

重组酶介导的蓝氏贾第鞭毛虫特异性 等温核酸扩增方法的建立及评价

倪碧娴^{1,2}, 刘燕红³, 徐祥珍^{1,2}, 王晓婷^{1,2}, 吴小珉^{1,2}, 应清界³, 曹俊^{1,2}, 戴洋^{1,2*}

[摘要] **目的** 建立基于重组酶介导的等温扩增技术(RAA)的蓝氏贾第鞭毛虫核酸检测方法,并评价其检测敏感性和特异性。**方法** 选择蓝氏贾第鞭毛虫 β -贾第素(β -giardin)基因作为检测靶基因,设计、合成特异性检测引物及荧光探针,建立荧光RAA检测体系。分别以不同拷贝数的重组质粒(含 β -giardin基因靶序列)和不同浓度蓝氏贾第鞭毛虫基因组DNA为模板进行荧光RAA扩增,评价其检测敏感性;分别以蓝氏贾第鞭毛虫、日本血吸虫、华支睾吸虫、微小隐孢子虫、似蚓蛔线虫、沙门氏菌及志贺氏菌基因组DNA为模板进行扩增,评价其检测特异性。**结果** 成功建立了蓝氏贾第鞭毛虫荧光RAA检测方法,其可在等温(39℃)条件下实现对靶基因片段的快速、特异性扩增(20 min内)。分别以重组质粒和蓝氏贾第鞭毛虫基因组DNA为模板,该方法的检测敏感性可达 10^2 拷贝/ μ L和1 pg/ μ L;以日本血吸虫、华支睾吸虫、微小隐孢子虫、似蚓蛔线虫、沙门氏菌及志贺氏菌基因组DNA为模板的RAA检测结果均为阴性,具备较好特异性。**结论** 建立了一种操作简便、敏感、特异的可用于蓝氏贾第鞭毛虫核酸检测的荧光RAA方法。

[关键词] 蓝氏贾第鞭毛虫;核酸检测;重组酶介导等温扩增技术;荧光探针

[中图分类号] R382.2 **[文献标识码]** A

Establishment and evaluation of a novel DNA detection method based on re-combinase-aided isothermal amplification technique for *Giardia lamblia*

NI Bi-Xian^{1,2}, LIU Yan-Hong³, XU Xiang-Zhen^{1,2}, WANG Xiao-Ting^{1,2}, WU Xiao-Min^{1,2}, YING Qing-Jie³, CAO Jun^{1,2}, DAI Yang^{1,2*}

1 Key Laboratory of National Health Commission of Parasitic Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Key Laboratory on Parasite and Vector Control Technology, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China; 2 Public Health Research Center, Jiangnan University, China; 3 Jiangsu Qitian Gene Technology Co., Ltd., China

* Corresponding author

[Abstract] **Objective** To establish a novel nucleic acid assay for detection of *Giardia lamblia* based on the recombinase-aided isothermal amplification technique (RAA), and evaluate its sensitivity and specificity for detection of *G. lamblia*. **Methods** The specific primer sequences and fluorescent probes were designed and synthesized based on the *G. lamblia* β -giardin gene as the target gene, and a fluorescent RAA assay was established. The recombinant plasmids at various copies (containing the β -giardin gene target sequence) and the genomic DNA of *G. lamblia* at various concentrations were used as templates for the fluorescent RAA assay to assess the sensitivity, and the genomic DNA from *G. lamblia*, *Schistosoma japonicum*, *Clonorchis sinensis*, *Cryptosporidium parvum*, *Ascaris lumbricoides*, *Salmonella* and *Shigella* was used as templates to assess the specificity of the fluorescent RAA assay. **Results** A novel fluorescent RAA assay was successfully established for detection of *G. lamblia*, which allowed the rapid and specific amplification of the target gene fragments at 39℃ within 20 min. The sensitivities of the fluorescent RAA assay were 10^2 copies/ μ L and 1 pg/ μ L for detection of the recombinant plasmid and *G. lamblia* genomic DNA, respectively, and the fluorescent RAA assay was negative for detection of the genomic DNA from *S. japonicum*, *C. sinensis*, *C. parvum*, *A. lumbricoides*, *Salmonella* and *Shigella*, which showed a high specificity. **Conclusion** A fluorescent RAA assay, which is simple, sensitive and specific, is successfully established for nucleic acid detection of *G. lamblia*.

