

环介导等温扩增技术在呼吸道病原体检测中的应用

张嘉睿, 王心如, 姜 爽, 杨雨婷, 章婷婷, 张 妍, 孟凡达*

山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所), 山东 济南

收稿日期: 2025年10月4日; 录用日期: 2025年10月28日; 发布日期: 2025年11月4日

摘 要

早期检测对于人体呼吸道疾病的预防和控制有着重要作用。环介导等温扩增技术(LAMP)具有高特异性、高灵敏度的特点, 在30 min内即可完成检测反应且成本低廉, 因此广泛应用于呼吸道疾病的早期诊断中。多重LAMP (mLAMP)、逆转录LAMP (RT-LAMP)等的出现促进了该领域的范式改变, 使LAMP的应用范围进一步扩展至RNA病毒、单管多病原体筛查和即时检测等。本文系统梳理了呼吸道病毒的病原特征, 重点介绍了LAMP在人类呼吸道病毒识别中的应用, 并探讨了引物设计原理、多种结果判读方法以及微流控集成技术等。最后, 我们总结了LAMP技术从实验室研究向一线诊断转化所面临的实际问题 and 关键障碍, 如标准化、临床验证和监管审批等。

关键词

环介导等温扩增技术, 呼吸道病毒, 基因检测

Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology in the Detection of Respiratory Pathogens

Jiarui Zhang, Xinru Wang, Shuang Jiang, Yuting Yang, Tingting Zhang, Yan Zhang, Fanda Meng*

School of Clinical and Basic Medical Sciences, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan Shandong

Received: October 4, 2025; accepted: October 28, 2025; published: November 4, 2025

*通讯作者。mengfind@163.com

Abstract

Early detection plays a pivotal role in the prevention and control of human respiratory diseases. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is characterized by high specificity and sensitivity, completes the reaction within 30 min at low cost, and is therefore widely used for early diagnosis of respiratory infections. The emergence of multiplex LAMP (mLAMP), reverse-transcription LAMP (RT-LAMP), and related variants has shifted the paradigm, extending LAMP to RNA viruses, single-tube multi-pathogen screening, and point-of-care testing. Here we systematically outline the pathogenic features of respiratory viruses, highlight the applications of LAMP in identifying human respiratory viruses, and address primer-design principles, diverse read-out strategies, and microfluidic integration. Finally, we summarize the practical challenges and key barriers, such as standardization, clinical validation, and regulatory approval, that must be cleared before LAMP can transition from laboratory curiosity to front-line diagnostics.

Keywords

Loop-Mediated Isothermal Amplification, Respiratory Virus, Genetic Detection

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

呼吸道感染由于发病率高、传播速度快，对人民的健康构成极大威胁。常见的呼吸道感染由病毒、细菌和支原体引起，临床上多以病毒感染为主。能够引起呼吸道感染的病毒包括甲型流感病毒、腺病毒、新型冠状病毒、鼻病毒和人类偏肺病毒等，这些病毒主要通过飞沫、密切接触等方式传播[1]。呼吸道感染的临床表现多样，急性疾病的主要症状为咳嗽、呼吸困难甚至呼吸衰竭；慢性疾病则会导致肺功能发生不可逆转地下降，影响日常生活，还可能进一步引发全身多系统并发症，若累及神经系统，还可能造成感觉障碍等精神类疾病。不同呼吸道病原体的传播虽然具有很强的时间和强度差异，但仍可以通过科学的检测方法判断其总体传播趋势，在一定程度上表现出可预测性[2]。由于病毒持续变异，新毒株不断出现，呼吸道病毒感染的检测难度显著增大，成本显著上升，精准高效的呼吸道疾病病毒检测对公共卫生安全有重大意义。

随着分子诊断技术的发展，核酸扩增检测(NAAT)成为明确呼吸道感染病原体的主要手段。临床上常用的 NAAT 检测主要包括实时荧光 PCR (qPCR)、转录介导扩增(TMA)、巢式 PCR 以及数字 PCR，极大地提升了检测性能[3]，但仍存在成本高、耗时长等局限，难以满足日益增长的检测需求。因此我们亟需将快速、高效、成本低廉的新技术应用在该领域中。

环介导等温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)正是一种快速高效的新型核酸扩增技术，其核心是利用专门设计的特殊引物和具有链置换活性的 DNA 聚合酶(Bst DNA 聚合酶)，在恒温条件下实现对目标核酸序列的精准扩增。LAMP 无须精密的热循环设备，整个反应仅需在 60℃~65℃ 的恒温条件下进行，目前已有的相关研究证实，相较于传统检测方法，LAMP 具有更高灵敏度和高特异性，反应时长通常在 30~60 min。另外，LAMP 可以通过所加入显色染料的颜色变化或反应产生沉淀的有无，实现检测结果的可视化，全过程迅速直观。LAMP 弥补了传统检测方法的不足，具有广阔的发展

前景。在临床应用场景下, LAMP 凭借其简单快速、抗干扰能力强、灵敏度高和特异性强等优势, 大大减少了检测对实验设备的依赖, 实现了病原体的快速筛查, 大幅降低了检测门槛, 保障了检测的可行性。

为了满足日益增长的临床诊断需求, 探讨 LAMP 技术在呼吸道病毒快速精准检测领域的临床应用前景, 本文系统性地介绍了 LAMP 技术的反应过程、检测方法、优缺点、经验证的实际应用以及面临的现实挑战, 并介绍了 LAMP 技术对于常见呼吸道病毒检测的一些新方法和应用场景。

2. LAMP 简介及反应过程

2.1. 技术简介

LAMP 是由 Notomi 等人设计并应用于病毒及其他病原体检测的一种基因检测技术。该技术需要设计 2 或 3 对引物: 外引物 F3 和 B3 (仅在非循环步骤中具有链位移活性)、内引物 FIP 和 BIP (仅在非循环步骤中具有链位移活性), 正向环引物 LF 和逆向环引物 LB (加速反应, 提高灵敏度), 其中 FIP 由 F1c 和 F2 两部分组成, BIP 由 B1c 和 B2 组成。F1c 和 F2c 与目标序列中的 F1 和 B1 区域互补, LF 与靶基因的 IFC 区域互补, LB 与靶基因的 IBC 区域互补。只有在引物完全与靶序列的结合区识别并匹配的情况下才可以启动并完成反应, 从而使检测特异性得到改善, 灵敏度大大提高, 特别是对于 RNA 的扩增, 可以使反转录和扩增反应在恒温环境中一步完成, 省去了反转录步骤和改变温度所需的大量时间, 同时又降低了实验误差。

