DOI:10.12441/spyswjs.20240527004 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0137-09

水产品中GII型诺如病毒可视化LAMP法的建立及应用

姚婉婷[1] 李 想[2] 谢庆超[1,3,5] 欧 杰[1,3] 潘迎捷[1,3,4] 赵 勇[1,3,5] 刘海泉[1,3,4,5*]

(1. 上海海洋大学食品学院,上海 201306; 2. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心,上海 200135; 3. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心,上海 201306; 4. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海),上海 201306; 5. 上海海洋大学食品热加工工程技术研究中心,上海 201306)

摘要:【目的】基于环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)建立一种快速检测水产品中GII型诺如病毒的方法。【方法】针对诺如病毒的保守区域设计了4条引物,并对反应条件和反应体系进行优化。【结果】该反应的最佳体系为:*Bst* DNA聚合酶0.32 U/μL、$MgSO_4$ 10 mmol/L、dNTP 1.2 mmol/L、BIP 1.6 μmol/L、FIP 1.6 μmol/L、F3为0.4 μmol/L、B3为0.4 μmol/L;最佳反应条件为:63 ℃下反应50 min,随后升温至85 ℃继续反应5 min。建立的LAMP法能够特异性识别GII型诺如病毒,其灵敏度为1×10^{-7} ng/μL,优于传统PCR法。另外,对3种可视化染料进行了测试,结果表明SYBR Green I、苯酚红和羟基萘酚蓝(hydroxynaphthol blue,HNB)均对阳性和阴性结果有明显的颜色对比,因此可作为可视化染料。【结论】建立了一种快速、特异且操作简便的GII型诺如病毒检测方法,已成功用于水产品的检测。

关键词:环介导等温扩增;GII型诺如病毒;可视化;水产品

Establishment and Application of a LAMP Method for Visual Detection of Norovirus GII in Aquatic Products

YAO Wanting[1] *LI Xiang*[2] *XIE Qingchao*[1,3,5] *OU Jie*[1,3] *PAN Yingjie*[1,3,4] *ZHAO Yong*[1,3,5] *LIU Haiquan*[1,3,4,5*]

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine of Shanghai Customs District, Shanghai 200135, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 4. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China; 5. Engineering Research Center of Food Thermal-Processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to develop a method for the rapid detection of norovirus GII based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). [**Method**] Four primers were designed based on the conserved region of norovirus and the reaction system and conditions were optimized. [**Result**] The optimal reaction system was composed of 0.32 U/μL *Bst* DNA polymerase, 10 mmol/L $MgSO_4$, 1.2 mmol/L dNTP, 1.6 μmol/L BIP, 1.6 μmol/L FIP, 0.4 μmol/L F3, and 0.4 μmol/L B3. The optimal reaction conditions were reaction at 63 ℃ for 50 min and then at 85 ℃ for 5 min. The established LAMP method specifically recognized norovirus GII, with the sensitivity of 1×10^{-7} ng/μL, which was better than that of conventional PCR. In addition, three visualization

基金项目:上海市"科技创新行动计划"农业科技领域项目(22N31900600)。

通信作者:刘海泉(1980—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食源性致病菌的快速检测。E-mail:hqliu@shou.edu.cn

收稿日期:2024-05-27 **修回日期:**2024-08-30

dyes were screened. The results showed that SYBR Green I, phenol red, and hydroxynaphthol blue (HNB) demonstrated significant color contrast between positive and negative results, indicating that all the three dyes could be used for visualization. [**Conclusion**] A fast, specific, and simple method is successfully established for detecting norovirus GII and applied to the detection of aquatic products.

Keywords: loop-mediated isothermal amplification; norovirus GII; visualization; aquatic product

诺如病毒属于人类杯状病毒科，是一组无包膜的单链RNA病毒，具有二十面体衣壳对称性，是引起流行性肠胃炎的主要病原体之一，诺如病毒的大规模爆发会引发严重的公共卫生事件。诺如病毒爆发事件常见于学校、游轮、社区等聚集性场所，可导致大量人群患病[1]。随着对诺如病毒分型的深入研究，根据诺如病毒VP1序列可将诺如病毒分为10个基因组（GI—GX）以及49个基因型，其中能感染人类的基因组从3种增长到5种，包括GI、GII、GIV、GVIII和GX，而GIII和GV分别感染牛和鼠[2]。近年来，引发大规模诺如病毒爆发的基因亚型主要是GII.4和GII.17[3]。诺如病毒在秋冬季频发，潜伏期为10~51 h，感染人群大多为5岁以下儿童及免疫力较低的人群。据统计，在2018—2020年，我国西南地区5岁以下急性肠胃炎患病儿童中有32.5%是由诺如病毒引起的[4]。诺如病毒属于自限性疾病，虽然病程较短、症状较轻，但目前尚无特效药物治疗[5]。

