

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.06.16

应用等温环介导扩增方法检测蜜蜂残翅病毒的研究

庄明亮¹, 牛庆生¹, 陈东海¹, 王志¹, 李志勇¹, 梁勤^{2*}

(1. 吉林省养蜂科学研究所, 吉林 132108; 2. 福建农林大学, 福州 350002)

摘要: 本文的目的在于建立用于临床检测残翅病病毒 (Deformed wing virus, DWV) 的等温环介导扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 为该疾病的预防和控制提供理论依据。在 DWV 基因保守序列设计 4 条引物, 探究 LAMP 扩增的最优条件, 并与常规的 PCR (polymerase chain reaction) 检测方法进行比较。建立的 LAMP 方法检测下限为 0.89 pg, 灵敏度比 PCR 高 100 倍而且特异性好。临床检测显示建立的 LAMP 方法可行、准确、方便、灵敏。针对 DWV 的 LAMP 建立的检测方法为养蜂生产第一线检测和预防 DWV 提供了技术支持, 有一定的应用价值。

关键词: 残翅病毒; 环介导等温扩增; 检测

中图分类号: Q963; S893.3

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 06-1192-07

Diagnosis of the deformed wing cell virus (DWV) by loop-mediated isothermal amplification

ZHUANG Ming-Liang¹, NIU Qing-Sheng¹, CHEN Dong-Hai¹, WANG Zhi¹, LI Zhi-Yong¹, LIANG Qin^{2*}

(1. Apiculture Science Institute of Jilin Province, Jilin 132108, China; 2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The objective of this study is to establish a simple, fast and accurate method to deformed wing virus (DWV) in clinical by using loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which provides an experimental proof for controlling the disease. Four primers were designed based on six conserved regions of gene sequence on DWV, and were used for exploring the optimal LAMP amplification conditions. And the LAMP amplification result was compared conventional PCR (polymerase chain reaction) method. The established LAMP could detect as low as 0.89 pg DNA, which was 100 times sensitive than PCR method. Clinical result showed LAMP could be used to detect DWV whatever in Italian bee (*Apis mellifera ligustica*) or in Chinese bee (*A. cerana cerana*), and the real positive detected ratio was 20% higher than PCR tested. The established LAMP was practical valuable for detecting and controlling the DWV in honeybee keeping.

Key words: Deformed wing virus; loop-mediated isothermal amplification; detection

蜜蜂残翅病毒病是已报道的 20 种病毒病中最常见且具有高传染性的疾病 (Ellis and Munn, 2005; Neumann, 2010; 贾慧茹等, 2014), 病源为残翅病毒 (Deformed wing virus, DWV), 于上个

世纪 90 年代初从日本发病西方蜜蜂 *Apis mellifera* 分离获得 (Allen and Ball, 1996)。DWV 可以侵染蜜蜂发育幼虫、蛹、成蜂的各个阶段 (Chen and Siede, 2007), 发病的成蜂具有翅残缺卷曲、体色

基金项目: 国家蜂产业技术体系专项资金 (CARS-45-KXJ7)

作者简介: 庄明亮, 男, 1989 年生, 吉林辽源人, 硕士研究生, E-mail: mingliang89@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lq-fz@163.com

收稿日期: 2015-12-21; 接受日期: 2016-03-16

变暗、腹部膨胀和失去飞行能力等症状,大面积发生往往于夏秋两季 (Tentcheva *et al.*, 2004)。通常情况下 DWV 以隐性侵染方式存在蜂群,不表现明显症状,在特殊条件下病毒被激活 (Miranda and Genersch, 2010),但蜂群是如何从隐性状态转化成具有典型侵染特征直至致死状态的机制仍不得而知。有研究表明残翅病毒病的流行与爆发与蜂群内的狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 寄生密度有密切关系,但狄斯瓦螨的寄生不是该病发生的必要条件 (Martin *et al.*, 2010)。DWV 通过工蜂饲喂行为水平传播和侵染卵和精液垂直传播。DWV 具有分布广泛性、高致病性等特点,已成为蜜蜂烈性传染性疾病,给蜜蜂饲养管理上带来极大地危害。

DWV 属于传染性软腐病毒科,由 10140 个核苷酸组成正义单链 RNA (GenBank 登陆号: AJ489744),只有一个负责翻译和复制的开放阅读框,编码 328 ku 的多聚蛋白前体,含有 3 个主要衣壳蛋白 VP1 (44 ku)、VP2 (32 ku) 和 VP3 (28 ku) (Gaetana *et al.*, 2006; 梁勤和陈大福, 2009)。