2.2. 反应过程

LAMP 反应过程包括三个阶段[4]。首先是哑铃状模板构造的形成, FIP 和 BIP 以相同方式分别从两端针对特定的互补序列开始 DNA 的合成。F3 进入目标区域, 在 Bst DNA 聚合酶的置换作用下, FIP 链被取代并被解离下来形成解离链, 解离链 FIP 端的 F1c 和 F1 互补配对形成环状构造, BIP 的 DNA 扩增也以同样的方式进行, 最终形成哑铃状模板构造。第二个阶段是扩增循环, 以环结构作为单链模板, 在每个循环中, 对于每个单链 DNA 模板, 都会有两个扩增产物, 此阶段中靶 DNA 以指数级速度扩增。最后一个阶段是产物积累, 随着反应进行, dNTP 等原料逐渐被消耗, 扩增效率下降, 最终形成大量串联重复茎环结构的长链 DNA 产物。

整个反应过程只需使用水浴或热循环设备在等温条件下进行, 反应结果可以通过观察产生的焦磷酸镁浊度或所加入显色染料的颜色变化直观判读, 不需要特定的仪器设备, 方便快捷。

3. LAMP 的结果检测方法

3.1. 目视法

目视法是指通过肉眼直接观察沉淀产生的程度来进行结果判读, 无需依赖仪器。当反应体系中扩增出大量目标基因后, 从 dNTP 中析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合, 产生焦磷酸镁白色沉淀, 使得反应溶液变浑浊, 此时即可通过肉眼观察浊度来判断结果[5]-[7]。

然而, 该方法存在诸多缺陷, 当粒度不均匀、空间分布不均匀、样品在扩增前即存在初始浊度或焦磷酸镁沉淀重新溶解等因素存在时, 均可能导致检测结果判读产生误差。

3.2. 染色检测法

3.2.1. 钙黄绿素(FDR)

钙黄绿素(FDR)是一种荧光检测试剂, 在未反应时与锰离子结合, 表现为淬灭。在 LAMP 扩增开始

前,向反应体系中加入 FDR,可以在自然光或紫外光的条件下观察到颜色变化。当 LAMP 反应开始后,副产物焦磷酸盐会使 FDR 失去锰离子,从而产生荧光。当游离的 FDR 与反应混合物中的镁离子结合时,荧光增强。扩增后,阳性反应结果在自然光下可见由橙色变为浅绿色,在紫外光下可见绿色荧光由浅变深[8]-[10]。

3.2.2. 羟基萘酚蓝(HNB)

羟基萘酚蓝(HNB)是一种金属离子指示剂,在 LAMP 反应开始前,向反应管中加入 HNB, HNB 可以结合游离的镁离子,若扩增完成后反应体系由紫色变为天蓝色,则判读为阳性结果,若无明显颜色变化则为阴性[11]。

3.2.3. 镀铬黑色 T

镀铬黑色 T 是一种新型的镁离子指示剂,在 LAMP 反应开始前加入体系。镀铬黑色 T 会与反应体系中游离的镁离子结合,若反应体系由紫色变为天蓝色,则判读为阳性结果[9],若无明显颜色改变则为阴性结果。

3.2.4. 酚红

酚红是一种常见的显色指示剂,pH 改变能够引起其颜色变化。在 LAMP 反应开始前向体系中加入酚红,随着反应进行,模板大量扩增,反应液的 pH 降低[7],体系由红色变为黄色,则可判读为阳性;若模板未扩增成功或体系中不存在目标模板,则溶液保持红色,可判读为阴性[12][13]。

3.2.5. 溴化乙锭

溴化乙锭是一种芳香族化合物,由多个杂环组成,可在 605 nm 激发光下发出橙红色荧光。溴化乙锭暴露在紫外线下时,芳香环中的电子被激发跃迁至高能级,随后在电子返回基态时释放能量,导致溶液的颜色发生变化[14]。在 LAMP 反应开始前向体系中加入溴化乙锭,反应结束时,若体系由橙色变为粉红色,则判读为阳性结果;若模板未扩增或体系中不存在目标序列,体系保持橙色,判读为阴性[15]。

3.2.6. 碘化丙啶

碘化丙啶是一种常用的死细胞染色剂,与 DNA 结合时发出红色荧光。将其加入 LAMP 反应开始前的体系,反应结果可以直接或在紫外线下观察颜色变化来判读。若存在目标模板并成功扩增,反应体系由深红橙色变为浅粉色,此时判读为阳性;若反应前后体系颜色保持不变,则判读为阴性[16]。该方法的优点是碘化丙啶可常温储存,无需冷冻。

3.2.7. 孔雀石绿(MG)

孔雀石绿(MG)是一种带正电的三苯基甲烷类化合物,其最大紫外吸收波长为 621 nm,其颜色变化依赖于溶液 pH 的变化:当 pH < 2 时溶液呈黄色,pH 为 3~9 时呈蓝绿色,pH > 10 时变为无色[17]。在 LAMP 反应前向反应体系中加入 MG 染料,能够最大限度地降低交叉污染的风险且不会抑制 Bst DNA 聚合酶的活性。此外,它具有极高的成本效益,常温下即可储存。

3.3. 琼脂糖凝胶电泳法

琼脂糖凝胶电泳是一种以琼脂糖为支持介质的电泳技术,在电场的作用下,利用琼脂糖凝胶的多孔结构分离不同分子量的核酸。其原理是核酸分子因大小、构象差异在凝胶中以不同速度迁移,结果经过染色可在紫外灯下观察到清晰条带[6]。该方法广泛应用于核酸鉴定、纯度分析及片段大小测定等分子生物学实验中。

将 LAMP 反应的产物和用限制性内切酶消化的产物的分量在琼脂糖凝胶中电泳,用 SYBR Green I 进

行染色,再转移到 Hybond N⁺ 尼龙膜进行 Southern 印记分析,并用相应的核苷酸探针进行检测,以保证 LAMP 反应产物的特异性。另取等量 LAMP 产物加入含有氢氧化钠和 EDTA 的琼脂糖凝胶中运行,然后用 Tris-HCl 中和,对比分析 LAMP 产物条带和工作条带,验证 LAMP 反应产物的均一性和预期大小[4]。

