计是否合理是决定 LAMP 技术是否高效特异的关键。该技术针对靶基因 6 个特异区域 (3' 端的 F3c、F2c、F1c 区以及 5' 端的 B1c、B2c、B3c 区) 设计 4 条特异引物,即上游外引物 (F3)、下游外引物 (B3)、上游内引物 (FIP)、下游内引物 (BIP)。FIP 引物在 3' 末端含有与 F2c 互补的 F2 区段,在 5' 末端含有与 F1c 相同序列的区段。BIP 引物在 3' 末端含有与 B2c 互补的 B2 区段,在 5' 末端含有与 B1c 相同序列的区段 (图 1,引自 Eiken Co. Ltd. 网站)。为提高扩增效率,可以再添加 2 条环状引物,即上游环状引物 (LF) 和下游环状引物 (LB)。

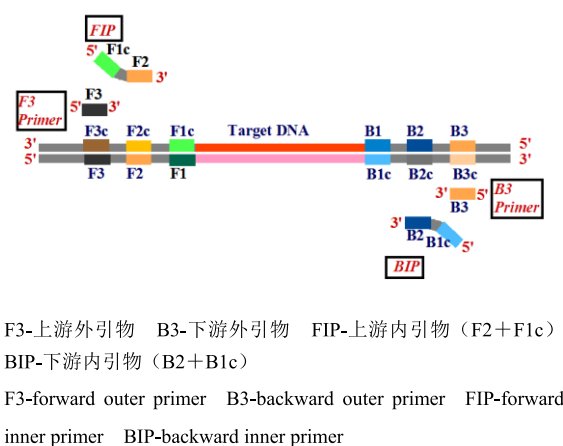


图 1 LAMP 引物在靶基因上的设计

Fig. 1 Design of LAMP primers on target gene

LAMP 的扩增原理是利用 Bst DNA 聚合酶的链置换活性提供反应的动力,在恒温条件下短时间 (30~60 min) 内完成靶 DNA 的高效扩增,整个反应分为两大阶段,即初反应物哑铃状模板的合成,基因循环扩增、延伸和再循环阶段 (图 2,引自 Eiken Co. Ltd. 网站)。

第 1 阶段:哑铃状模板构造形成。在具有链置换活性 DNA 聚合酶的作用下,内引物 FIP 与模板 DNA 结合形成互补链;随后,新合成链在外引物 F3 的作用下被置换,而被置换的单链在 5' 末端形成环状结构。然后,内引物 BIP 与该单链结合,在延伸过程中同时打开环状结构,形成双链 DNA。最后,

