

论 著
(基础研究)

实时荧光多酶恒温扩增技术检测小鼠细小病毒核酸的方法建立

尤金炜, 陈 慧, 马 畅, 张旭亮, 董 敏, 杨 阳, 恽时锋

【摘要】 目的 旨在建立基于实时荧光多酶恒温扩增(exo-MIRA)技术的小鼠细小病毒(MVM)核酸检测新方法。**方法** 收集2021年1月至2022年1月南京大学医学院附属金陵医院实验动物室共75份小鼠肠道内容物标本。针对MVM VP2基因的保守区域设计4对引物,琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物以筛选最优引物对,并设计特异性荧光探针,构建exo-MIRA检测法。通过检测梯度稀释模拟样本,进行检出限评价。检测其他小鼠病毒,包括仙台病毒(SV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、小鼠痘病毒(Ect)、小鼠肺炎病毒(PVM)、呼肠孤病毒(Reo),分析exo-MIRA法的交叉反应性。采用qPCR法和exo-MIRA法同时检测收集的75份标本,统计分析两种方法的一致性。以qPCR法为参比方法,评估该法的敏感度和特异度,进行诊断效能评价。**结果** 采用exo-MIRA技术建立MVM核酸检测方法,该方法检测MVM的检出限为10 copies/ μ L,且与其他五种小鼠病毒无交叉反应,可特异性检出MVM。75份标本检出结果显示,exo-MIRA法和qPCR法高度一致,Kappa值为0.921($P < 0.05$),exo-MIRA法的敏感度为100.0%,特异度为96.7%。**结论** 建立了一种基于实时荧光MIRA恒温扩增技术的MVM核酸检测方法,具有简单快速、实验要求低、敏感特异等优点。该方法可应用于现场复杂环境的即时检测,在实验动物质量检测应用上有一定前景。

【关键词】 小鼠细小病毒;多酶恒温扩增技术;实时荧光;快速检测

【中图分类号】 R440 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2023)03-0225-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2023.03.001

Development of a real-time fluorescence-based multienzyme isothermal rapid amplification for the rapid detection of minute virus of mice

YOU Jingwei¹, CHEN Hui², MA Chang¹, ZHANG Xuliang¹, DONG Min¹, YANG Yang³, YUN Shifeng¹

(1. Department of Laboratory Animal, Jinling Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University/General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. Precision Medicine Center, The Second Hospital of Nanjing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210003, Jiangsu, China 3. Basic Medical Laboratory, Institute of Clinical Laboratory Science, Jinling Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University/General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To develop a real-time multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) assay for detecting minute virus of mice. **Methods** A total of 75 intestinal contents of the mice were collected from January 2021 to January 2022 at the Department of Laboratory Animal, Jinling Hospital. Four pairs of primers

were designed to target the conserved region of the MVM VP2 gene. The amplification products were analyzed by gel electrophoresis to select the best primers. Then, specific probes were designed to develop the exo-MIRA assay. To verify the limit of detection of the method, 10-fold gradient dilution templates were selected by the exo-MIRA assay. To evaluate the cross-reactivity, viral pathogens were detected by the exo-MIRA, including sendai virus, mouse hepatitis

基金项目:军队实验动物专项科研课题(SYDW[2020]-17);中国博士后科学基金新冠肺炎疫情防控专项资助(2020M670092ZX);江苏省卫健委科研项目(M2020029)

作者单位:210002 南京,南京大学医学院附属金陵医院(东部战区总医院)实验动物室(尤金炜、马 畅、张旭亮、董 敏、恽时锋),检验科(杨 阳);210003 南京,南京市第二医院精准医学中心(陈 慧)

通信作者:恽时锋, E-mail: yunshifeng1@163.com

virus, ectromelia virus, pneumonia virus of mice and reovirus. All specimens were run simultaneously by both qPCR and exo-MIRA and the two assays were compared for congruence. The qPCR was used as the reference method. Diagnostic evaluation was performed.

Results This study used the exo-MIRA technology to establish a novel assay for minute virus of mice nucleic acid. The limit of detection of the assay was 10 copies/ μL and no cross reaction was found with other five mice viruses tested. The detection resulted of clinical specimens identified by the two methods were highly consistent ($Kappa=0.921$, $P<0.05$). The exo-MIRA assay achieved a sensitivity of 100.0% and a specificity of 96.7%. **Conclusion** A real-time multienzyme isothermal rapid amplification assay based on the VP2 gene is developed for the rapid detection of minute virus of mice.