3.4. 仪器检测法

浊度仪能够在 650 nm 波长处通过分光光度法监测焦磷酸镁的积累情况,并对扩增浊度进行自动校正。反应结果可以通过观察分光曲线进行判定,有效避免力度不均或空间效应对实验结果所造成的影响[4]。

4. LAMP 技术的优缺点

4.1. LAMP 技术的核心优势

4.1.1. 简单快速

LAMP 操作过程简便,对专业技能、仪器、反应温度的要求比较低。

LAMP 反应只需一个简单的恒温扩增仪器,不需要进行复杂的热循环过程,可以脱离实验室环境进行。目标模板在 25 min 内即可实现大量扩增,反应总时长通常为 40~65 min,极大地节约时间成本,提高反应效率[18]。另外,LAMP 反应所使用的恒温扩增仪器价格相对低廉,便于普及使用,更加适用于基层医疗场景下的现场检测,大大提高了 LAMP 现场应用的可行性。

4.1.2. 抗干扰能力强

LAMP 扩增酶系统的抗干扰能力较强,反应体系中高浓度的引物和甜菜碱等物质有助于稳定酶活性,减少抑制物的干扰。恒温的反应条件有助于降低某些热不稳定抑制物的活性,另外,LAMP 扩增出的茎环状 DNA 产物本身对低水平的抑制因素也具有一定的抵抗力。

4.1.3. 灵敏度和特异性高

LAMP 反应使用 4 条或 6 条特异性引物识别靶基因上的特定区域,能够实现精准靶向结合,灵敏度极高,能够检测到极低拷贝数的目标核酸模板[19]。同时,LAMP 能够有效规避因引物与非靶标序列的偶然互补而导致的假阳性结果,即使在复杂的核酸背景下,也能精准锁定目标模板,为检测结果的可靠性提供了坚实支撑[20]。

4.1.4. 结果判读简单直观

LAMP 反应的扩增结果判读十分便捷。相较于传统的核酸扩增检测,LAMP 无需依赖昂贵且操作复杂的设备,极大降低了检测门槛。检测结果的可视化也极大地缩短了常规结果判读所需要的时间,可以通过肉眼直接观察浊度变化(反应过程中,靶标序列扩增会伴随焦磷酸镁沉淀生成,阳性样本会产生乳白色浑浊,阴性样本则保持澄清)或显色染料的颜色变化,也可通过添加荧光探针或嵌入型荧光染料,利用便携式荧光检测仪捕捉荧光信号变化完成结果判读。

4.2. LAMP 技术的缺陷

4.2.1. 易出现假阳性

LAMP 反应过程中极易发生气溶胶污染。气溶胶污染是指实验操作中,含有高浓度扩增产物(靶标核酸片段)的微小液滴(直径 0.01~10 μm)因操作不当进入空气,形成气溶胶悬浮颗粒,这些颗粒通过空气扩散,污染后续实验的试剂、样本、耗材或实验台面,最终导致结果呈阳性,即样本中不含靶序列,检测结果却为阳性[20]。

(LAMP)可以对靶序列的多个区域进行扩增,因此更容易发生非特异性扩增。除此之外,引起 LAMP 反应出现非特异性扩增的因素还有很多,例如镁离子的浓度、引物的特异性差异、反应温度等。在进行引物设计时,要选择高度保守的靶基因序列,引物设计完成后要对其进行二聚体分析。在 LAMP 实验过程中最好采用特定的 LAMP 扩增试剂盒,或进行实验条件的筛选试验,以确定最佳反应环境和反应体系,避免非特异性扩增。

4.2.2. 难以进行后续试验

LAMP 反应所得到的扩增产物是大量茎环结构的 DNA 片段,长度从几十 bp 到数千 bp 不等,具有异质性,反应结束后无法通过常规电泳或纯化手段获得均一长度的 DNA,且产物中的单链区域和二级结构会干扰 DNA 聚合酶与之结合,导致测序结果混乱,难以满足后续测序和克隆需要。此外,反应体系还可能含有胍盐、乙醇等抑制剂以及残留引物和酶,这些物质会成为后续试验的干扰因素,难以彻底去除。

5. LAMP 在不同呼吸道病原体检测中的应用

5.1. 甲型流感病毒

流行性感冒(俗称流感),是一种由流感病毒引起的传染性呼吸道疾病,在全球范围内构成了重大的公共卫生挑战,每年对数百万人造成影响。目前已知的能直接感染人类或者曾经感染人类的甲型流感病毒的亚型中,H1、H5 和 H7 亚型的致病率极高,H1N1、H3N2、H5N1 和 H7N9 亚型具有明显的季节性[21]-[29]。

由于流感病毒是一种单股 RNA,在常规检测中,通常采用实时荧光逆转录 PCR 的方法进行相关检测[30]。杨海玉等人[30]用 RT-LAMP 技术[4]检测甲型流感病毒,最低检测限可达到 50 copies/mL,反应通常在 30~35 min 之间完成,大大缩短了检测时间,极大节约了反应成本。Su Jeong Ahn 等人[31]利用所开发的多重 RT-LAMP 技术检测甲型流感病毒,其检测范围为 0.1~1000 copies,在 1h 之内即可完成。Ben Hatano 等人[32]开发了袖珍保暖逆转录酶环介导的等温扩增技术(pwRT-LAMP)用于检测 2009 甲型流感病毒,观测到每个反应体积(25 μ L 和 50 μ L)的最低检测限度都是 100 copies,且与其他病毒未出现交叉反应。

5.2. 腺病毒

腺病毒是一类无包膜的双链 DNA 病毒,属于腺病毒科(Adenoviridae),因最初于 1953 年从人类扁桃体组织中分离发现而得名,几乎遍布自然界。目前已知的能感染人体呼吸道或曾经能够感染人体呼吸道的腺病毒亚属包括 HAdV-C、HAdV-E 以及某些 HAdV-B 血清型。其主要通过飞沫和接触传播,少数可以通过粪口途径传播[33]。腺病毒的致病性非常强,几乎对所有环境都具有高度的抵抗力,有些可以导致严重的下呼吸道感染[33],感染性最长可以保持三个周[34]。