环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是日本学者 Notomi 于 2000 年发明的一种新的核酸扩增技术 (Notomi *et al.*, 2000; Notomi and Nippon, 2007)。LAMP 是利用 4 条特殊设计的引物识别 6 个特定区域和具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,在恒温 60℃ - 65℃ 条件即可使目的 DNA 拷贝数扩增达到 10^9 , 特异、高效的完成反应。自此技术发明以来,已经应用于病毒病原体的检测、细菌病原体的检测、真菌病原体、寄生虫病的检测、动物胚胎性别的鉴别和转基因食品的检测等领域。蜜蜂残翅病毒病在基层养蜂单位主要诊断手段为症状判断,根据症状判断具有明显的滞后性,蜂群具有明显症状时往往疾病已经大面积爆发,错过的病害防控的最佳时期。在一些有条件的单位可以用 PCR 技术进行检测,但它具有操作复杂、特异性差、反应时间长等弊端,而且需要特殊的 PCR 仪,使得无法在基层单位大面积推广。病毒早期的检测对病毒病的防控意义重大,而应用 LAMP 检测 DWV 未见报道。本研究以 DWV 的保守区域建立 LAMP 检测方法,为基层养蜂生产的快速检测提供新的技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验用样品来自福州闽侯蜂场和福建农林大学蜂学学院,黑蜂王台病毒 (Black queen bee viruses, BQCV)、蜜蜂囊状幼虫病毒 (Sacbrood virus, SBV)、DWV 来自蜂学学院分子生物学实验室。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 试剂

TRIzol Reagent 购自 Ambion 公司,反转录试剂盒购自 Promega 公司, Dream Tap Green PCR Master Mix (2 ×) 购自 Thermo 公司, 2000 bp DNA Marker、Trans plus II DNA Marker 购自 Takara 公司, DNA 聚合酶 (Bst DNA Polymerase)、10 × Thermopol Buffer 购自 NEB 公司, 硫酸镁 ($MgSO_4$)、甜菜碱 (Betaine) 购自 Solarbio 公司, DNA Marker、引物由上海生工生物工程有限公司合成,乙醇、异丙醇、氯仿、琼脂糖及其他常用试剂均为分析纯。

1.2.2 仪器

主要仪器有电泳仪购自北京六一仪器厂; 5418 离心机购自美国 Eppendorf 公司; 凝胶成像仪购自上海培清生物技术有限公司; TU-1900 紫外可见分光光度计购自北京普析通用仪器公司; DK-8D 型电热恒温水槽购自上海精宏有限公司; PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司以及其他常用仪器。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计与合成

通过生物学软件 Blast 对 GenBank 中蜜蜂病毒基因进行序列分析得到保守基因序列。利用 Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/v4-manual/index.html>) 在线软件设计 LAMP 引物,设计 4 条引物包括 2 条外引物 (F3、B3) 和 2 条内引物 (FIP、BIP)。可以用外引物常规 PCR 方法来鉴定引物。引物由上海生物工程公司合成,用无离子水稀释放 -20℃ 备用 (表 1)。

1.3.2 蜜蜂 RNA 提取及 cDNA 的合成

对蜜蜂成年工蜂去除足和翅, 50 - 100 mg 先加 400 mL Trizol 在冰上用研磨棒进行充分研磨,直到看不见成块的几丁质外壳,然后转移到 1.5 mL 离心管中再加 600 mL Trizol,充分混匀,室温放置 5 min。10000 rpm, 4℃ 离心 10 min, 取

表 1 LAMP 引物
Table 1 Primers used for LAMP

引物 Primer	序列 (5'-3') Primer sequence	G + C (%)
DWV-F3	TCAATTATCAACGACACAGTT	33.3
DWV-B3	TCAGCATTAAGTCGTGCA	44.4
DWV-FIP	ACAGGCAAACAAGTATCTTCAAACAGGAAAAAGGGAATAAAACCTC	36.2
DWV-BIP	AAGTCCGGTACAGTTTACCATACCTCGATAGGATGCCATAAAGTC	44.4

上清 800 mL。加 0.2 mL 氯仿，剧烈震荡 30 s，室温放置 3 min。10000 rpm，4℃ 离心 10 min，取上清 600 mL，尽量避免吸沉淀。使用加入 0.5 mL 的异丙醇，轻柔地混匀，室温放置 10 min。10000 rpm，4℃ 离心 10 min，去上清，形成白色点状沉淀。加 -20℃ 冷藏的 1 mL 75% 乙醇，剧烈震荡。7500 rpm，4℃ 离心 5 min。去除上清，室温晾晒 5 min。沉淀溶于 20 - 50 μL 无酶水中，用枪吸吹混匀，-80℃ 保存备用。