GB 4789.42—2016[6]中规定的诺如病毒检测方法为实时荧光PCR（RT-PCR）法，该方法直观、准确且可定量，但需要专业的操作人员和大型仪器设备。近年来，现场快速检测（point-of-care testing，POCT）技术因其快速、便捷的特点逐渐成为热点，尤其适用于食源性致病菌及病原体的检测。诺如病毒容易造成聚集性爆发，需要及时隔离诊治感染者，从源头上控制传播。而POCT不依赖大规模设备及专业操作人员，可快速确定被污染的食品，满足快速检测诺如病毒的需求。目前，除了RT-PCR法，食品中诺如病毒的检测方法还包括酶促重组等温扩增（reverse transcription-enzymatic recombinase amplification，ERA）[7]、重组酶介导等温核酸扩增（recombinase aided amplification，RAA）[8]、逆转录微滴式聚合酶链式反应（reverse transcriptase droplet digital polymerase chain reaction，RT-ddPCR）[9]等。

LAMP是Notomi等[10]在2000年提出的一种恒温核酸扩增技术，通过2对内、外引物和1对加快反应速度的环引物，在DNA聚合酶的作用下形成杠铃状产物。其特点是不需要特定的大型设备，只需加热器即可完成，为现场检测提供了极大便利。目前，LAMP已广泛应用于食源性致病菌[11-15]、西尼罗河病毒[16]、食品中特定成分[17]、冠状病毒[18]等的检测。常用的可视化染料分为自发光型荧光染料、嵌合型荧光染料和pH依赖型染料。其中常见的自发光型荧光染料有HNB[19]和钙黄绿素-氯化锰[20]；嵌合型荧光染料以SYBR Green I[21]及SYTO系列染料[22]为主；根据LAMP反应前后体系的pH由碱性转为酸性的特性，染料变色范围需控制pH在6.8~8.4，如中性红和苯酚红等。

为降低食源性疾病的发生率，作者针对GII型诺如病毒保守区域设计引物，通过优化反应体系和条件进行特异性和灵敏度检测，并结合可视化染料，建立了一种GII型诺如病毒LAMP可视化快速检测方法。旨在降低反应后气溶胶危害并快速检测食品中的诺如病毒，为食品中诺如病毒的污染研究提供技术支持，有助于保障食品安全和减少食源性疾病的发生。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

GII型诺如病毒质粒、轮状病毒、札如病毒：作者所在实验室保存；实际样品RNA：作者所在实验室分离保存；LB肉汤、LB琼脂：北京陆桥技术股份有限公司；*Bst* DNA聚合酶、无酶水：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；WarmStart® RTx Reverse Transcriptase：New England Biolabs公司；琼脂糖、TE缓冲液、质粒、引物：生工生物工程（上海）有限公司；50×TAE缓冲液、HNB：北京索莱宝科技有限公司；SYBR Green I：上海吉至生化科技有限公司；D2000 Marker、质粒小提试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；苯酚红：上海麦克林生化科技股份有限公司；动物组织RNA提取试剂盒：

山东思科捷生物技术有限公司；质粒标准品：生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2　仪器与设备

超净台：HCB-1300VS型，青岛海尔生物医疗股份有限公司；−80 ℃低温冰箱：DW-86L338J型，青岛海尔生物医疗股份有限公司；电泳仪：DYY-6C型，北京市六一仪器厂；振荡器：Lab Dancer型，艾卡（广州）仪器设备有限公司；手掌型离心机：miniG型，艾卡（广州）仪器设备有限公司；鼓风干燥箱：DHG-9053A型，上海一恒科学仪器有限公司；凝胶成像系统：Invitrogen iBright型，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；PCR仪：Biometra TOne 96G型，北京耶拿分析仪有限公司。

1.3　试验方法

1.3.1　GII NoV核酸质粒构建

通过全基因合成的方式构建含有诺如病毒基因片段的重组质粒。具体操作为：选取GenBank登录号为X86557的诺如病毒基因序列，通过酶切连接插入pUC57质粒载体中，形成带有诺如病毒序列的重组质粒。

1.3.2　引物设计

从NCBI数据库中检索多条涵盖不同基因型及基因亚型诺如病毒的基因序列。利用DNAMAN软件进行对比分析，识别较为保守的区域，并用PrimerExplorer V5设计得到LAMP引物序列，同时通过Primer5设计得到PCR引物，引物序列见表1。

表1　LAMP和PCR引物序列

Table 1　Primers used for LAMP and PCR

反应体系	引物名称	引物序列（5′—3′）
LAMP	F3	GGCTCCCAGCTTTGTGAAT
	B3	CGCTCCACAGTATCTCACCT
	FIP	CGGGCTCCAGAGCCATAACCTTG ACGCCAACCCATCTGAT
	BIP	GTGGCGGGCCAACAAAACGTAA CTGTGAACTCTCCACCAGG
PCR	Nor-F	CAGATCTGAGCACGTGGGAG
	Nor-R	GGAGCGTTTCTAGGGGACAC

1.3.3　LAMP反应体系

25 μL反应体系为：模板1 μL、10×ThermoPol缓冲液2.5 μL、dNTP 1.4 mmol/L、$MgSO_4$ 8 mmol/L、FIP 1.6 μmol/L、BIP 1.6 μmol/L、F3为0.2 μmol/L、B3为0.2 μmol/L、*Bst* DNA聚合酶8 U，无酶水补足体积至25 μL。将混合物于65 ℃恒温反应60 min，再于80 ℃反应5 min。以无酶水作为阴性对照，反应结束后，取适量样品在2 g/dL的琼脂糖凝胶电泳上观察结果。