[Key words] *Giardia lamblia*; Nucleic acid detection; Recombinase-aided isothermal amplification; Fluorescent probe

[基金项目] 江苏省“科教强卫工程”项目(ZDXKA2016016);省属公益类科研院所自主科研项目(BM2018020);江苏省青年医学人才项目(QN-RC2016622);江南大学公共卫生研究中心青年项目(JUPH2018)

[作者单位] 1 国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室、江苏省寄生虫与媒介控制技术重点实验室、江苏省血吸虫病防治研究所(无锡214064);2 江南大学公共卫生研究中心;3 江苏省奇天生物科技有限公司

[作者简介] 倪碧娴,女,硕士,医师。研究方向:寄生虫病防治

* 通信作者 E-mail: 15951581011@163.com; ORCID: 0000-0003-1489-9080

[数字出版日期] 2020-03-31 10:24

[数字出版网址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20200330.1110.001.html>

蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*, 简称贾第虫)是一种主要寄生于人或哺乳动物小肠内的原虫,偶可侵犯胆道系统,引起贾第虫病,主要表现为消化不良、腹泻等临床症状^[1]。包囊是贾第虫的感染阶段,随粪便排出体外,人或动物常因摄入被包囊污染的食物或饮用水而被感染。贾第虫病呈世界性分布,全球每年约有2亿人感染贾第虫,多数病人主要集中在发展中国家^[2]。据WHO估计,全球贾第虫感染率为1%~30%^[3],其中发达国家感染率为0.2%~29.2%^[4],而我国各地区贾第虫感染率在0.4%~16.2%^[5-8]。贾第虫是一种重要的机会致病原虫,在HIV感染者中感染率为4.3%~7.9%^[9-10]。贾第虫病流行与当地经济水平、生活环境、卫生意识和生活方式等存在密切关系,已被列为全球危害人类健康的10种主要寄生虫病之一^[11]。

目前,人体贾第虫感染众多诊断方法(包括病原学、免疫学和分子生物学方法等)中,病原学方法仍是临床诊断的“金标准”,即采集粪便进行直接涂片或特殊染色后于显微镜下检测是否存在贾第虫包囊或滋养体,该法存在费时费力、敏感性及特异性均不高等缺点,且在发生暴发疫情时,无法满足在短时间内进行大量样本检测的需求,同时要求检测人员具备较高的原虫镜检技能^[12]。目前,已有多种商业化贾第虫免疫诊断试剂盒,其中以酶联免疫吸附试验(ELISA)和离子色谱法(IC)为主,结果易判读,但均为进口产品,价格昂贵,难以在现场或基层等推广使用^[13]。基于PCR原理的分子生物学检测方法具有灵敏度高及特异性好等优势,但其对操作人员技能、检测所需设备及场所要求均较高,尤其是其检测时间较长(通常1.5~2 h),一定程度上影响了检测结果获取。此外,我国《生活饮用水标准检测方法(GB/T 5750.12-2006)》中规定的贾第虫测定方法是免疫磁分离荧光抗体法^[14],其检测流程包括过滤、淘洗、免疫磁分离、荧光染色及镜检等诸多步骤,操作费时繁琐,一般需要1~2 d、对实验人员操作技能要求高、荧光镜检时容易漏检,且所用仪器及试剂耗材均依赖进口,高昂的检测成本限制了其在基层的普及。因此,建立简便、快速、高效的贾第虫核酸检测技术是目前贾第虫感染检测及水质监测的迫切需求。

重组酶介导的等温核酸扩增技术(Recombinase-aided isothermal amplification, RAA)是利用从细菌或真菌中获得的重组酶介导在等温情况下(一般为37~42℃)进行的核酸快速扩增技术,相较于PCR、环介导等温扩增(LAMP)等核酸检测技术,该技术具有操作简单、反应快速等优势,在5~20 min内即可实现对靶