[Key words] minute virus of mice; multienzyme isothermal rapid amplification; real-time fluorescence-based; rapid detection

0 引言

小鼠细小病毒(minute virus of mice, MVM)是一种单链 DNA 病毒,属于细小病毒科原细小病毒属,是小鼠较常见的传染性病原体,隐匿传染,传染性强^[1]。已有实验证据证实, MVM 可在体内体外影响免疫调节、肿瘤生长和移植反应,严重干扰动物实验结果可靠性^[2]。目前 MVM 常用检测方法主要是 ELISA 方法、间接免疫荧光法(IFA)等血清特异性检查,但这类方法窗口期长、灵敏度低,在感染早期容易漏检^[3]。基于聚合酶链式反应(polymerase chain action, PCR)的核酸扩增技术可在血清转化前的早期感染或无法产生血清反应的免疫功能低下小鼠中检测到细小病毒,缩短了检测窗口期,提高了 MVM 检测的准确性^[4]。同时,还可应用于生物材料和环境污染的检测。

恒温扩增技术是不依赖 PCR 酶的核酸扩增体系^[5],运用重组酶、环介导酶、解旋酶或切口酶等扩增酶在恒定温度下实现核酸快速特异性扩增^[6-7]。与荧光定量 PCR 相比,恒温扩增技术扩增速度快,设备要求低,性能与荧光定量 PCR 相当^[8]。多酶恒温快速扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)是一种包含有多种酶的核酸恒温快速扩增体系,运用解旋酶和单链结合蛋白解开 DNA 双链,运用重组酶和 DNA 聚合酶快速扩增目标片段。其引物设计简单、扩增效率高、检测时间短,已经用于检测 SARS-CoV-2^[9]、乙型肝炎病毒^[10]和结核分枝杆菌^[11]。MIRA 目前已开发出基础型(凝胶电泳法)、胶体金试纸条型(MIRA-LFD 型)和荧光探针型试剂盒(exo-MIRA 型)。含有 exo 外切酶的实时荧光多酶恒温扩增(exomultienzyme isothermal rapid amplification, exo-MIRA)技术可实现实时荧光定量检测。本研究建立了一种多酶恒温扩增技术的 MVM 核酸检测方法,旨在为 MVM 快速检测提供依据,从而实现感染的有效控制。

1 材料与方法

1.1 临床标本 本实验室自 2021 年 1 月至 2022 年 1 月收集 75 份小鼠肠道内容物,采集操作均参照《实验动物小鼠细小病毒 MVM 株 PCR 检测方法 T/CALAS28-2017》团体标准^[12]。本研究使用的 BALB/C 昆明种小鼠和 C57BL/6 小鼠从各地实验动物中心购买。实验小鼠均饲养在屏障环境中,室内的温湿度均由中央空调控制,温度为 20~26℃,相对湿度为 50%~70%,光照明暗交替 12 h/d。饮水为消毒的酸化水,使用的垫料、笼盒等一切用具均进行 131℃、5 min 高压预真空灭菌。饲料为北京斯贝福 60Co 辐射饲料,合格证号为 SCXK(京)2019-0010。实验动物使用许可证号为 SYXK(军)2017-0037。本研究经东部战区总医院伦理委员会批准(2020JLHJDZXDWLS-000199)。

1.2 实验毒株和标准品 MVM 毒株由本实验室分离鉴定。小鼠呼肠孤病毒 3 型(Reo-3, M20161.1)、鼠痘病毒(ectromelia virus, EV)、小鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)、仙台病毒(sendai virus, SV)、小鼠肺炎病毒(pneumonia Virus of Mice, PVM)阳性对照质粒由生工合成。本研究合成 VP2 基因(GenBank 号 M12032.1)第 3085 位到第 3669 位的核酸序列,克隆到 pUC57 质粒中,基因拷贝数经过数字 PCR 进行绝对定量,作为标准品。

1.3 试剂与仪器 DNA 恒温快速扩增试剂盒(基础型/荧光型)购自潍坊安普未来生物科技有限公司, DNA 抽提试剂(25:24:1)购自北京索莱宝科技有限公司, DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, PCR 扩增试剂购自 Takara 公司。实时荧光定量 PCR 仪为安捷伦 Agilent 的 MX3000P, 热恒温水浴箱(上海精宏 DK-8D), 高速冷冻离心机(Thermo Fisher Micro 21R), 凝胶成像系统(上海天能 3500R)。