随着 LAMP 技术的发展,诊断腺病毒感染的方法由聚合酶链式反应(PCR)和酶联免疫吸附测定(ELISA)等逐渐向新开发的多重环介导等温扩增技术(mLAMP)过渡。Koryukov 等[35]利用 LAMP 进行腺病毒检测的研究中反应的持续时间被缩短至 35 min,且检测限比 PCR 更低。Tatyana V. Malova 等人[36]在研究中设计了带荧光探针的排位法 LAMP (c-LAMP)和实时 LAMP (f-LAMP),两种方法的最低检测限均为 10^3 copies,反应时间缩短至 60 min,且与其他病毒不存在交叉反应。Lei Hong 等人[37]在 56℃ 下进行 LAMP 反应,其最低检测限度为 10 copies/ μ L。

5.3. 新型冠状病毒

新型冠状病毒是单股正链 RNA 病毒,直接翻译生成 RNA 聚合酶,从而进行负链 RNA 生成、正链

RNA 复制以及蛋白质的翻译合成, 整个过程没有校正机制, 因此其具有变异快、宿主多、宿主适应性强等特点[38]。新型冠状病毒肺炎是由 SARS-CoV-2 感染所引起的一种人类呼吸道疾病, 2019 年在全世界范围内快速传播, 使全球公共卫生事业面临严峻挑战。

新冠疫情的形势下, 早期的诊断与预防在控制疫情中占据重要地位[39]。2020 年, Junaid Kashir [40] 基于 LAMP 技术具有可靠性的基础, 利用比色逆转录环介导等温扩增技术对 SARS-CoV-2 进行 RNA 诊断, 为临床样本中 SARS-CoV-2 的检测提供了一种简单、灵敏且可靠的方法[12][41], 经过进一步改进的 LAMP (如 Penn-RAMP) 被认为是能够快速、稳健检测 COVID-19 的现场诊断方法[42]。Kawin Nawattana-paiboon 等人[12]对新型冠状病毒进行了 RT-LAMP 检测, 在多个浓度下进行重复实验, 确定检测限为 25 copies/反应。美国华盛顿大学团队[43]开发了一种基于唾液样本的无 RNA 提取的新冠病毒(SARS-CoV-2)快速检测方法, 通过优化逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)技术实现, 使检测限低至 59 copies/mL。

5.4. 鼻病毒

鼻病毒是一类常见的 RNA 病毒, 为无包膜的单股正链 RNA 病毒, 是引起人类普通感冒的主要病原体之一, 主要侵犯上呼吸道, 目前共存在三种类型: RV-A, RV-B 和 RV-C [44]。鼻病毒主要诱发或加重哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者的气道炎症[45] [46], 临床表现为鼻塞、流涕、打喷嚏、咽痛、咽干、全身乏力和低热等[47]。

Yien-Ping Wong 等人[48]建立了用 LAMP 快速检测丙型鼻病毒种(HRV-C)的方法, 并通过对反应进行优化, 得到最小检测限值为 101 copies/ μ L。

5.5. 人类偏肺病毒

人类偏肺病毒(Human Metapneumovirus)简称 HMPV, 属于单股负链 RNA 病毒, 可引起人类呼吸道感染, 是导致婴幼儿、老年人以及免疫功能低下人群呼吸道疾病的主要病原体之一。

在宋勤伟等人[10]的研究中, 基因特异性 RT-LAMP 检测 HMPV 基因型 A 和 B 的最小限值分别为 4.33 copies/ μ L 和 4.53 copies/ μ L, 实验周期缩短到平均 24.8 min, 极大地提高了实验效率。在 Xiang Wang 等人[49]的研究中, 应用 RT-LAMP 技术对人类偏肺病毒进行检测, 通过羟基萘酚蓝的变色来判读反应结果, 最低检测限度达到 100 copies/ μ L。

6. LAMP 在现场检测应用中面临的挑战

恒温扩增、高特异性、高灵敏度的显著优势使 LAMP 在现场检测中的应用越来越广泛。在基层医疗领域中, LAMP 主要应用于各种病原体的床旁检测; 在动植物科学领域中, LAMP 主要应用于病毒的现场检测; 在食品安全领域中, LAMP 主要应用于食品中微生物的鉴定。然而, 将 LAMP 由实验室检测转向现场快速检测的进程中依然面临极大挑战。

6.1. 试剂的长期稳定性与冻干技术

传统 LAMP 检测的试剂依赖冷藏储存来维持稳定性, 这使得 LAMP 在实际应用时存在一定的局限性[50]。Lee PY 等人[51]的研究表明蔗糖可以作为预混合 LAMP 试剂的稳定剂, 在室温条件下, 使 Bst DNA 聚合酶的活性维持 45 天或更久。Divakar 等人[52]优化了干式 LAMP 的干燥条件, 利用海藻糖对 Bst DNA 聚合酶进行玻璃化处理, 同样能够保证酶的稳定性, 该研究为难以实现冷链运输的偏远地区提供了解决问题的新思路。未来, 仍需开发维持 LAMP 试剂长期稳定的新方式。

基于现场检测的便携性要求, 将 LAMP 湿式试剂转化为干式试剂是 LAMP 现场检测应用的一大挑战。冻干技术通过冷冻和真空脱水将试剂中的水分去除, 维持样品的稳定性, 与此同时还需要加入

保护剂,既能避免储存过程中酶试剂生物活性的丧失,又能延长保存期[53]。Lulu Shi 等人[54]通过冻干技术自制 RT-LAMP 和微流控芯片应用于 COVID-19 的床旁检测,然而其实验表明室温条件下冻干系统只能维持 27 天。未来,快速检测的实际应用仍需开发更加高效便捷、无污染、可长期储存的冻干技术。

6.2. 集成化与微流控芯片的开发

传统 LAMP 检测需要提前进行病原体 DNA 的提取与纯化,检测结果可视化的实现也需要在反应体系中加入显色剂。多种仪器的使用和各种试剂的添加,既增加了实验成本,又可能造成反应体系的污染,增添实验难度。将 LAMP 与微流控芯片结合,可以实现现场检测集成化、微型化、自动化与便携化的目标,同时达到降本增效的目的。