1.3.4　可视化反应

由于LAMP反应能够产生大量的目标产物，因此选择了3种可视化染料观察结果。包括开盖后添加的染料SYBR Green I、反应前添加的染料HNB和苯酚红。

1.3.5　灵敏度试验

以1×10^{-1} ng/μL的诺如病毒阳性质粒为母液，按照10倍梯度稀释的方式将样品逐步稀释至1×10^{-8} ng/μL。每个样品都进行灵敏度试验，并设置无酶水作为阴性对照。使用PCR进行灵敏度测试，PCR反应程序为：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，53 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，循环35次；之后于72 ℃反应5 min。

1.3.6　特异性试验

以优化的最佳反应条件和反应体系进行后续试验，分别以诺如病毒、轮状病毒和札如病毒为模板进行LAMP反应。反应结束后，分别取产物在2 g/dL的琼脂糖凝胶电泳上进行分析，并使用凝胶成像仪观察结果。

1.3.7　实际样品的检测

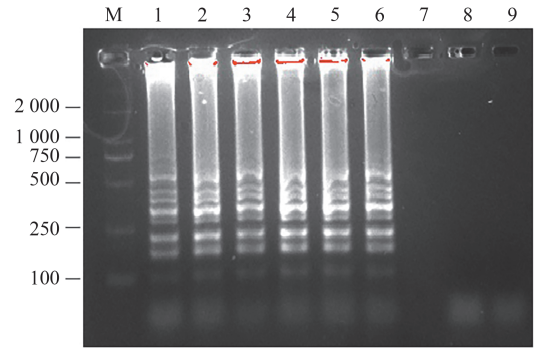
鉴于诺如病毒为RNA病毒，在其LAMP反应体系中添加逆转录酶，从而实现从RNA到DNA再到最终扩增产物的一站式转换，并结合染料实现结果的可视化。在2023年11月至2024年1月诺如病毒感染的高峰期，作者对市场上随机购买的95份水产品（包括白蛤、花蛤、淡菜、美贝、蛏子、牡蛎和小红扇贝）进行LAMP法检测，并与传统PCR法进行对比。

2　结果与讨论

2.1　最佳反应温度确定

根据LAMP反应的特性，设置6个温度梯度，分别为60、61、62、63、64、65 ℃，同时以无酶水代替模板作为阴性对照。反应体系为：模板1 μL、10×ThermoPol缓冲液2.5 μL、dNTP 1.4 mmol/L、$MgSO_4$ 8 mmol/L、FIP 1.6 μmol/L、BIP 1.6 μmol/L、F3为0.2 μmol/L、B3为0.2 μmol/L、*Bst* DNA聚合

酶 8 U，无酶水补足体积至 25 μL。首先在不同温度下反应 60 min，随后于 85 ℃反应 5 min，结果见图 1。当反应温度为 60 ℃时，观察到的反应条带相对较浅；随着温度的升高，条带逐渐变亮且清晰。当反应温度为 63 ℃时，条带的清晰度和亮度达到峰值。因此，选择 63 ℃为最佳反应温度。



M—D2000 Marker；1~6 分别表示反应温度为 60、61、62、63、64、65 ℃；7—空白泳道；8、9—阴性对照。

图 1　LAMP 反应温度确定

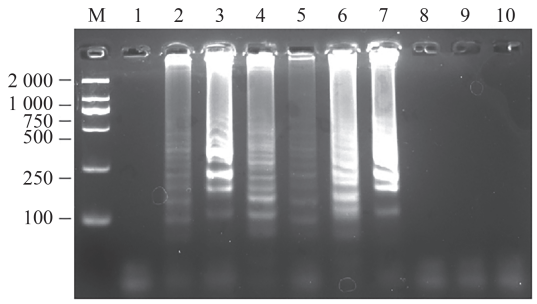
Fig. 1　Determination of the reaction temperature for LAMP

2.2　最佳反应时间确定

设置 8 个时间梯度，在 63 ℃分别反应 30、40、45、50、55、60、65、70 min，再于 85 ℃反应 5 min，同时以无酶水代替模板作为阴性对照。反应体系为：模板 1 μL、10×ThermoPol 缓冲液 2.5 μL、dNTP 1.4 mmol/L、$MgSO_4$ 8 mmol/L、FIP 1.6 μmol/L、BIP 1.6 μmol/L、F3 为 0.2 μmol/L、B3 为 0.2 μmol/L、*Bst* DNA 聚合酶 8 U，无酶水补足体积至 25 μL。LAMP 反应不同时间的结果见图 2，当反应时间为 40 min 时，开始出现较为清晰的条带；当反应时间延长至 50 min 时，条带的亮度和清晰度较高。综合考虑条带强度、亮度和效率，选择 50 min 为最佳反应时间。