1.4 核酸提取 收集的肠道内容物的核酸提取使用商品化的试剂盒血液/细胞/组织基因组提取

试剂盒 (DP304), 根据试剂盒步骤提取核酸备用。

1.5 exo-MIRA 引物探针设计 根据 exo-MIRA 技术引物设计原则: ①扩增产物长度 150~300 bp, 不超过 500 bp; ②引物长度 30~35 bp, 不少于 25 bp; ③引物碱基排布随机性高; ④引物 GC 含量 30~70%, 针对 VP2 基因保守区域设计 4 对引物, 使用 BLAST 工具验证引物的特异性。MIRA 探针设计要求需满足: ①距离 5' 端的 30~35 nt 中间位置, 至少含两个 T 碱基, 间距 2~4 nt, 两个 T 碱基之间标记 dSpacer; ②dSpacer 位点上游的 T 碱基标记荧光基团 (常用 FAM), 下游 T 碱基标记淬灭基团 (常用 BHQ1); ③距离 3' 端约 15 nt 且 3' 端标记 C3-spacer。本研究设计的探针荧光标记选择 FAM 作为报告发光基团, BHQ1 为淬灭基团。引物探针扩增的目的序列均覆盖了中国实验动物学会发布的 MVM 株 PCR 检测方法实施指南的检测靶序列。引物和探针均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 引物和探针序列见表 1。

表 1 引物探针序列

方法	靶基因	引物/探针	序列(5'→3')	大小(bp)
qPCR	VP2	qPCR-F	GCCATACACACCTGCAGCAAA	21
		qPCR-R	TGGYGATGCTATGTTGGT	19
		qPCR-P	FAM-TCAATGGAAACACTTGGTTTC-TACCCCTTGA-BHQ1	31
exo-MVM	VP2	MVM-F	ACTGTTACAGCAAGACTCAGGAG-GTCAAG	31
		MVM-R	GAGAATTCATTCTTTTGGTGTTC-CCATTAC	31
		MVM-P	CACACCTGCAGCAAACTCAATG-GAAACACT/i6FAMdT/GG/iidSp//iB-HQ1dT/TCTACCCCTTGGAAAC	50

1.6 exo-MIRA 法体系建立 根据试剂盒说明书, 实验前 0.5~1 h, 取出试剂, 室温完全融化, 震荡混匀。在各干粉反应管依次加入 29.4 μL A buffer、2 μL 前向引物 (10 μM)、2 μL 后向引物 (10 μM)、0.6 μL 探针 (10 μM)、2 μL 模板、11.5 μL 蒸馏水, 最后再加 2.5 μL B buffer, 总反应体积 50 μL 。盖上盖子, 上下颠倒混匀 10 次, 使各组充分混匀, 瞬时离心, 加热反应。基础型设定温度 42 $^{\circ}\text{C}$, 时间 30 min; 荧光型设定温度 42 $^{\circ}\text{C}$, 时间 20 min, 每 20 秒检测一次荧光。当荧光扩增曲线为 S 型时判为阳性, 否则判为阴性。

1.7 引物筛选 将设计的多对引物依次加入上述 MIRA 体系, 扩增产物等比加入 50 μL DNA 提取

试剂, 轻轻混匀后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清 5 μL 经 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.8 qPCR 法检测 MVM MVM 荧光定量 PCR 引物参照 2017 年中国实验动物学会推荐的实时荧光 PCR 引物序列^[12], 引物探针序列见表 1。实时荧光 PCR 使用安捷伦 Agilent 荧光定量 PCR 仪 MX3000P, 程序设置如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环。CT \leq 35, 判断为小鼠细小病毒 MVM 株核酸阳性; CT \geq 40, 则判断为小鼠细小病毒 MVM 株核酸阴性; 35<CT<40, 则判断为灰区, 重新检测。重复检测结果若 CT \geq 40, 则阴性; 若 35<CT<40, 则阳性。

1.9 exo-MIRA 法性能评价

1.9.1 检出限 将数字 PCR 绝对定量浓度为 10⁶ copies/ μL 的标准品, 使用 DEPC 水 10 倍梯度稀释, 从而获得 10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10⁰ copies/ μL 的标准品, 分别以 2 μL 各浓度标准品为模板, 进行 exo-MIRA 反应, DEPC 水为阴性对照, 分析本法的检出限。