近年来 LAMP 在各种病原体检测中的应用越来越广泛,相较于传统检测方法和半自动检测装置,全自动集成化的 LAMP 检测盒具备效率高、精准度高、判读简单的巨大优势。Dayun Tang 等人[55]开发了集核酸提纯、试剂制备、LAMP 反应、荧光信号检测于一体,用于食源性病原体检测的全封闭微流控芯片盒。Lin YH 等人[56]将样本分配、孵育和连续荧光检测集成于单个微流控芯片,开发了基于液滴的数字环介导的核酸等温扩增。未来,有望将 LAMP 与微流控芯片集成化开发应用于多种领域,有助于快速现场检测在各领域的应用。

6.3. 更可靠的内参设置

LAMP 检测具备灵敏度高、结果判读简单的特点,也具有易出现假阴性的缺陷。qPCR 检测可以通过检测荧光信号进行核酸实时定量检测,而 LAMP 则无法判断检测结果的真实性和准确性。为了使检测结果更加精准可信,内参的设置尤为重要。

常规 PCR 反应容易受到患者本身采集物中抑制剂的影响,出现假阴性的结果[57]。Burggraf S 等人[58]开发了通过增加包含引物和探针的单链寡核苷酸作为 qPCR 的内源性内参的方法,减少了假阴性现象的发生;Hodgson 等人[57]在研究诊断 HSV1 和 HSV2 时,开发了一种新的方法,源于质粒 DNA 且具有与靶 DNA 相同引物结合位点的外源性内参,可以通过不同的探针和荧光染料组合来诊断 HSV 种类。

未来,LAMP 检测仍需继续开发更加稳定、精准的内外源性内参以保证检测结果的精准性。

6.4. 全球范围内的标准化与质量控制体系的建设

近年来,LAMP 检测在各领域的应用越来越广泛,严谨、统一的标准化规范操作可以减少检测过程中人为操作差异对实验结果造成的影响,但全球范围内始终没有统一标准化操作规范和性能评价机制。常规 LAMP 在探究其灵敏度与特异性时,通常将 qPCR、RT-PCR、培养法等不同的核酸扩增方法所得的结果当作标准参数。Li Y 等人[59]在研究 LAMP 肺炎链球菌检测时,将培养法与 PCR 作为检测 LAMP 特异性与灵敏度的参考标准;Serra-Casas E 等人[60]在利用 LAMP 检测无症状疟疾感染者实验中将 qPCR 作为参考标准;Han HJ 等人[61]在进行 LAMP 鱼型链球菌检测的研究中以 PCR 作为参考标准。

为了确保不同实验室能够产生精准、可靠、具有对比性的 LAMP 检测结果,我们需要在全球范围内完善 LAMP 质量控制体系的建设。主要体现在四个方面:一是试剂与设备的标准化,确保检测试剂的稳定性;二是参考物质的标准化,用于校准检测方法;三是对照组及内参数据的标准化,保证检测流程无误无污染;四是实验数据管理标准化,助推全球数据共享与溯源。

未来,LAMP 检测在全球范围内的标准化仍需进一步改善,以便于 LAMP 在基层医疗、生物科学、食品安全等领域的广泛应用。

7. 总结与展望

LAMP 最显著的优势在于恒温扩增,可以不囿于昂贵的仪器和严格的实验室环境,使用场景多样化,满足了不同检测的需求。LAMP 的相关应用已经证实了该技术具有高灵敏度、高特异性、低成本的优点。

以 LAMP 检测技术为核心,可以根据科研任务的需求不同,设计不同的 LAMP 体系,应用于更多方向[6]。如加入荧光染料[62]进行实时 LAMP 检测(real-time LAMP)或结合侧流层析试纸条可以使实验结果判读更加直观;多套引物联用检测多种病原体的多重 LAMP 检测(mLAMP)可以提高病原学检出率,明确感染病原体的种类;加入 CRISPR/Cas12 可以使 LAMP 的中间产物被快速切割,得到单链 DNA,进一步提高检测效率。总之, LAMP 技术的用途十分广泛,与其他技术结合使用,能够达到优化实验的目的。

LAMP 是资源有限地区极具前景的分子诊断技术,也存在明显局限:一是扩增产物序列难以分析,二是长序列引物设计复杂,三是需针对特定靶基因和样本定制反应体系,通用性较差。

为克服这些缺陷,将 LAMP 与便携式测序技术(如 Nanopore、HTS、mNGS 等)联用。其中,纳米孔测序技术(Nanopore 技术)是目前最成功、应用最广泛的测序技术。Nanopore 技术核心优势在于其便携性和实时测序能力[63],有望广泛应用于 PCR 及 LAMP 扩增产物的测序。这种融合方案有效弥补了 LAMP 在序列确认方面的短板,从而在实现病毒即时检测的同时,完成了精准的溯源分析[64]-[66]。LAMP 和 Nanopore 技术的融合形成了一种优势互补的强大范式。LAMP 通过恒温快速扩增为 Nanopore 测序富集目标序列,有效排除了复杂样本中多种病原的干扰,极大地提升了测序数据的有效性与针对性。

而对于 LAMP 容易出现假阳性等问题,目前也已经提出了一些解决办法:实验中对实验空间进行严格分区,单独设置通风橱或负压空间,降低气溶胶扩散风险;操作时应避免反复开盖,在体系中加入矿物油(矿物油密度比水小,而且不会参与反应,加入反应体系后会浮在反应体系的最上面,从而达到封闭反应的作用);实验前后进行严格的消毒处理,清除残留气溶胶[62]。

总的来说, LAMP 的利大于弊,虽然具有部分缺点,但是可以有针对性地提出解决方案,使 LAMP 的优势更加充分地发挥出来,因此能够确认 LAMP 为一种切实有效的检测呼吸道病毒的技术。然而,现有研究大多集中于单一病毒检测, mLAMP 检测多种呼吸道病毒的研究较少。随着社会科学的进步,检测行业正处于蓬勃发展阶段,市场需求量的增长促使技术全面革新, LAMP 有望被更加广泛地应用于更多领域,如结合人工智能进行数据分析建模,实现病原体分型及耐药性预判;结合微流控芯片,减少样本与试剂消耗、提高便携性,实现跨学科的多功能集成应用。同时,原材料本土化和冻干技术等新技术的优化将进一步降低 LAMP 检测成本,加速其在低收入地区、大规模疾病筛查项目中的渗透,使其真正成为重塑病原体检测格局的核心技术之一,推动疾病预防与检测的发展,对人类社会公共卫生安全保障具有重要意义。