标基因片段的指数级扩增,设计引入荧光检测探针后可对结果进行实时检测,特别适合在有大量样品的非实验室检测场所使用^[15]。目前该技术已成功应用于寄生虫、病毒和细菌等多种病原体检测,均显示出较高的灵敏度及特异性^[16-19]。

本研究拟基于RAA技术平台,建立贾第虫等温扩增核酸检测方法,并评价其检测灵敏度及特异性,旨在为贾第虫检测提供一种简便、快速、敏感、高效的新方法。

材料与方法

1 材料

1.1 样本来源 贾第虫由中山大学伦照荣教授惠赠,日本血吸虫、华支睾吸虫、微小隐孢子虫、似蚓蛔线虫等虫卵均由国家卫生健康委员会寄生虫病预防与控制技术重点实验室保存。志贺氏菌和沙门氏菌由江苏省奇天基因生物科技有限公司提供。

1.2 主要仪器设备 恒温振荡器、荧光核酸检测仪(江苏奇天基因生物科技有限公司);凝胶成像系统(Bio-Rad公司);NanoDrop 2000核酸蛋白浓度测定仪(ThermoFisher公司);离心机(Eppendorf公司);-80℃超低温冰箱(海尔公司)。

1.3 主要试剂 QIAamp PowerFecal 粪便微生物DNA提取试剂盒(Qiagen公司);质粒抽提试剂盒(Promega公司);组织DNA提取试剂盒、RAA核酸扩增反应试剂(江苏奇天基因生物科技有限公司);溴化乙锭、50×TAE缓冲液、琼脂糖(北京索莱宝科技有限公司);引物、探针及质粒均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2 方法

2.1 核酸提取 采用组织DNA提取试剂盒抽提贾第虫、微小隐孢子虫、志贺氏菌、沙门氏菌基因组DNA,操作步骤参照试剂盒说明书进行;采用QIAamp PowerFecal 粪便微生物DNA提取试剂盒抽提日本血吸虫虫卵、华支睾吸虫虫卵、似蚓蛔线虫虫卵基因组DNA,参照试剂盒说明书进行操作。所有获取的DNA样本经测定浓度后,-80℃保存备用。

2.2 RAA方法的建立

2.2.1 靶标筛选、引物及探针设计 选择贾第虫β-贾第素(*β-giardin*)基因作为检测目的基因,于GenBank数据库中获取其全基因序列,采用DNAMAN 7.0软件进行同源性比对,筛选出高度保守的核酸片段作为本研究检测靶标。采用Ampliflix软件设计上、下游扩增引物及检测探针序列,经筛选,上游引物:5'-TCAG-

GAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACG-3';下游引物:5'-AGCTTCGTGTTTGTGAGCGCTTCTGTCGTG-3';荧光探针:5'-TYGCCACGGAGAACGCMGARAG-GAAGAAGA(BHQ1-dT)(THF)(FAM-dT)AYGAC-CAGCTCAACG-3'(其中FAM为荧光报告基团,THF为四氢呋喃残基,BHQ1为荧光淬灭基团)。

2.2.2 RAA基础反应体系的建立 以抽提的贾第虫基因组DNA为模板,配置RAA基础反应体系,其中包含Tris缓冲液(25~75 mmol/L)、醋酸镁(5~15 mmol/L)、醋酸钾(25~75 mmol/L)、聚乙二醇(5%~10%)、二硫苏糖醇(2.5~10 mmol/L)、磷酸肌酸(25~50 mmol/L)、肌酸激酶(2.7~4.3 $\mu\text{g}/\text{U}$)、SSB蛋白(800 ng/ μL)、ATP(5~10 mmol/L)、dNTPs(1~2 mmol/L)、RecQ蛋白(10 ng/ μL)、UvsY蛋白(50 ng/ μL)、UvsX蛋白(60 ng/ μL)、DNA聚合酶(50 ng/ μL)、重组酶、上下游引物(各10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、贾第虫基因组DNA,总反应体系为50 μL 。混匀以上反应体系,置于RAA-B6100恒温振荡器中39 $^{\circ}\text{C}$ 20 min。加入50 μL 酚/氯仿(1:1),充分振荡混匀,12 000 $\times g$ 离心1 min,吸取10 μL 上层溶液进行琼脂糖凝胶电泳(1.5%凝胶,100 V)60 min,经溴化乙锭(0.5 ng/ μL)染色后,采用凝胶成像系统观察结果,并拍照。