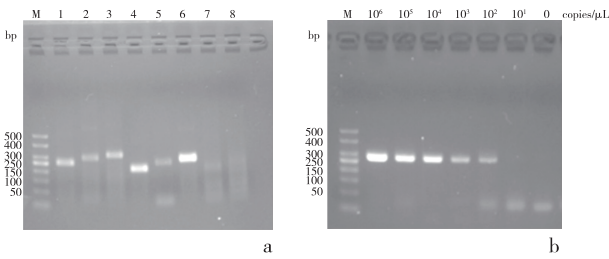
1.9.2 交叉反应性 使用建立的 exo-MIRA 法检测 MVM、SV、EV、Reo-3、PVM 和 MHV 小鼠病毒质粒, 评价本法的交叉反应性。

1.9.3 临床诊断效能评价 应用收集的 75 份标本, 提取肠道内容物的 DNA 核酸, 同时进行 exo-MIRA 法和 qPCR 法检测。

1.10 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行统计分析。两种方法检测临床样本的结果用绝对数进行表示, 方法学一致性检验采用 Kappa 检验。κ \geq 0.8, 表示高度一致; 0.6 \leq κ<0.8, 表示一致性良好; 0.4<κ<0.6, 表示一致性一般; κ \leq 0.4, 表示一致性较差。再以 qPCR 法为参比方法, 分析 exo-MIRA 法的敏感度和特异度。

2 结 果

2.1 引物筛选结果 设计的各组引物对经 MIRA 扩增后电泳, 结果见图 1a。#6 号引物对扩增 MVM 产物条带清晰, 扩增效率最高, 且扩增产物与设计片段大小相近, 无引物二聚体。因此, 选定#6 号为候选引物并设计荧光探针, 建立 exo-MIRA 法, 序列见表 1。图 1b 可见扩增产物条带亮度与模板浓度相关, 该对引物可成功扩增低至 10² copies/ μL 的标准品, 且无非特异性扩增, 十分灵敏。



M:蛋白 marker;1-8:不同引物对
a:各组引物对经 MIRA 扩增后电泳结果;b:扩增产物条带亮度与模板浓度相关

图 1 MVM VP2 基因的 exo-MIRA 法引物筛选

2.2 exo-MIRA 法性能评价

2.2.1 检出限 通过检测 0~10⁵ copies/μL 的标准品,用于分析 exo-MIRA 法的检出限,结果见图 2。exo-MIRA 法可成功扩增检测低至 10¹ copies/μL 的标准品,且 10⁰ copies/μL、阴性对照组均未出现扩增。

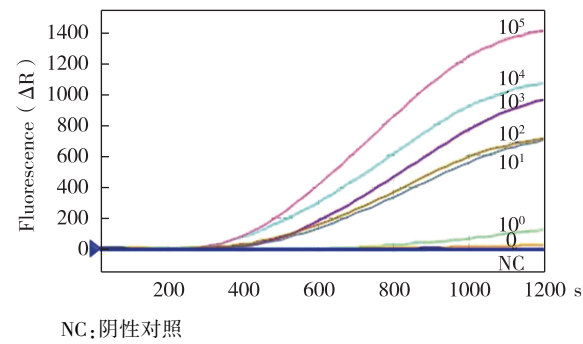


图 2 exo-MIRA 法检测 MVM 的检出限

2.2.2 交叉反应性 为了确定 exo-MIRA 法的交叉反应性,用实时荧光 MIRA 检测了 6 种小鼠病毒株,结果显示扩增体系只能对 MVM 产生 S 型扩增曲线,表明该体系未与其他小鼠病毒出现交叉反应,见图 3。