2.3　最佳 *Bst* DNA 聚合酶浓度确定

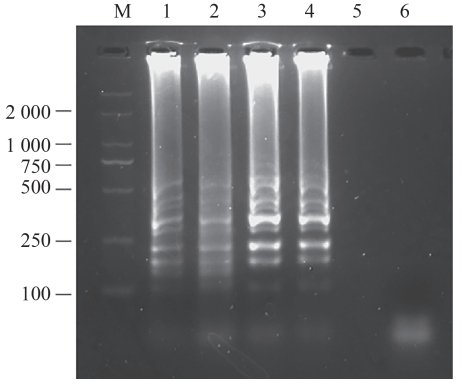
设置 4 个 *Bst* DNA 聚合酶浓度，分别向体系中添加 0.5、1.0、1.5、2.0 μL 酶液，对应的酶浓度依次为 0.16、0.32、0.48、0.64 U/μL，同时以无酶水代替模板作为阴性对照。反应体系为：模板 1 μL、10×ThermoPol 缓冲液 2.5 μL、dNTP 1.4 mmol/L、$MgSO_4$ 8 mmol/L、FIP 1.6 μmol/L、BIP 1.6 μmol/L、F3 为 0.2 μmol/L、B3 为 0.2 μmol/L，无酶水补足体积至 25 μL。反应条件为：首先在 63 ℃反应 50 min，随后于 85 ℃反应 5 min。在设置的 4 个酶浓度梯度下进行 LAMP 反应，结果见图 3。当酶浓度为 0.16 U/μL 时，即可扩增出产物且条带清晰可见；当酶浓度为 0.32 U/μL 时，亮度和条带最佳。因此，选择 0.32 U/μL 为最佳 *Bst* DNA 聚合酶浓度。



M—D2000 Marker；1~8 分别表示反应时间为 30、40、45、50、55、60、65、70 min；9—反应时间为 30 min 的阴性对照；10—反应时间为 70 min 的阴性对照。

图 2　LAMP 反应时间确定

Fig. 2　Determination of the reaction time for LAMP



M—D2000 Marker；1~4 分别表示酶浓度为 0.16、0.32、0.48、0.64 U/μL；5—空白泳道；6—阴性对照。

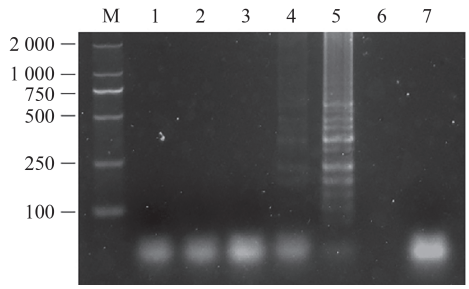
图 3　*Bst* DNA 聚合酶浓度的确定

Fig. 3　Determination of the *Bst* DNA polymerase concentration

2.4　最佳 Mg^{2+} 浓度确定

设置 5 个不同浓度的 Mg^{2+} 溶液，分别为 2、4、6、8、10 mmol/L。由于 10×ThermoPol 缓冲液中已含有 2 mmol/L 的 Mg^{2+}，因此需要添加 100 mmol/L $MgSO_4$ 溶液的体积分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 μL，同时以无酶水代替模板作为阴性对照。反应体系为：模板 1 μL、10×ThermoPol 缓冲液 2.5 μL、dNTP 1.4 mmol/L、FIP 1.6 μmol/L、BIP 1.6 μmol/L、F3 为 0.2 μmol/L、B3 为 0.2 μmol/L、*Bst* DNA 聚合酶 0.32 U/mL，无酶水补足体积至 25 μL。反应条件

为：首先在63 ℃反应50 min，随后于85 ℃反应5 min。不同Mg^{2+}浓度下的LAMP反应结果见图4，当Mg^{2+}浓度为8 mmol/L时，LAMP反应开始，条带略模糊但可见；当Mg^{2+}浓度增加到10 mmol/L时，条带清晰可见。因此，选择10 mmol/L为最佳Mg^{2+}浓度。



M—D2000 Marker；1~5分别表示Mg^{2+}浓度为2、4、6、8、10 mmol/L；6—空白泳道；7—阴性对照。

图4　Mg^{2+}浓度的确定

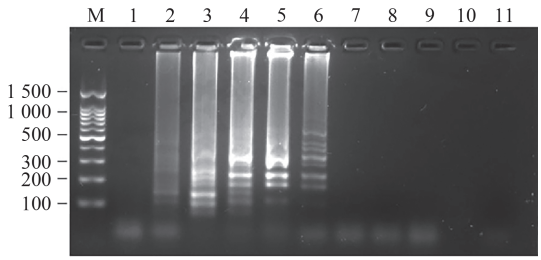
Fig. 4　Determination of the Mg^{2+} concentration

2.5　最佳dNTP浓度确定

设置9个不同浓度的dNTP，分别为0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mmol/L，同时以无酶水代替模板作为阴性对照。反应体系为：模板1 μL、10×ThermoPol缓冲液2.5 μL、$MgSO_4$ 10 mmol/L、FIP 1.6 μmol/L、BIP 1.6 μmol/L、F3为0.2 μmol/L、B3为0.2 μmol/L、*Bst* DNA聚合酶0.32 U/mL，无酶水补足体积至25 μL。反应条件为：首先在63 ℃反应50 min，随后于85 ℃反应5 min。不同dNTP浓度下的LAMP反应结果见图5，当dNTP浓度为0.4 mmol/L时，未发生LAMP反应；当dNTP浓度为0.6~1.2 mmol/L时，反应条带亮度和清晰度随着dNTP浓度的增加而增加；当dNTP浓度为1.2 mmol/L时，条带亮度和清晰度最佳；然而，当dNTP浓度≥1.4 mmol/L时，条带开始变得模糊甚至消失，可能是由于dNTP与溶液中的Mg^{2+}结合，从而抑制了体系中*Bst* DNA聚合酶活性，导致LAMP反应无法正常进行。因此，确定dNTP的最佳浓度为1.2 mmol/L。