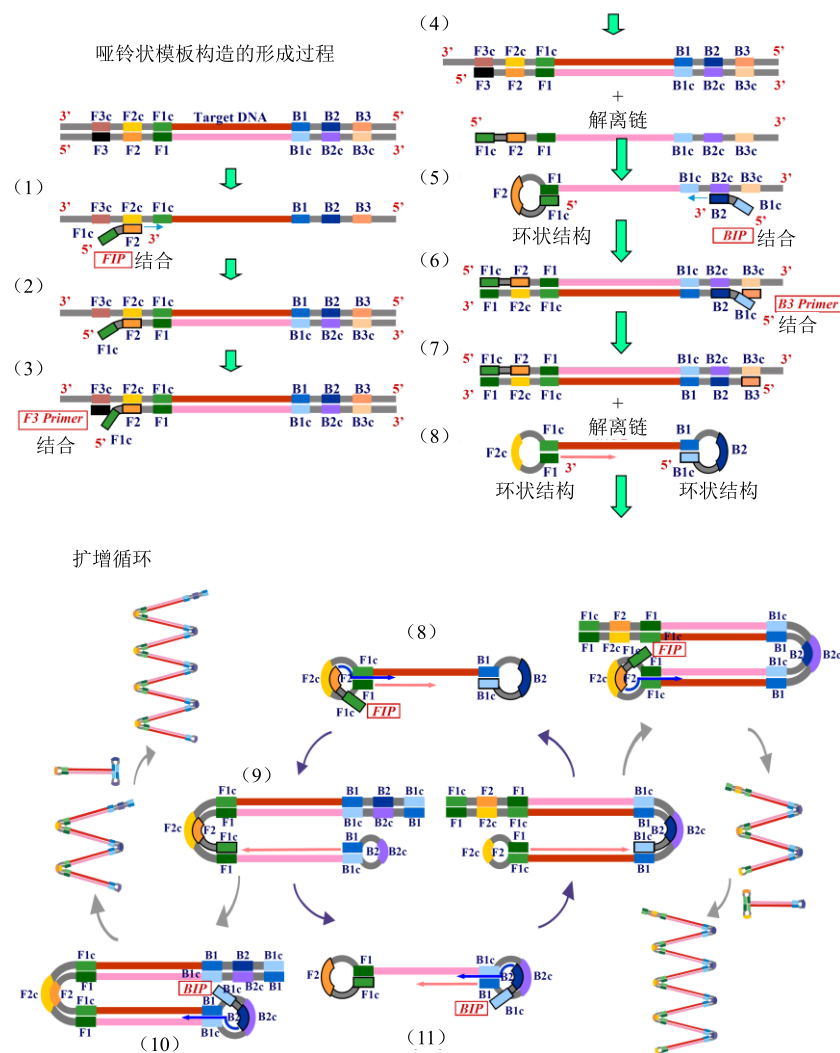


图 2 LAMP 扩增原理

Fig. 2 Amplification principle of LAMP

外引物 B3 与该双链 DNA 的 B3c 结合, 随着引物 B3 的不断延伸, 两侧分别为 F1B 和 B1P 的完整单链被置换。由于该单链两端存在互补序列, 于是形成“哑铃状”循环扩增的起始结构。

第 2 阶段: 扩增循环过程。在哑铃状结构中, 以 3'端 F1 区段为起点, 以自身为模板, 进行 DNA 合成延伸。与此同时, F2 与 F2c 结合, 启动新一轮链置换反应, 使 F1 区段新合成的链解离, 解离出的单链再形成环状结构。该环状结构一方面以 B1 为引物进行延伸, 使 F2 合成链解离, 解离链进而形成哑铃状结构, 重复上述过程; 另一方面, B1P 引物上的 B2 与环上的 B2c 结合, 启动新一轮扩增, 再经过链解离、环状结构形成、环状结构自身扩增、单链置换等过程, 最后形成大小不一的茎环结构、多环花椰菜样结构的 DNA 片段混合物, 使得琼脂

糖凝胶电泳条带呈现梯形^[12]。

相对于 PCR 和其他核酸等温扩增方法, LAMP 法具有许多所无法比拟的优势: (1) 操作简单, 在恒温的条件下实现核酸的扩增, 不需要热循环仪; 不论是 DNA 还是 RNA, 检测步骤都是需将反应液、酶和模板混合于 PCR 管中, 置于水浴锅或恒温箱中 63 °C 左右保温 30~60 min, 肉眼观察结果。(2) 灵敏度高, 可以达到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 倍的扩增, 比传统的 PCR 法高 100~1 000 倍。(3) 特异性高, 采用 4/6 条特异引物识别目的基因上的 6/8 个特异性区域。(4) 扩增速度快, 效率高, 可在 30~60 min 内获得结果, 若在引物上再进一步改进, 可大大提高其扩增效率, 扩增时间在原来的基础上减少 1/3~1/2。(5) 结果判定简单, 在核酸大量合成时, 从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结

合,产生副产物焦磷酸镁沉淀,无需电泳即可实现肉眼可见或浊度计观察的扩增效果;也可利用现有的荧光定量 PCR 仪作荧光定量检测,或加入荧光指示剂直接荧光目视检测(图 3,引自 Eiken Co. Ltd. 网站)。(6)只要加入反转录酶,对于 RNA 病毒或其他 RNA 目标物亦可利用本方法来做检测。(7)如果实验室有 Real-time PCR 的仪器,本方法亦可搭配该仪器进行目标物定量的检测^[11]。

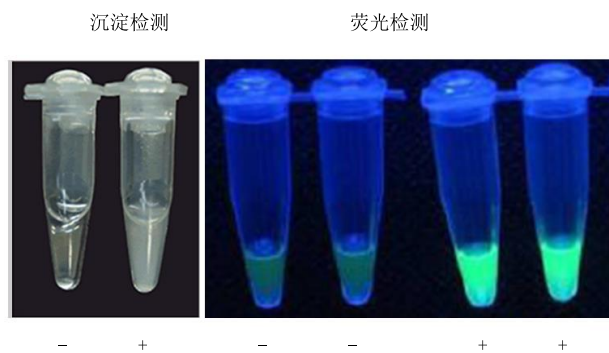


图 3 LAMP 扩增结果的目视判定

Fig. 3 Results of LAMP amplification of visual judgment

2 LAMP 技术在中药分子鉴定中的应用

目前 LAMP 技术已广泛应用于日本国内各种病毒、细菌、寄生虫等引起的疾病检测和食品、化妆品安全检查及进出口快速诊断中,许多检测方法已经列入《日本药典》,并得到了欧美国家的认同^[13]。