2.2.3 荧光RAA反应体系的建立 反应体系共50 μL ,包括反应缓冲液(25 μL)、双蒸水(12.7 μL)、上游引物(2.1 μL , 420 nmol/L)、下游引物(2.1 μL , 420 nmol/L)、荧光探针(0.6 μL , 120 nmol/L),充分混匀后,反应单元管盖中加入醋酸镁溶液(2.5 μL , 280 mmol/L),最后于反应单元中加入贾第虫基因组DNA(5 μL)。采用RAA-B6100恒温振荡器充分混匀以上反应体系,并置于RAA-F1620荧光检测仪中进行扩增,反应条件为39 $^{\circ}\text{C}$,时间20 min,其中每20 s采集1次荧光信号值并绘制实时RAA荧光扩增曲线,根据荧光扩增曲线的斜率值,判定检测结果(斜率值 $K < 20$ 时判定为阴性, $K \geq 20$ 时则判定为阳性)。

2.3 荧光RAA法敏感性评价

2.3.1 重组质粒(含 β -giardin近靶序列)为模板 来源于 β -giardin基因保守序列的检测靶标(片段长度315 bp)TA克隆入pGEM-T质粒载体,筛选获得含重组质粒的DH5 α 克隆菌株,采用质粒抽提试剂盒获得重组质粒,操作参照试剂盒说明书进行。分别以含 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10拷贝/ μL 等不同拷贝数的重组质粒为模板进行荧光RAA扩增(反应体系及判定标准参照2.2.3),观察扩增结果,评价其检测敏感性。

2.3.2 贾第虫基因组DNA为模板 将初始浓度为38

ng/ μL 的贾第虫基因组DNA分别稀释至10、1、0.1、0.01 ng/ μL 和1 pg/ μL 等不同浓度的标准品工作液,分别以此为模板进行RAA荧光扩增(反应体系及判定标准参照2.2.3),观察扩增结果,进一步评价其检测敏感性。

2.4 荧光RAA法特异性评价 分别以贾第虫、日本血吸虫、华支睾吸虫、微小隐孢子虫、似蚓蛔线虫、志贺氏菌、沙门氏菌基因组DNA为模板,进行荧光RAA扩增(反应体系及判定标准参照2.2.3),观察扩增结果,评价其检测特异性。

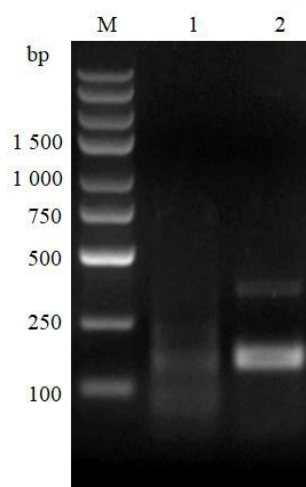
3 伦理学声明

本研究获得江苏省血吸虫病防治研究所伦理审查委员会批准通过。

结 果

1 基础RAA反应结果

以贾第虫基因组DNA为模板的RAA基础扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色后,紫外灯下可见一特异性条带,长度约为205 bp(图1)。



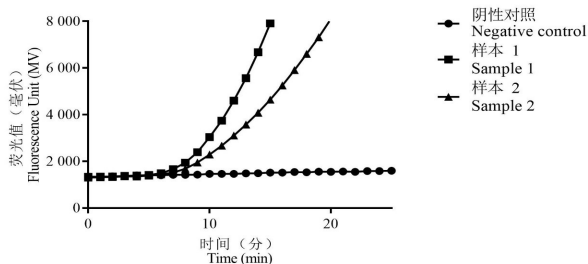
注:M DNA分子质量标志物;1 阴性对照;2 贾第虫基因组DNA
Note: M DNA molecular marker; 1 Negative control; 2 *G. lamblia* genomic DNA

图1 贾第虫基因组RAA电泳结果

Fig. 1 1.5% agarose gel electrophoresis results of RAA amplification products using *G. lamblia* genomic DNA as a template