2.6　最佳内外引物体积比确定

设置8个不同的内外引物体积比，见表2，添加的引物初始浓度均为10 μmol/L，同时以无酶水代替模板作为阴性对照。反应体系为：模板1 μL、10×ThermoPol缓冲液2.5 μL、dNTP 1.4 mmol/L、$MgSO_4$ 10 mmol/L、*Bst* DNA聚合酶0.32 U/mL，无酶水补足体积至25 μL。反应条件为：首先在63 ℃反应50 min，随后于85 ℃反应5 min。如图6所示，通过比较条带的清晰度和亮度，可见第1组和第2组效果最佳，因此采用第1组的内外引物体积比进行后续试验。



M—100 bp Marker；1~9分别表示dNTP浓度为0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mmol/L；10—空白泳道；11—阴性对照。

图5　dNTP浓度的确定

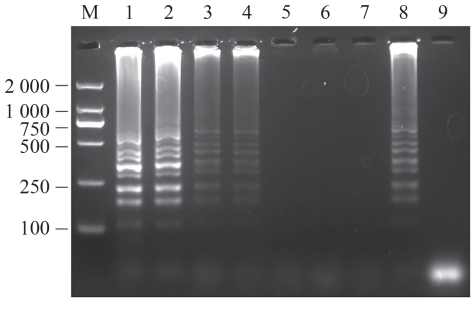
Fig. 5　Determination of the dNTP concentration

表2　不同内外引物体积比

Table 2　Different of inner/outer primer volume ratios

单位：μL

试验序号	FIP体积	BIP体积	F3体积	B3体积
1	4.0	4.0	0.50	0.50
2	4.0	4.0	0.25	0.25
3	2.0	2.0	2.00	2.00
4	1.0	1.0	1.00	1.00
5	1.0	1.0	2.00	2.00
6	1.0	1.0	4.00	4.00
7	0.5	0.5	2.00	2.00
8	2.0	2.0	0.50	0.50



M—D2000 Marker；1~8分别表示试验序号为1、2、3、4、5、6、7、8；9—阴性对照。

图6　内外引物体积比确定

Fig. 6　Determination of inner/outer primer volume ratio

2.7　可视化结果

根据LAMP反应特点，选择了3种可视化染料进行测试，结果见图7。在使用SYBR Green I

时，阳性样本呈黄绿色，而阴性样本则为淡黄色；当加入苯酚红时，阳性反应表现为浅橙色，阴性反应则为粉红色；而对于HNB染料，阳性结果呈现淡蓝色，阴性结果为淡紫色。可以看出，所选3种染料的阴性（右侧）和阳性（左侧）结果均可通过肉眼清晰分辨，因此3种染料均适用于LAMP反应的可视化检测。由于SYBR Green I需要在反应后加入体系，后续试验仅选用苯酚红和HNB作为可视化指示剂。



(a) SYBR Green I (b) 苯酚红 (c) HNB

图7 可视化染料结果

Fig. 7 Visualization results of different dyes

2.8 灵敏度试验

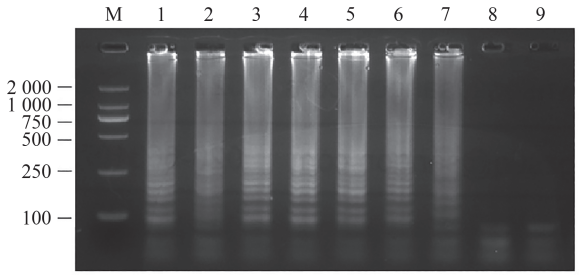
设置不同质量浓度的DNA进行检测，DNA质量浓度依次为1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6}、1×10^{-7}、1×10^{-8} ng/μL，结果见图8。通过琼脂糖凝胶电泳分析可以看出，所建立LAMP法的灵敏度可以达到1×10^{-7} ng/μL，而PCR法灵敏度仅为1×10^{-5} ng/μL，见图9。表明与PCR法相比，该研究建立的LAMP法具有更高的灵敏度。

2.9 特异性试验

通过检测诺如病毒、札如病毒和轮状病毒来验证引物的特异性，结果见图10。通过观察反应条带的生成情况，发现只有在添加了GII型诺如病毒的反应中产生了条带，而轮状病毒和札如病毒均未产生条带。表明引物具有良好的特异性，能够特异性扩增GII型诺如病毒，同时不会对其他相似病毒产生非特异性扩增。