最早将 LAMP 技术用于中药快速鉴别研究的是 Sasaki 等^[14],他们选择 18 S 核糖体 RNA 片段为靶基因序列,比对序列差异位点,设计 LAMP 特异引物,进行了人参与竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey.、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的 LAMP 鉴别研究。通过观察实时浊度曲线的变化,可在 30 min 内快速灵敏地将人参鉴别。Sasaki 等^[15]还基于 *trnK* 序列设计 LAMP 引物,建立了姜黄 *Curcuma longa* L. 和郁金 *Curcuma aromatica* Salisb. 的快速鉴别方法。

Sasaki 等^[16]基于 *trnL* 内含子片段的序列差异位点,设计 LAMP 引物,通过观察实时浊度曲线的变化和荧光目视 2 种检测方式,进行了 2 种性状极其相似药用植物的仙人掌乌羽玉 *Lophophora Williamsii* J. M. Coulter 和翠冠玉 *L. diffusa* Bravo 的快速鉴别。吕军^[17]利用 LAMP 对何首乌及其混伪品进行了快速鉴定研究,通过相关序列扩增多态性 (SRAP) 寻找何首乌特异性条带,再通过对特异性条带序列测序,设计一套 LAMP 引物对何首乌进

行特异扩增,最后通过对扩增结果的荧光检测实现何首乌快速鉴定。Chaudhary 等^[18]使用 RAPD 扩增长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 及其伪品,获得了 1 个 610 bp 的长春花特有片段,利用该标记设计 LAMP 引物,成功鉴别了长春花及其伪品。李奎等^[19]针对冬虫夏草的 CS2 serine protease (*csp2*) 基因设计 LAMP 内外引物对,采用包括冬虫夏草在内的 6 种不同虫草进行 LAMP 扩增,并对阳性产物酶切鉴定以检测其特异性,通过对模板 DNA 的 10 倍梯度稀释,检测其灵敏度;紫外灯下观察凝胶电泳或加入荧光染料 SYBR Green I 的扩增产物。结果设计的 LAMP 引物可以特异地针对冬虫夏草的 *csp2* 基因进行扩增,产物可被限制性内切酶 *Taq* I 酶切,且具有较高的灵敏度,检出限达 6 pg/mL。江荧真^[20]采用 LAMP 技术进行了台湾蒲公英及其混淆品的分子鉴定研究,针对 ITS2 序列设计台湾蒲公英正品药材的高特异 LAMP 引物,通过对引物的反应性测试、反应时间、特异性和灵敏度试验,建立了一套可快速且灵敏鉴定台湾蒲公英药材及其混淆品的基因鉴别方法。蒋超^[21]根据 *trnL-trnF* 序列 625C/A 变异位点设计了 LAMP 引物组,对 21 份金银花类中药及 50 份其他种属物种进行 LAMP 鉴别。当设定孵育温度为 63 °C 时,扩增完成加入 SYBR Green I 荧光染料时,金银花类中药均显示强烈的荧光,而其伪品显示极弱荧光。当温度为 65 °C 时,能鉴别金银花 *Lonicera japonica* Thunb. 及其伪品。余淑琳等^[22]通过测序比对钩吻 *Gelsemium elegans* (Gardn. & Champ.) Benth. 与金银花及山银花 *Lonicerae Flos* 的 *trnL-trnF* 序列,依据其差异位点进行引物设计,成功对金银花类药材及其易混淆品有毒药材钩吻进行鉴别。赵源等^[23]以线粒体基因 *nad 1* 为靶基因设计特异性引物建立了人参的 LAMP 检测方法,能够在 1 h 内完成检测,灵敏度比常规 PCR 高 10 倍。

3 结语与展望

LAMP 方法因其具有高特异性、高灵敏性、简便、快速、低成本等特点,已在病原体检测和疾病的快速基因诊断,以及转基因植物、真菌、食品安全等诸多领域应用,取得了可喜的成就。然而,由于中药多是固体,样品的快速处理和 DNA 提取存在困难,难以实现快速分子鉴定,同时 LAMP 技术比较新颖,发展时间较短,近两年才成熟起来,还没有引起中药界广泛关注和接受,LAMP 技术在

药材的快速鉴定应用中仍较鲜见报道。此外, LAMP 技术对中药的分子鉴定研究还存在一些技术困难, 主要表现在 3 个方面: 1) 样品基因组信息不全。LAMP 反应通常被扩增序列较短且特异性较高, 因此目的基因选择和 LAMP 引物设计要求对基因组的信息了解较全面, 但目前中药的基因组序列基本都还不明确。2) LAMP 的引物设计较为复杂。LAMP 实验原理和常规 PCR 不同, 其引物设计原则也有较大差异。3) LAMP 太过于灵敏和产物量的巨大, 使得 LAMP 产物及易污染。