致 谢

本综述的顺利完成,离不开诸多师长、同学的支持与帮助,在此谨致以最诚挚的谢意。

基金项目

山东省自然科学基金项目(ZR2022QB149), 山东第一医科大学教育教学改革研究项目(XM2023016)。

参考文献

- [1] Johnson, G.R., Morawska, L., Ristovski, Z.D., Hargreaves, M., Mengersen, K., Chao, C.Y.H., *et al.* (2011) Modality of Human Expired Aerosol Size Distributions. *Journal of Aerosol Science*, **42**, 839-851. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2011.07.009>
- [2] Monto, A.S. (2004) Occurrence of Respiratory Virus: Time, Place and Person. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **23**,

- S58-S64. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000108193.91607.34>
- [3] 黄斐, 郭玮. 呼吸道病毒快速检测的临床应用现状与挑战[J]. 中国临床医学, 2024, 31(5): 826-831.
 - [4] Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., *et al.* (2000) Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **28**, e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
 - [5] 游淑珠, 王小玉, 冯家望, 等. LAMP 实时浊度法快速检测食品中产志贺毒素大肠埃希氏菌[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 241-246.
 - [6] 刘培海, 白庆华, 王凯, 等. 环介导等温扩增技术及扩增产物分析方法的比较[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(11): 209-218.
 - [7] Tanner, N.A., Zhang, Y. and Evans, T.C. (2015) Visual Detection of Isothermal Nucleic Acid Amplification Using pH-Sensitive Dyes. *BioTechniques*, **58**, 59-68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
 - [8] Adams, E.R., Schoone, G.J., Ageed, A.F., Safi, S.E. and Schallig, H.D.F.H. (2010) Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of Leishmania Parasites in Clinical Samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**, 591-596. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0369>
 - [9] Neshani, A., Zare, H., Sadeghian, H., Safdari, H., Riahi-Zanjani, B. and Aryan, E. (2023) A Comparative Study on Visual Detection of Mycobacterium Tuberculosis by Closed Tube Loop-Mediated Isothermal Amplification: Shedding Light on the Use of Eriochrome Black T. *Diagnostics*, **13**, Article No. 155. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13010155>
 - [10] Song, Q., Zhu, R., Sun, Y., Zhao, L., Wang, F., Deng, J., *et al.* (2014) Identification of Human Metapneumovirus Genotypes a and B from Clinical Specimens by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Virological Methods*, **196**, 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.037>
 - [11] Thoraneenitiyan, N., Choopara, I., Nuanualsuwan, S., Kokpol, S. and Somboonna, N. (2022) Rapid Visual Candidatus Liberibacter Asiaticus Detection (Citrus Greening Disease) Using Simple Alkaline Heat DNA Lysis Followed by Loop-Mediated Isothermal Amplification Coupled Hydroxynaphthol Blue (AL-LAMP-HNB) for Potential Local Use. *PLOS ONE*, **17**, e0276740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276740>
 - [12] Nawattanapaiboon, K., Pasomsub, E., Prombun, P., Wongbunmak, A., Jenjitwanich, A., Mahasupachai, P., *et al.* (2021) Colorimetric Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) as a Visual Diagnostic Platform for the Detection of the Emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *The Analyst*, **146**, 471-477. <https://doi.org/10.1039/d0an01775b>
 - [13] Lai, M.Y., Ooi, C.H., Jaimin, J.J. and Lau, Y.L. (2020) Evaluation of Warmstart Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **102**, 1370-1372. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0001>
 - [14] Saifuddin, S.A., Rashid, R., Nor Azmi, N.J. and Mohamad, S. (2024) Colorimetric Strategies Applicable for Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Microbiological Methods*, **223**, Article ID: 106981. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106981>
 - [15] Chen, H., Li, Y., Zhang, T., Bi, Y., Shu, M., Zhong, C., *et al.* (2021) A Novel Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with Immunomagnetic Beads Separation and Ethidium Bromide Monoazide Treatment for Rapid and Ultrasensitive Detection of Viable *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. *Food Analytical Methods*, **14**, 944-956. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01932-y>
 - [16] Krapoth, T.C., Henle, G.S., Avdyli, M., Bektić, B., Schwarzkopf, K.M., Bešić, L., *et al.* (2024) Wanted: Dead or Alive Cells with Propidium Iodide Staining in Liver Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article No. 13521. <https://doi.org/10.3390/ijms252413521>
 - [17] Gachugia, J., Chebore, W., Otieno, K., Ngugi, C.W., Godana, A. and Kariuki, S. (2020) Evaluation of the Colorimetric Malachite Green Loop-Mediated Isothermal Amplification (MG-LAMP) Assay for the Detection of Malaria Species at Two Different Health Facilities in a Malaria Endemic Area of Western Kenya. *Malaria Journal*, **19**, Article No. 329. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03397-0>
 - [18] Soroka, M., Wasowicz, B. and Rymaszewska, A. (2021) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*, **10**, 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
 - [19] 尹小毛, 希伦, 王治伟. 应用环介导等温扩增技术快速检测血培养阳性瓶中的七种常见病原菌[J]. 广州医科大学学报, 2021, 49(2): 89-93.
 - [20] 王一波, 孙泓希, 史普想, 等. 环介导等温扩增技术在农业病害检测中的应用综述[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(7): 17-24.
 - [21] 张杨, 郭培全, 岳营, 等. 一起季节性 H3N2 流感引起的学校聚集疫情全基因特征分析[J]. 中国口岸科学技术, 2022, 4(11): 47-53.