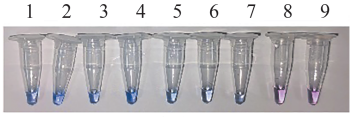
2.10 实际样品检测

对95个不同种类和来源的水产品进行LAMP检测，结果显示有11个阳性样本（编号为1、2、37、38、40、42、44、48、57、67、77），阳性检出率为10.5%，见图11。可视化结果与琼脂糖凝胶电泳结果一致。另外，作者抽取了市场上常见的贝类产品进行检测，并根据阳性样本的来源对其进行分类，LAMP和PCR的检出情况见表3。结果表明，PCR法仅识别



M—D2000 Marker；1~8分别表示DNA质量浓度为1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6}、1×10^{-7}、1×10^{-8} ng/μL；9—阴性对照。

(a) 琼脂糖凝胶电泳图



1~8分别表示DNA质量浓度为1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6}、1×10^{-7}、1×10^{-8} ng/μL；9—阴性对照。

(b) HNB

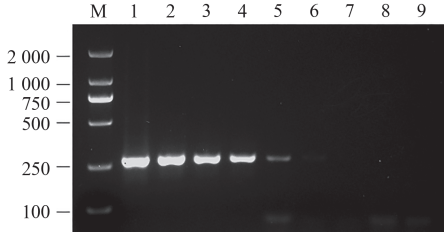


1~8分别表示DNA质量浓度为1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6}、1×10^{-7}、1×10^{-8} ng/μL；9—阴性对照。

(c) 苯酚红

图8 不同质量浓度DNA下LAMP反应

Fig. 8 Results of LAMP with DNA in different mass concentrations



M—D2000 Marker；1~8分别表示DNA质量浓度为1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6}、1×10^{-7}、1×10^{-8} ng/μL；9—阴性对照。

图9 不同质量浓度DNA下PCR反应

Fig. 9 Results of PCR with DNA in different mass concentrations

出7个阳性样品（编号为1、2、37、38、40、42、44），阳性检出率为7.4%，检出率低于LAMP法。

作者建立了HNB-LAMP法和苯酚红-LAMP法，并将其应用于市售水产品的检测。与HNB相比，苯酚红在实际应用中的颜色变化不够明显。同时使用PCR法和LAMP法对市售水产品进行GII型诺如病毒的初步检测。结果表明，使用LAMP法检测样品的阳性率为11.6%，而PCR法的阳性检出率为7.4%，进一步证实灵敏度越高的方法能够检测出更多的阳性样本。在实际样品检

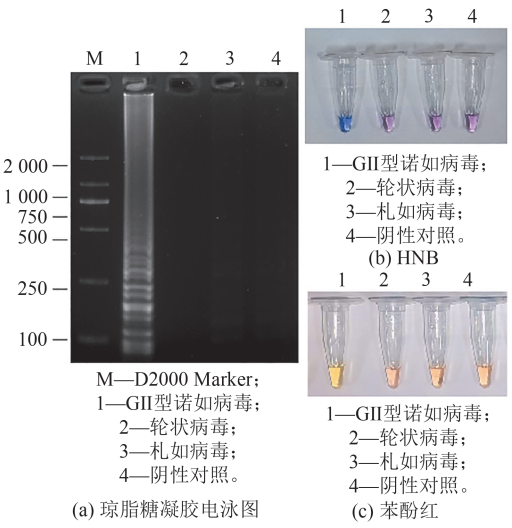


图 10　LAMP 法的特异性结果

Fig. 10　Results of specificity of the LAMP method

测中，发现蛏子中较容易检出GII型诺如病毒，其阳性检出率高达38.5%。这可能是由于蛏子是滤食性双壳贝类，容易在消化腺中富集诺如病毒。然而，在检测中未发现常见的诺如病毒“载体”牡蛎的阳性样品，推测这可能是由于市场上对牡蛎进行了净化处理，从而降低或去除了其体内的诺如病毒载量。

LAMP作为一种快速扩增技术，其最大的挑战在于开盖操作可能引发气溶胶污染，选择合适的染料可以有效降低这种风险。SYBR Green I可能会影响 *Bst* DNA 聚合酶的活性，从而阻碍LAMP反应的进行[23-24]，因此需要在LAMP反应完成后再添加到体系中。相比之下，苯酚红和HNB可以在反应开始前直接加入体系中，避免了反应后开盖产生气溶胶的风险。

郭艳飞[25]利用国家标准中GII型诺如病毒引物，通过RT-PCR对GII型诺如病毒标准品进行检测，并制作了标准曲线。李辉等[26]基于LAMP建立了快速检测牡蛎中诺如病毒的方法，将最佳温