针对以上问题, 笔者认为, LAMP 技术虽然存在一定困难和不足, 但其拥有卓越的特性, 且该技术近年来已取得了飞速的发展和完善, 并找到相应的解决方案, 在中药材的快速分子鉴定研究中前景广阔。首先, 常规分子鉴定研究, 因受到 PCR 技术的限制, 且操作步骤较多, 通常要求 DNA 模板质量较高, 因此对中药固体样品多采用常规方法处理提取, 而基于 LAMP 技术的高灵敏度, 模板 DNA 即使拷贝数较低, 仍可在 30 min 内检出, 因此对模板质量要求较低, 这就使得中药固体样品的快速处理和 DNA 快速提取成为可能。其次, 在以往的分子鉴定研究中, 需要大量基因测序、筛选比对, 才能选择到合适的序列。近年来随着中药分子鉴定技术, 尤其是 DNA 条形码技术的发展, 相关研究表明, 在中药的基因组序列还不明确的情况下, 可以利用一段或几段标准 DNA 序列实现动物、植物和真菌物种的准确鉴定, 现该技术已经被广泛认可并已应用于生物物种的鉴定。随着 LAMP 理论和技术的发展成熟, 已经出现了自动化的 LAMP 引物设计软件, 操作简单方便, 并可委托专业公司代为设计, 大量实践也证明, 其成功率较高。最后, 针对容易污染的情况, 在任何进行 LAMP 实验前, 一定要关注污染问题。通过实验室严格分区, 尽量进行不开盖检测, 或是采用业界最新研制的固态封闭剂, 可有效防止核酸的污染。

LAMP 法具有的简便、快速、灵敏等特点, 可以实现对中药材的快速鉴定检测, 在中药鉴定中有着广阔的应用前景。更为重要的是, LAMP 技术对仪器设备的要求低、操作简单、成本低廉, 非常适合在生产实践中推广使用。不仅实现对中药材进行快速并高通量的分子鉴定, 而且更容易开发成检测现场的应用产品。随着 LAMP 技术的不断完善和改进, 其将在中药材的快速分子鉴定中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 赵新, 侯晓红. 核酸恒温扩增检测技术发展态势分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(3): 656-663.
- [3] 马丽敏. 核酸等温扩增技术研究进展 [J]. 浙江预防医学, 2013, 25(1): 24-27.
- [4] Tillmann R L, Simon A, Müller A, et al. Comparison of in-house PCR, rapid ELISA and NASBA technology for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimen [J]. *J Clin Virol*, 2008, 41(2): 168-169.
- [5] Ge Y, Cui L, Qi X, et al. Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification [J]. *J Virol Methods*, 2010, 163(2): 495-497.
- [6] Gusev Y, Sparkowski J, Raghunathan A, et al. Rolling circle amplification: A new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1): 63-69.
- [7] 张俊, 曾照芳. 滚环扩增技术的原理及其应用的研究 [J]. 生物信息学, 2012, 10(1): 12-14.
- [8] Kurn N, Chen P, Heath J D, et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(10): 1973-1981.
- [9] Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(8): 795-800.
- [10] Shi C, Liu Q, Ma C, et al. Exponential strand-displacement amplification for detection of microRNAs [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(1): 336-339.
- [11] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [12] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 2000, doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [13] 谌秋华, 杜朝阳. 环介导等温扩增技术的研究进展 [J]. 南昌大学学报: 医学版, 2013, 53(1): 93-95.
- [14] Sasaki Y, Komatsu K, Nagumo S. Rapid detection of *Panax ginseng* by loop-mediated isothermal amplification and its application to authentication of *Ginseng* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(9): 1806-1808.
- [15] Sasaki Y, Nagumo S. Rapid Identification of *Curcuma longa* and *C. aromatica* by LAMP [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(11): 2229-2230.
- [16] Sasaki Y, Fujimoto T, Aragane M, et al. Rapid and sensitive detection of *Lophophora williamsii* by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5): 887-891.
- [17] 吴军. 环介导等温扩增对何首乌及其混伪品的快速鉴定 [D]. 广州: 华南理工大学, 2009.
- [18] Chaudhary A A, Mohsin M, Ahmad A. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based technology for authentication of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [J]. *Protoplasma*, 2012, 249(2): 417-422.
- [19] 李奎, 李琦, 袁媛, 等. 环介导等温扩增法鉴定检测冬虫夏草 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1605-1608.
- [20] 江荧真. 台湾蒲公英及其误用品之分子鉴定研究 [D]. 台中: 中国医药大学, 2011.
- [21] 蒋超. 中药现场快速鉴别方法的建立——以金银花为例 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [22] 余淑琳, 蒋超, 黄璐琦, 等. 基于环介导等温扩增技术快速鉴别钩吻 [J]. 中药材, 2014, 37(4): 594-596.
- [23] 赵源, 宋云, 李明福, 等. 基于 LAMP 的人参物种鉴定技术的研究 [J]. 植物检疫, 2015, 29(5): 30-34.