2 荧光RAA反应结果

以贾第虫基因组DNA为模板,重复2次荧光RAA扩增,同时设置阴性对照。结果显示,以贾第虫基因组DNA为模板的RAA反应,在10 min时均出现阳性扩增,结果判定为阳性,而对照组则无扩增信号(图2)。



注:样本1、2均为贾第虫基因组DNA

Note: Samples 1 and 2 are both genomic DNA of *G. lamblia*

图2 贾第虫基因组DNA为模板的荧光RAA扩增结果

Fig. 2 Fluorescent RAA assay using *G. lamblia* genomic DNA as a template

3 荧光RAA法检测敏感性

3.1 以重组质粒(含 β -giardin靶序列)为模板 将 β -giardin基因315 bp片段的检测靶标TA克隆入pGEM-T质粒载体,筛选获得含重组质粒的DH5 α 克隆菌株。以不同拷贝数的重组质粒(含 β -giardin基因靶序列)为模板,在5 min时即可见明显扩增;随着拷贝数的降低,RAA扩增的起峰时间逐渐延长(图3)。结果显示,该检测方法的灵敏度可达到 10^2 拷贝/ μ L。

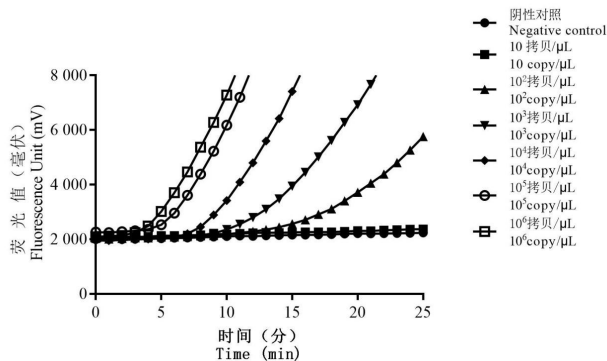


图3 以不同拷贝数重组质粒为模板的荧光RAA法检测结果

Fig. 3 Results of fluorescent RAA assay using recombinant plasmids at various copies as templates

3.2 以贾第虫基因组DNA为模板 以不同浓度贾第虫基因组DNA为模板,5 min时即可见明显扩增;随着基因组DNA浓度降低,RAA扩增的起峰时间逐渐延长。除阴性对照无扩增外,浓度分别为10、1、0.1、0.01 ng/ μ L和1 pg/ μ L的贾第虫基因组DNA样本在20 min内均出现明显扩增,检测灵敏度达到1 pg/ μ L(图4)。

4 荧光RAA法检测特异性

贾第虫基因组DNA样本在10 min时即出现阳性荧光扩增,而日本血吸虫、华支睾吸虫、微小隐孢子虫、似蚓蛔线虫、志贺氏菌及沙门氏菌等6种病原体基因组DNA样本均未得到扩增(图5),提示本研究建立的贾第虫荧光RAA检测方法具有较好特异性。

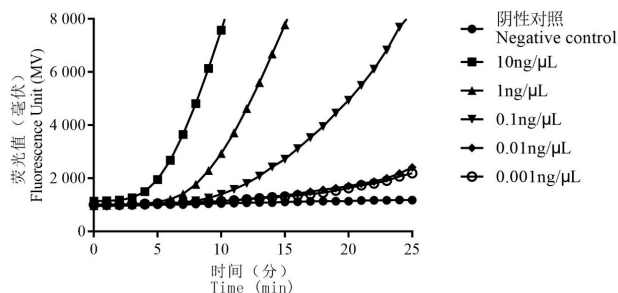


图4 以不同浓度贾第虫DNA为模板的荧光RAA法检测结果

Fig. 4 Results of fluorescent RAA assay using *G. lamblia* genomic DNA at different concentrations as templates