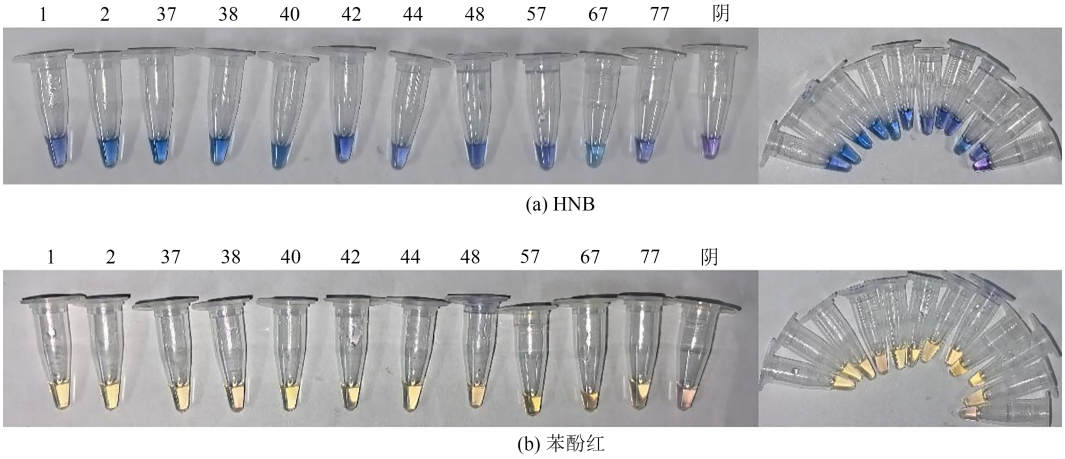


图 11　阳性样品可视化结果

Fig. 11　Visualization results of positive samples

表 3　阳性样本分布情况

Table 3　Distribution of positive samples

样品来源	总数/个	PCR阳性样本数/个	LAMP阳性样本数/个
白蛤	17	1	2
花蛤	19	1	1
蛏子	13	5	5
美贝	8	0	0
淡菜	6	0	1
牡蛎	11	0	0
小红扇贝	21	0	2
总计	95	7	11

度控制在65 ℃，并根据诺如病毒靶序列的6个独立区域设计了6条特异性引物，实现了在1 h内完成诺如病毒的检测。该方法不仅灵敏度高于RT-PCR法，而且不需要热循环器的参与。同时，LAMP反应快速的特点尤其适合进行现场检测。然而，LAMP反应结束后会产生大量扩增产物，如果此时打开离心管盖，极易污染环境。因此，LAMP结合可视化染料更能实现POCT的目的。Jeon等[27]以SYBR Green I作为可视化染料，采用LAMP法对牡蛎中的RNA进行LAMP快速扩增。

3 结论

该研究建立了一种基于苯酚红、HNB可视化快速检测GII型诺如病毒的方法。该方法可以在63 ℃于55 min内完成反应并显示结果，且成功从市售水产品中检测出GII型诺如病毒，具有良好的灵敏性和特异性。与常规PCR法相比，作者建立的可视化LAMP法更加快速、便捷且灵敏度更高，为后续快速检测水产品中的诺如病毒提供了技术基础。

参考文献

[1] 王军，何长生，王维，等. 磁珠法和柱式法提取核酸在新城疫荧光定量检测中的比较[J]. 中国动物保健，2021，23(3)：98.
WANG J，HE C S，WANG W，et al. Comparison of nucleic acid extraction by magnetic bead method and column method in fluorescence quantitative detection of Newcastle disease[J]. China Animal Health，2021，23(3)：98.(in Chinese)

[2] CHHABRA P，GRAAF M，PARRA G I，et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. Journal of General Virology，2019，100(10)：1393-1406.

[3] 吴冰珊，黄枝妙，林卫东，等. 2016—2021年福州市5岁以下儿童GII型诺如病毒分子流行特征分析[J]. 中国人兽共患病学报，2023，39(5)：471-477.
WU B S，HUANG Z M，LIN W D，et al. Molecular prevalent characteristics of GII norovirus in children under 5 years of age in Fuzhou from 2016 to 2021[J]. Chinese Journal of Zoonoses，2023，39(5)：471-477.(in Chinese)

[4] YANG L Y，SHI S L，NA C，et al. Rotavirus and norovirus infections in children under 5 years old with acute gastroenteritis in Southwestern China，2018—2020[J]. Journal of Epidemiology and Global Health，2022，12：292-303.

[5] 焦红燕，李国超，常亮，等. 诺如病毒疫苗研究概况[J]. 生物技术进展，2024，14(1)：17-25.
JIAO H Y，LI G C，CHANG L，et al. Overview of norovirus vaccine research[J]. Current Biotechnology，2024，14(1)：17-25.(in Chinese)

[6] 国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验：GB 4789.42—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2017.

[7] 吴占文，王帅，康婕，等. 双重荧光RT-ERA技术快速检测贝类食品中诺如病毒[J]. 食品科学，2023，44(18)：355-363.
WU Z W，WANG S，KANG J，et al. Rapid detection of norovirus in shellfish by dual fluorescence reverse transcription-enzymatic recombinase amplification[J]. Food Science，2023，44(18)：355-363.(in Chinese)

[8] 林志伟，杨艳歌，吴占文，等. GI和GII诺如病毒RAA可视化快速检测方法的建立[J]. 中国食品学报，2023，23(12)：196-208.
LIN Z W，YANG Y G，WU Z W，et al. Establishment of a visual recombinase aided amplification(RAA) method for rapid detection of GI and GII noroviruses[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2023，23(12)：196-208.(in Chinese)

[9] 徐蕾蕊，李丹，汪琦，等. 基于RT-dd PCR技术的食品中诺如病毒定量检测[J]. 食品科学，2022，43(20)：313-320.
XU L R，LI D，WANG Q，et al. Quantitative detection of norovirus in foods using reverse transcriptase droplet digital polymerase chain reaction[J]. Food Science，2022，43(20)：313-320.(in Chinese)

[10] NOTOMI T，OKAYAMA H，MASUBUCHI H，et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research，2000，28(12)：63.