- [22] 苏翠, 杨凯翔, 王君, 马萍, 刘新利, 王学良. 2011-2021 年铜川市流行性感冒的流行趋势及病原学特点[J]. 医学动物防制, 2024, 40(2): 142-146.
- [23] 刘瑞, 闫敏敏, 魏嵘, 张进, 汪卓赞, 郑凌. 12 例人感染 H7N9 禽流感病例临床特征分析[J]. 医学动物防制, 2023, 39(10): 971-975.
- [24] Wibawa, H., Wibowo, P.E., Supriyadi, A., Lestari, L., Silaban, J., Fuadi, A.A., *et al.* (2024) Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Clade 2.3.4.4b in Domestic Ducks, Indonesia, 2022. *Emerging Infectious Diseases*, **30**, 586-590. <https://doi.org/10.3201/eid3003.230973>
- [25] Plaza, P.I., Gamarra-Toledo, V., Eugu , J.R. and Lambertucci, S.A. (2024) Recent Changes in Patterns of Mammal Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Virus Worldwide. *Emerging Infectious Diseases*, **30**, 444-452. <https://doi.org/10.3201/eid3003.231098>
- [26] Liu, X., Lin, X., Hong, H., Wang, J., Tao, Y., Huai, Y., *et al.* (2024) Polysaccharide from *Atractylodes Macrocephala* Koidz Binding with Zinc Oxide Nanoparticles as a Novel Mucosal Immune Adjuvant for H9N2 Inactivated Vaccine. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article No. 2132. <https://doi.org/10.3390/ijms25042132>
- [27] Hohensee, L., Scheibner, D., Schäfer, A., Shelton, H., Mettenleiter, T.C., Breithaupt, A., *et al.* (2024) The Role of PB1-F2 in Adaptation of High Pathogenicity Avian Influenza Virus H7N7 in Chickens. *Veterinary Research*, **55**, Article No. 5. <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01257-8>
- [28] Yang, L., Fan, M., Wang, Y., Sun, X. and Zhu, H. (2024) Effect of Avian Influenza Scare on Transmission of Zoonotic Avian Influenza: A Case Study of Influenza a (H7N9). *Mathematical Biosciences*, **367**, Article ID: 109125. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2023.109125>
- [29] Lyashko, A.V., Timofeeva, T.A., Rudneva, I.A., Lomakina, N.F., Treshchalina, A.A., Gambaryan, A.S., *et al.* (2023) Antigenic Architecture of the H7N2 Influenza Virus Hemagglutinin Belonging to the North American Lineage. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article No. 212. <https://doi.org/10.3390/ijms25010212>
- [30] 杨海玉, 朱伯林, 许佳, 胡道来, 杭佳, 张小梅. A 型流感病毒环介导等温扩增快速检测体系的建立与验证[J]. 医学动物防制, 2025, 41(8): 830-834.
- [31] Ahn, S.J., Baek, Y.H., Lloren, K.K.S., Choi, W., Jeong, J.H., Antigua, K.J.C., *et al.* (2020) Correction to: Rapid and Simple Colorimetric Detection of Multiple Influenza Viruses Infecting Humans Using a Reverse Transcriptional Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *BMC Infectious Diseases*, **20**, Article No. 965. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05707-y>
- [32] Hatano, B., Goto, M., Fukumoto, H., Obara, T., Maki, T., Suzuki, G., *et al.* (2011) Mobile and Accurate Detection System for Infection by the 2009 Pandemic Influenza a (H1N1) Virus with a Pocket-Warmer Reverse-Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Medical Virology*, **83**, 568-573. <https://doi.org/10.1002/jmv.22031>
- [33] Zhang, S., Luo, Y., Huang, D., Fan, H., Lu, Q., Wo, Y., *et al.* (2015) Fatal Pneumonia Cases Caused by Human Adenovirus 55 in Immunocompetent Adults. *Infectious Diseases*, **48**, 40-47. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1055585>
- [34] Matthes-Martin, S., Feuchtinger, T., Shaw, P.J., Engelhard, D., Hirsch, H.H., Cordonnier, C., *et al.* (2012) European Guidelines for Diagnosis and Treatment of Adenovirus Infection in Leukemia and Stem Cell Transplantation: Summary of Ecil-4 (2011). *Transplant Infectious Disease*, **14**, 555-563. <https://doi.org/10.1111/tid.12022>
- [35] Koryukov, M.A., Oscorbin, I.P., Novikova, L.M., Gordukova, M.A., Turina, I.E., Galeeva, E.V., *et al.* (2024) A Novel Multiplex LAMP Assay for the Detection of Respiratory Human Adenoviruses. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article No. 7215. <https://doi.org/10.3390/ijms25137215>
- [36] Shuryaeva, A.K., Malova, T.V., Tolokoncheva, A.A., Karceka, S.A., Gordukova, M.A., Davydova, E.E., *et al.* (2022) Development and Application of LAMP Assays for the Detection of Enteric Adenoviruses in Feces. *Microbiology Spectrum*, **10**, e00516-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00516-22>
- [37] Hong, L., Li, J., Lv, J., Chao, S., Xu, Y., Zou, D., *et al.* (2021) Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Clinical Diagnosis of Respiratory Human Adenoviruses Emergent in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **101**, Article ID: 115401. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115401>
- [38] Cui, J., Li, F. and Shi, Z. (2018) Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, **17**, 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- [39] Shen, M., Zhou, Y., Ye, J., Abdullah AL-maskri, A.A., Kang, Y., Zeng, S., *et al.* (2020) Recent Advances and Perspectives of Nucleic Acid Detection for Coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **10**, 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
- [40] Kashir, J. and Yaqinuddin, A. (2020) Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays as a Rapid Diagnostic for Covid-19. *Medical Hypotheses*, **141**, Article ID: 109786. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109786>