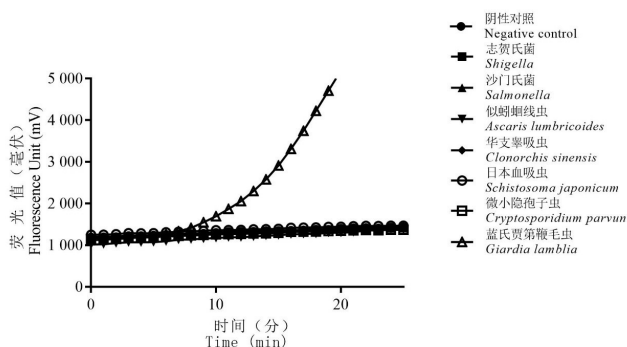


图5 以不同病原体基因组DNA为模板的荧光RAA法特异性检测结果

Fig. 5 Specificity of fluorescent RAA assay using the genomic DNA of different pathogens as templates

讨 论

近年来,新型分子生物学检测技术不断涌现,等温核酸扩增技术凭借其反应条件简单(无须温度梯度)、高敏感性、特异性等优势,在临床检测中得到了越来越广泛的应用。目前在等温核酸扩增技术方面,研究较多的主要为LAMP及重组酶聚合酶扩增技术(RPA)。LAMP技术已用于华支睾吸虫^[20]、隐孢子虫^[21]等病原体核酸检测研究,但该方法引物设计复杂,且存在不易区分非特异性扩增、假阳性率较高等不足。RPA技术是基于噬菌体的重组酶复制原理,在37~42℃、30 min内即可实现对目的片段的快速扩增;但该方法所用试剂目前均依赖进口,成本较高且货源不稳定,限制了其进一步推广^[22]。本研究中采用的基于RAA的核酸检测方法,引物设计简单,可在恒温条件下(一般37~42℃)实现对核酸片段的快速扩增,并且引入了特异性荧光检测探针,可实时获取检测结果,具有较高的检测敏感性和特异性,完全实现

了国产化,具有独立知识产权,尤其适合在现场进行快速检测^[23]。

贾第虫分子生物学检测的靶标主要有谷氨酸脱氢酶(GDH)基因^[24]、 β -贾第素基因^[25]和磷酸丙糖异构酶(TPI)基因^[26]。本研究选择的靶标基因 β -giardin为贾第虫特异性骨架蛋白基因^[27],构建的荧光RAA法以重组质粒为模板及不同浓度贾第虫基因组DNA为模板的检测灵敏度分别为 10^2 拷贝/ μ L及 1 pg/ μ L。既往已建立了LAMP和巢氏PCR等贾第虫核酸检测技术,其中LAMP法反应温度和时间分别为 65°C 、 60 min及 80°C 、 10 min;有研究以贾第虫核糖体RNA基因间隔区为靶序列成功建立了巢氏PCR检测方法,其检测灵敏度为 2.5 pg/ μ L^[28-29]。本研究成功建立了一种可用于贾第虫核酸检测的荧光RAA方法,该方法可在 39°C 、 20 min内即完成对样本的检测,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性好以及实时检测等优势;且灵敏度略高于巢氏PCR法。由于样本来源限制,本研究仅以日本血吸虫、华支睾吸虫、微小隐孢子虫、似蚓蛔线虫、志贺氏菌、沙门氏菌等病原体基因组DNA为模板进行了特异性评价,结果显示较高的检测特异性。但贾第虫属于原虫动鞭毛纲,后续研究中将通过纳入人毛滴虫、溶组织阿米巴、脆弱双核阿米巴、微孢子虫等肠道寄生原虫,以进一步更客观、全面地评价该方法用于检测贾第虫的特异性。

综上所述,本研究成功构建了一种针对贾第虫 β -giardin基因特异性核酸序列的荧光RAA检测方法。进一步将采用该技术对水体和粪便等实际样本中贾第虫检测效能进行评价,为该方法的推广及应用提供数据支撑。