[11] GARRIDO-MAESTU A，AZINHEIRO S，CARVALHO J，et al. Combination of microfluidic loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles for rapid detection of *Salmonella* spp. in food samples[J]. Frontiers in Microbiology，2017，8：2159.

[12] WANG Y，LI H，WANG Y，et al. Loop-mediated isothermal amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*[J]. Frontiers in Microbiology，2017，8：192.

[13] ZHAO Y M，JIANG X，QU Y Y，et al. *Salmonella* detection in powdered dairy products using a novel molecular tool[J]. Journal of Dairy Science，2017，100(5)：3480-3496.

[14] 田卓，郑秋月，麻丽丹，等. 水产品和水体中灿烂弧菌现场可视化环介导等温扩增快检方法的建立及应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2022，38(1)：108-119.
TIAN Z，ZHENG Q Y，MA L D，et al. Establishment and application of visual LAMP methods for quick detection of *Vibrio splendidus* in aquatic products and water[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology，2022，38(1)：108-119.(in Chinese)

[15] 王彦人，焦敬波，张钧森，等. LAMP在阪崎克罗诺杆菌检测中的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(2)：1-7.
WANG Y R，JIAO J B，ZHANG J S，et al. Progress of loop-mediated isothermal amplification in detection of

Cronobacter sakazakii[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2022,41(2):1-7.(in Chinese)

[16] CAO Z G, WANG H L, WANG L N, et al. Visual detection of West Nile virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a vertical flow visualization strip [J]. Frontiers in Microbiology,2016,7:554.

[17] SHI Y, FENG Y, XU C P, et al. Loop-mediated isothermal amplification assays for the rapid identification of duck-derived ingredients in adulterated meat[J]. Food Analytical Methods,2017,10(7):2325-2331.

[18] 赵云环,罗尚星,顾文源,等. 猪丁型冠状病毒可视化LAMP检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学,2022,52(1):19-24.
ZHAO Y H, LUO S X, GU W Y, et al. Development and application of a visual loop-mediated isothermal amplification assay for detection of porcine deltacoronavirus[J]. Chinese Veterinary Science, 2022, 52(1):19-24.(in Chinese)

[19] LUO J M, XU Z Q, NIE K, et al. Visual detection of norovirus genogroup II by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye[J]. Food and Environmental Virology,2014,6:196-201.

[20] 谢进维,张雪峰,辛玉璇,等. 构建染料显色RT-LAMP方法检测食源性HAV和HEV病毒的研究[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(6):686-690,709.
XIE J W, ZHANG X F, XIN Y X, et al. Creating a dye-based RT-LAMP technique to detect foodborne HAV and HEV[J]. Journal of Pathogen Biology, 2019, 14(6):686-690,709.(in Chinese)

[21] 罗鸿斌. 水环境中诺如病毒RT-LAMP快速检测方法的建立及应用[J]. 安徽农业科学,2017,45(15):57-59,84.
LUO H B. Establishment and application of RT-LAMP rapid detection method for Norwalk virus in water environment[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017,45(15):57-59,84.(in Chinese)

[22] 程汝佳,吴迪,张启龙,等. 山羊痘病毒属病毒荧光LAMP检测方法的建立与应用[J]. 畜牧与兽医,2022,54(11):92-99.
CHENG R J, WU D, ZHANG Q L, et al. Establishment and application of fluorescent LAMP for detection of *Capripoxvirus* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2022,54(11):92-99.(in Chinese)

[23] 张宇名,李树凡,陈志远,等. 牛病毒性腹泻病毒可视化一步RT-LAMP检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2022,52(8):985-991.
ZHANG Y M, LI S F, CHEN Z Y, et al. Establishment of a visual one-step RT-LAMP for detection of bovine viral diarrhea virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2022,52(8):985-991.(in Chinese)

[24] OSCORBIN I P, BELOUSOVA E A, ZAKABUNIN A I, et al. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP)[J]. BioTechniques,2016,61(1):20-25.

[25] 郭艳飞. 常规RT-PCR与荧光定量RT-PCR检测GI、GII型诺如病毒方法的研究和应用[J]. 中国医药指南,2021,19(6):122-123.
GUO Y F. Research and application the conventional RT-PCR and fluorescence quantitative RT-PCR in detection of GI, GII type of norovirus[J]. Guide of China Medicine, 2021,19(6):122-123.(in Chinese)

[26] 李辉,李雪梅,刘沙,等. 实时逆转录环介导等温扩增法快速检测GI型诺如病毒[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(9):3739-3743.
LI H, LI X M, LIU S, et al. Rapid determination of norovirus genogroup I by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Food Safety and Quality,2021,12(9):3739-3743.(in Chinese)

[27] JEON S B, SEO D J, OH H, et al. Development of one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for norovirus detection in oysters[J]. Food Control,2017,73:1002-1009.

（责任编辑：刘冬梅）