- [41] Dao Thi, V.L., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L.P., Kirrmaier, D., *et al.* (2020) A Colorimetric RT-LAMP Assay and LAMP-Sequencing for Detecting Sars-Cov-2 RNA in Clinical Samples. *Science Translational Medicine*, **12**, Article No. 556. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>
- [42] El-Tholoth, M., Mauk, M.G., Anis, E. and Bau, H.H. (2020) A Closed-Tube, Single-Step, Real Time, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Infectious Bronchitis Virus Detection in Chickens. *Journal of Virological Methods*, **284**, Article ID: 113940. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113940>
- [43] Lalli, M.A., Langmade, J.S., Chen, X., Fronick, C.C., Sawyer, C.S., Burcea, L.C., *et al.* (2020) Rapid and Extraction-Free Detection of Sars-Cov-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clinical Chemistry*, **67**, 415-424. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa267>
- [44] Carstens, E.B. and Ball, L.A. (2009) Ratification Vote on Taxonomic Proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2008). *Archives of Virology*, **154**, 1181-1188. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0400-2>
- [45] Khetsuriani, N., Lu, X., Teague, W.G., Kazerouni, N., Anderson, L.J. and Erdman, D.D. (2008) Novel Human Rhinoviruses and Exacerbation of Asthma in Children. *Emerging Infectious Diseases*, **14**, 1793-1796. <https://doi.org/10.3201/eid1411.080386>
- [46] Miller, E.K., Khuri-Bulos, N., Williams, J.V., Shehabi, A.A., Faouri, S., Al Jundi, I., *et al.* (2009) Human Rhinovirus C Associated with Wheezing in Hospitalised Children in the Middle East. *Journal of Clinical Virology*, **46**, 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.06.007>
- [47] Lamson, D., Renwick, N., Kapoor, V., Liu, Z., Palacios, G., Ju, J., *et al.* (2006) Masstag Polymerase-Chain-Reaction Detection of Respiratory Pathogens, Including a New Rhinovirus Genotype, That Caused Influenza-Like Illness in New York State during 2004-2005. *The Journal of Infectious Diseases*, **194**, 1398-1402. <https://doi.org/10.1086/508551>
- [48] Wong, Y., Tee, K.K. and Chee, H. (2024) Diagnostic Potential of Rhinovirus C Using Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). *International Microbiology*, **28**, 1291-1303. <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00621-8>
- [49] Wang, X., Zhang, Q., Zhang, F., Ma, F., Zheng, W., Zhao, Z., *et al.* (2012) Visual Detection of the Human Metapneumovirus Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification with Hydroxynaphthol Blue Dye. *Virology Journal*, **9**, Article No. 138. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-9-138>
- [50] Lau, Y.L., Abdullah, M.L. and Lai, M.Y. (2025) Rapid Detection of Zoonotic Malaria Using Room-Temperature Stable and Ready-to-Use Colorimetric LAMP Reagents. *Acta Tropica*, **267**, Article ID: 107678. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2025.107678>
- [51] Lee, P., Wong, Y., Othman, S. and Chee, H. (2021) Room-Temperature Stable Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Reagents to Detect Leptospiral DNA. *Asian Biomedicine*, **15**, 183-189. <https://doi.org/10.2478/abm-2021-0023>
- [52] Divakar, S., Dhanalakshmi, H., Sandeep, N., Isloor, S., Rashmi, R., Ananda, K., *et al.* (2024) Dry LAMP: A Point of Care Diagnostics for Diagnosis of Bovine Tropical Theileriosis. *Journal of Vector Borne Diseases*, **61**, 357-363. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.392261>
- [53] 崔玉玲, 于浩, 张哲, 等. 冻干技术在法医 DNA 检验中的研究进展及应用[J]. 中国法医学杂志, 2025, 40(3): 343-347.
- [54] Shi, L.L., Pang, Z.R., Yu, J.H., *et al.* (2025) Development of a Portable Multi-Step Microfluidic Device for Point-of-Care Nucleic Acid Diagnostics. *Analytica Chimica Acta*, **1336**, Article ID: 343518. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343518>
- [55] Tang, D., Li, P., Qi, S., Wu, Q., Yu, R., Liu, M., *et al.* (2025) Point-of-Care Analysis for Foodborne Pathogens in Food Samples Based on a Fully Enclosed Microfluidic Chip Cartridge. *Lab on a Chip*, **25**, 3537-3548. <https://doi.org/10.1039/d4lc00819g>
- [56] Lin, Y., Hung, Y., Chang, W. and Chiou, C. (2024) Integrated Droplet-Based Digital Loop-Mediated Isothermal Amplification Microfluidic Chip with Droplet Generation, Incubation, and Continuous Fluorescence Detection. *Biosensors*, **14**, Article No. 334. <https://doi.org/10.3390/bios14070334>
- [57] Hodgson, J., Zuckerman, M. and Smith, M. (2007) Development of a Novel Internal Control for a Real-Time PCR for HSV DNA Types 1 and 2. *Journal of Clinical Virology*, **38**, 217-220. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.12.014>
- [58] Burggraf, S. and Olgemöller, B. (2004) Simple Technique for Internal Control of Real-Time Amplification Assays. *Clinical Chemistry*, **50**, 819-825. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.027961>
- [59] Li, Y., Ma, L., Duan, S., Li, M. and Chen, J. (2020) Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Streptococcus Pneumoniae Isolates in Clinical Sputum Samples. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **82**, 64-68. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.spl.13>
- [60] Serra-Casas, E., Manrique, P., Ding, X.C., Carrasco-Escobar, G., Alava, F., Gave, A., *et al.* (2017) Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification for Asymptomatic Malaria Detection in Challenging Field Settings: Technical Performance

- and Pilot Implementation in the Peruvian Amazon. *PLOS ONE*, **12**, e0185742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185742>
- [61] Han, H.J., Jung, S.J., Oh, M.J. and Kim, D.H. (2011) Rapid and Sensitive Detection of *Streptococcus iniae* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Journal of Fish Diseases*, **34**, 395-398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01242.x>
- [62] Yao, Y.P., Li, S.S., Cao, J.Q., *et al.* (2018) Development of Small Molecule Biosensors by Coupling the Recognition of the Bacterial Allosteric Transcription Factor with Isothermal Strand Displacement Amplification. *Chemical Communications*, **54**, 4774-4777. <https://doi.org/10.1039/c8cc01764f>
- [63] Yang, Y.Q., Liu, R.Y., Xie, H.Q., *et al.* (2013) Advances in Nanopore Sequencing Technology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **13**, 4521-4538. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7756>
- [64] Imai, K., Tarumoto, N., Misawa, K., Runtuwene, L.R., Sakai, J., Hayashida, K., *et al.* (2017) A Novel Diagnostic Method for Malaria Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Minion™ Nanopore Sequencer. *BMC Infectious Diseases*, **17**, Article No. 621. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2718-9>
- [65] Imai, K., Tarumoto, N., Runtuwene, L.R., Sakai, J., Hayashida, K., Eshita, Y., *et al.* (2018) An Innovative Diagnostic Technology for the Codon Mutation C580Y in Kelch13 of *Plasmodium falciparum* with Minion Nanopore Sequencer. *Malaria Journal*, **17**, Article No. 217. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2362-x>
- [66] Tang, Z., Choi, G., Nouri, R. and Guan, W. (2019) Loop-Mediated Isothermal Amplification-Coupled Glass Nanopore Counting toward Sensitive and Specific Nucleic Acid Testing. *Nano Letters*, **19**, 7927-7934. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b03040>