【参考文献】

- [1] 诸欣平,苏川.人体寄生虫学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2018:48-51.
- [2] Li JQ, Wang HY, Wang RJ, et al. *Giardia duodenalis* infections in humans and other animals in China[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2004.
- [3] 王中全,崔晶.贾第虫流行病学研究进展[J].国外医学:寄生虫病分册,2005,32(3):99-105.
- [4] Fletcher SM, Stark D, Harkness J, et al. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(3): 420-449.
- [5] Liu H, Shen Y, Yin J, et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 25.
- [6] 刘华,沈玉娟,张玉梅,等.临床腹泻患者贾第虫感染和分子特征研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2015,27(2):152-155.
- [7] 袁忠英,姜岩岩,何祖安,等.湖北赤壁市农村儿童感染贾第虫的初步分析[J].国际医学寄生虫病杂志,2015,42(2):86-88.
- [8] 许隆祺,蒋则孝,姚民一,等.我国人体寄生虫的虫种概况[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1997,15(5):57-59.
- [9] Habtom K, Endalkachew N, Abaineh M, et al. Prevalence of intestinal protozoan infections among individuals living with HIV/AIDS at Felegehiwot Referral Hospital, Bahir Dar, Ethiopia[J]. Int J Infect Dis, 2015, 35: 80-86.
- [10] Shimelis T, Tassachew Y, Lambyo T. *Cryptosporidium* and other intestinal parasitic infections among HIV patients in southern Ethiopia: significance of improved HIV-related care[J]. Parasit Vectors, 2016, 9(1): 270.
- [11] Sandhu H, Mahajan RC, Ganguly NK. Flow cytometric assessment of the effect of drugs on *Giardia lamblia* trophozoites in vitro[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 265(1/2): 151-160.
- [12] Joseph AB. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis[J]. CRC Crit Rev Clin Lab Sci, 1977, 7(4): 373-391.
- [13] 章乐生,王燕娟,曹建平.贾第虫病免疫学诊断方法及其研究进展[J].中国血吸虫病防治杂志,2017,29(3):385-387,392.
- [14] 中华人民共和国卫生部.生活饮用水标准检验方法微生物指标(GB/T 5750.12-2006)[S].北京:中国标准出版社,2007:19-30.
- [15] 吕蓓,程奇,程海荣,等.用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J].中国科学:生命科学,2010,40(10):983-988.
- [16] 张强,丁昕,吴小珉,等.重组酶介导的华支睾吸虫特异性核酸等温扩增方法的建立及初步评价[J].中国血吸虫病防治杂志,2019,31(5):468-473.
- [17] Clarke C, O'Connor L, Carre-Skinner HA, et al. Development and performance evaluation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of group B streptococcus[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 221.
- [18] 倪碧娟,吴小珉,刘燕红,等.重组酶介导的隐孢子虫属特异性等温核酸扩增方法的建立及评价[J].中国血吸虫病防治杂志,2019,31(4):388-392,399.
- [19] 郑伟,徐琦,罗鹏,等.重组酶介导扩增方法快速检测黄热病毒[J].中国卫生检验杂志,2016,26(1):1-3.
- [20] Chen Y, Wen T, Lai DH, et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Clonorchis sinensis* from its first intermediate hosts, freshwater snails[J]. Parasitology, 2013, 140(11): 1377-1383.
- [21] 史亚东,董海聚,王荣军,等.微小隐孢子虫LAMP检测方法的探索[J].中国人兽共患学报,2012,28(12):1195-1201.
- [22] 吕蓓,程海荣,严庆丰,等.体外核酸快速扩增技术的发展和不断创新[J].中国生物工程杂志,2011,31(3):91-96.
- [23] Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes[J]. Biosens Bioelectron, 2015, 64: 196-211.
- [24] Wang YF, Gonzalez-Moreno O, Roellig DM, et al. Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain[J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 432.
- [25] Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Simone MC, et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a β -Giardin nested polymerase chain reaction assay[J]. J Parasitol, 2005, 91(1): 203-205.
- [26] Yu FC, Amer S, Meng Q, et al. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolated from patients in Egypt[J]. Acta Trop, 2019, 196: 66-71.
- [27] Crossley R, Holberton DV. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*[J]. J Cell Sci, 1983, 59: 81-103.
- [28] 卢维媛,袁忠英,沈玉娟,等.环介导等温扩增技术检测蓝氏贾第鞭毛虫[J].国际医学寄生虫病杂志,2010,37(3):145-147.
- [29] Ghosh S, Debnath A, Sil A, et al. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene[J]. Mol Cell Probes, 2000, 14(3): 181-189.