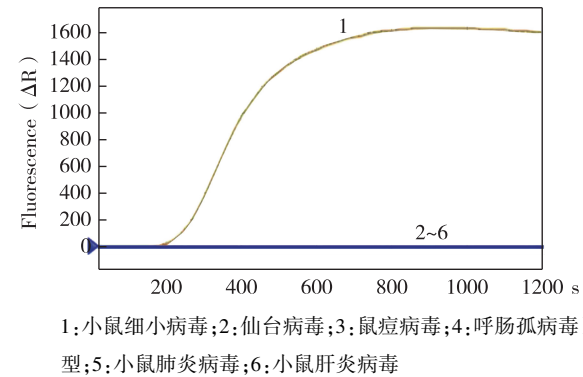


图 3 exo-MIRA 法检测 MVM 的交叉反应性

2.2.3 exo-MIRA 法检测临床标本 利用建立的 exo-MIRA 法和中国实验动物学会推荐的 qPCR 法对 75 份小鼠肠内容物标本进行 MVM 检测,结果见表 2。经一致性检验分析, *Kappa* 值为 0.921 ($P < 0.05$),故本研究建立的 exo-MIRA 法和 qPCR 法高度一致。以 qPCR 法为参比方法,exo-MIRA 法的敏感度是 100.0%,特异度是 96.7%。

exo-MIRA 法	qPCR 法		合计	<i>Kappa</i>
	阳性	阴性		
阳性	15	2	17	0.921 ($P < 0.05$)
阴性	0	58	58	
总计	15	60	75	

3 讨 论

近年来,恒温扩增技术发展迅速,成为有可能替代实时荧光定量 PCR 技术的新一代核酸检测方法^[13-14]。其中,重组酶技术如重组酶聚合酶等温扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是等温扩增技术的代表性技术。本研究使用的 MIRA 技术是一种基于重组酶的新型国产技术,不同于 RPA, MIRA 选用提自天蓝色链霉菌的重组酶 recA 和多酶体系,可形成高效扩增循环从而完成超速扩增。根据文献,该技术尚未应用于 MVM 的核酸检测。

本研究首先选用基础型 MIRA 技术对引物进行筛选,初步验证引物的可行性,研究发现筛选所得引物可特异性扩增 10² copies/μL 的模板,十分灵敏。当模板浓度低至 10² copies/μL 时,基础型 MIRA 技术也可检出,但会出现引物二聚体。同时基础型 MIRA 产物需额外进行提取,且此步骤存在开盖污染可能。荧光型 MIRA 相较于基础型 MIRA,均采用重组酶外,还使用了依赖核酸 exo 外切酶,该酶可以进一步加快反应速度并缩短扩增时间,提高敏感性。为建立 MVM 核酸快速检测方法,本研究最终选择了 exo-MIRA 技术,即荧光探针法,扩增时间由基础型 30 min 减少至 20 min,同时保证方法敏感度,完成后续方法学的建立。

本研究建立了一种用于 MVM 核酸检测的实时荧光恒温扩增的方法。该方法整个核酸扩增过程仅需要 42 ℃ 20 min,远低于实时荧光 PCR 的扩增温度和时间,实验要求低。同时,本法检出限低至 10

copies/ μL 。Wang 等^[4]建立的 PCR 法检测 MVM, 检出限为 50 copies/ μL 。Bauer 等^[15]建立的方法检出限为 100 copies/ μL 。故本研究建立的方法较 PCR 方法更为灵敏。目前, MVM 核酸检测大部分是基于小鼠组织(如肠系膜淋巴结或脾脏)中病毒 DNA 的扩增^[16], 本研究收集了 75 份小鼠肠内容物用于 exo-MIRA 法的临床标本验证。结果显示, 本方法具有 100.0% 的敏感度和 96.7% 的特异度, 与 qPCR 法高度一致。其中, 有 2 份标本, qPCR 法为阴性, exo-MIRA 法为阳性(Ct 值均值分别为 36.7、37.8)。根据 Ct 值, 初步判断该份标本病毒载量较低。且本研究使用的由中国实验动物学会团体标准建立的参比方法 qPCR 法, 该标准里验证检出限为 100 copies/ μL 。本研究建立的 exo-MIRA 法可为标准方法提供补充。

实时荧光 MIRA 操作简单, 由多种酶共同反应实现了核酸的恒温扩增(42 °C), 避免了聚合酶链式反应中的升降温过程, 有望成为即时检验和现场检验的方法^[17]。恒温扩增的结果可以有多种可视化方法, 如琼脂糖凝胶电泳、侧流层析试纸条^[18]、羟基萘酚蓝指示剂^[8]、CRISP 识别^[19]等, 甚至使用一台智能手机即可完成结果可视化^[20]。未来, 我们将进一步研究建立多种小鼠病毒的可视化便携检测方法, 可用于对样品的现场筛查, 控制实验动物质量。

【参考文献】

- [1] Joh J, Proctor ML, Ditslear JL, *et al.* Epidemiological and phylogenetic analysis of institutional mouse parvoviruses[J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 95(1):32-37.
- [2] 王吉, 李晓波, 王洪, 等. 实验小鼠细小病毒(MMV)抗体的实验室检测能力验证结果评价[J]. *实验动物科学*, 2020, 37(2):5-13.
- [3] 王淑菁, 林欢, 付瑞, 等. 同时检测小鼠微小病毒(MVM)和小鼠细小病毒(MPV)的荧光定量 PCR 的建立及应用[J]. *实验动物科学*, 2018, 35(4):29-32.
- [4] Wang KW, Chueh LL, Wang MH, *et al.* Multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of minute virus of mice and mouse parvovirus infections in laboratory mice[J]. *Lab Anim*, 2013, 47(2):116-121.
- [5] Yan C, Cui J, Huang L, *et al.* Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(6):773-779.
- [6] 张锦海, 陈文琦, 韩一芳, 等. 逆转录环介导等温扩增技术检测 H7N9 禽流感病毒基因[J]. *东南国防医药*, 2019, 21(1):7-11.
- [7] 刘玉, 陈文琦, 王平, 等. 炭疽杆菌双重可视化 LAMP 检测方法的建立[J]. *东南国防医药*, 2016, 18(4):341-345.
- [8] Zhang X, Zhao Y, Ma C, *et al.* An optimized visual loop mediated isothermal amplification assay for efficient detection of minute virus of mice with hydroxynaphthol blue dye[J]. *J Virol Methods*, 2022, 308:114575.
- [9] Chen H, Sun C, Wang Y, *et al.* Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Duplex Reverse Transcription-Multi-enzyme Isothermal Rapid Amplification in a Point-of-Care Testing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:678703.
- [10] Sun ML, Lai HY, Chong NY, *et al.* Simple and Feasible Detection of Hepatitis B Virus via Combination of Multi-enzyme Isothermal Rapid Amplification and Lateral Flow Dipstick Strip[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8:763079.
- [11] Lu Y, Li MC, Liu HC, *et al.* Detecting Mycobacterium tuberculosis complex and rifampicin resistance via a new rapid multi-enzyme isothermal point mutation assay[J]. *Anal Biochem*, 2021, 630:114341.
- [12] 实验动物小鼠细小病毒 MVM 株 PCR 检测方法 T/CALAS28-2017. 全国团体标准信息平台[2017].
- [13] 陈杉, 马雪萍, 谢春梅, 等. 乙型肝炎病毒重组酶聚合酶等温扩增闭管可视化检测方法及装置[J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(5):515-520.
- [14] 蔡欣, 周婷婷, 朱进, 等. 逆转录重组酶介导的新型冠状病毒可视化快速检测方法的建立[J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(5):471-477.
- [15] Bauer BA, Riley LK. Antemortem detection of mouse parvovirus and mice minute virus by polymerase chain reaction (PCR) of faecal samples[J]. *Lab Anim*, 2006, 40(2):144-152.
- [16] Janus LM, Bleich A. Coping with parvovirus infections in mice: health surveillance and control[J]. *Lab Anim*, 2012, 46(1):14-23.
- [17] Lai J, Huang Z, Xiao Y, *et al.* Development and Evaluation of Duplex MIRA-qPCR Assay for Simultaneous Detection of Staphylococcus aureus and non-aureus Staphylococci. *Microorganisms* 2022, 10(9):1734. doi: 10.3390/microorganisms10091734.
- [18] Shelite TR, Bopp NE, Moncayo A, *et al.* Isothermal Recombinase Polymerase Amplification-Lateral Flow Point-of-Care Diagnostic Test for Heartland Virus[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2021, 21(2):110-115.
- [19] Uppada V, Gokara M, Rasineni GK. Diagnosis and therapy with CRISPR advanced CRISPR based tools for point of care diagnostics and early therapies[J]. *Gene*, 2018, 656:22-29.
- [20] Zhang M, Wang H, Wang H, *et al.* CRISPR/Cas12a-Assisted Ligation-Initiated Loop-Mediated Isothermal Amplification (CAL-LAMP) for Highly Specific Detection of microRNAs[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(22):7942-7948.

(收稿日期:2023-03-08; 修回日期:2023-04-25)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)