使用 Promega 反转录试剂盒合成 cDNA，建立 20 μL 反应体系包括：MgCl₂、5 × buffer、Inhibitor、随机引物、Transcriptase、PCR Nucleotide Mix。42℃ 水浴延伸 15 min，70℃，15 min 的反转录酶灭活。所得到的 cDNA 产物作为 LAMP 反应模板。

1.3.3 LAMP 检测残翅病毒方法的建立

配制 25 μL LAMP 初始反应体系 (表 2)：

表 2 残翅病病毒 LAMP 体系建立

Table 2 The detection system of LAMP for DWV

成份 Element	使用量 (μL) Amount
10 × Thermopol Buffer	2.5
dNTP (10 mmol/L)	1.0
Bst DNA Polymerase (8000 U/mL)	1.0
Betaine (10 mmol/L)	2.0
MgSO ₄ (100 mmol/L)	2.0
FIP, BIP (40 mmol/L)	0.5
B3, F3 (10 mmol/L)	0.5
模板 Template	1.0
ddH ₂ O	补至 25

1.3.4 DWV LAMP 检测体系主要条件优化

1.3.4.1 LAMP 体系中最佳反应时间和温度的确定

为获得 LAMP 扩增的最优体系和条件，依次对反应温度 61℃、62℃、63℃、64℃、65℃ 进行梯度优化。DWV - LAMP 以 30 min、45 min、

60 min、75 min 梯度优化。反应产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察，根据所得条带清晰和明亮程度来确定最佳反应时间和温度。

1.3.4.2 LAMP 体系中最佳外引物与内引物比例的确定

确定外引物浓度调整内引物的浓度，使外、内引物比达到 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7，固定体系其他条件，进行 LAMP 反应，反应结束后再进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，根据扩增条带清晰及明亮程度确定最终的内外引物反应比例体系。

1.3.4.3 LAMP 体系中最佳 Betaine 浓度的确定

选择之前确定最佳的内外引物比，以甜菜碱终浓度以 0、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1 mmol/L、1.2 mmol/L、1.6 mmol/L、2.0 mmol/L 分别进行优化固定体系其他条件，进行 LAMP 反应，根据扩增条带清晰及明亮程度确定最终的最佳 Betaine 浓度。

1.3.4.4 LAMP 体系中最佳 MgSO₄ 浓度的确定

选择之前确定最佳的内外引物比和 Betaine 浓度，DWV LAMP 调整 Mg²⁺ 终浓度以 0、2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L、10 mmol/L、18 mmol/L 梯度优化固定体系其他条件，进行 LAMP 反应，根据扩增条带清晰及明亮程度确定最终的最佳 MgSO₄ 浓度。

1.3.5 LAMP 方法敏感性测定

用紫外分光光度仪检测样品 RNA 浓度，然后依次稀释 10 倍，建立浓度梯度。用优化好的 DWV LAMP 方法和一般的 PCR 法同时进行检测。反应结束取扩增产物，琼脂糖电泳，成像仪观察结果。

1.3.6 可视化 LAMP 特异性试验

用可视化 LAMP 方法分别对 BQCV、SBV、DWV 进行扩增，即在原体系加入整合好的 1 μL 钙黄绿素染料，观察颜色变化情况并用常规 LAMP 法电泳对比扩增反应结果，验证此 LAMP 方法的特异性和可视化 LAMP 的可行性。

1.3.7 临床样本的 LAMP 与 PCR 对比检测

对本研究室采集的 20 头意大利蜜蜂成蜂样本按照步骤 2 中方法进行提取 RNA 及反转录 cDNA 进行 LAMP 及 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 DWV-LAMP 反应体系的优化

根据 LAMP 反应原理在 61℃ - 65℃ 进行温度优化, 多次重复梯度条带没有明显区别 (图 1A), 最后选择中间温度 63℃ 作为 DWV-LAMP 最终反应

温度。第 3 与 4 条泳道清晰明亮一些, 但没有明显的区别, 出于简便快速完成反应的考虑选择第 3 条泳道代表的时间作为最终反应时间, 即 60 min (图 1B)。泳道 1、2 没有反应, 第 3 泳道最为清晰明亮程度, 故选择第 3 条泳道作为最终外内引物比 1:4, 即 DWV-F3、DWV-B3 为 0.4 μmol/L, DWV-FIP、DWV-BIP 为 1.6 μmol/L (图 1C)。根据明亮、清晰程度选择第 1 条泳道作最终 Betaine 浓度, 即 0 (图 1D)。第 2 条泳道作为最终 Mg²⁺ 浓度, 即 2 mmol/L (图 1E)。

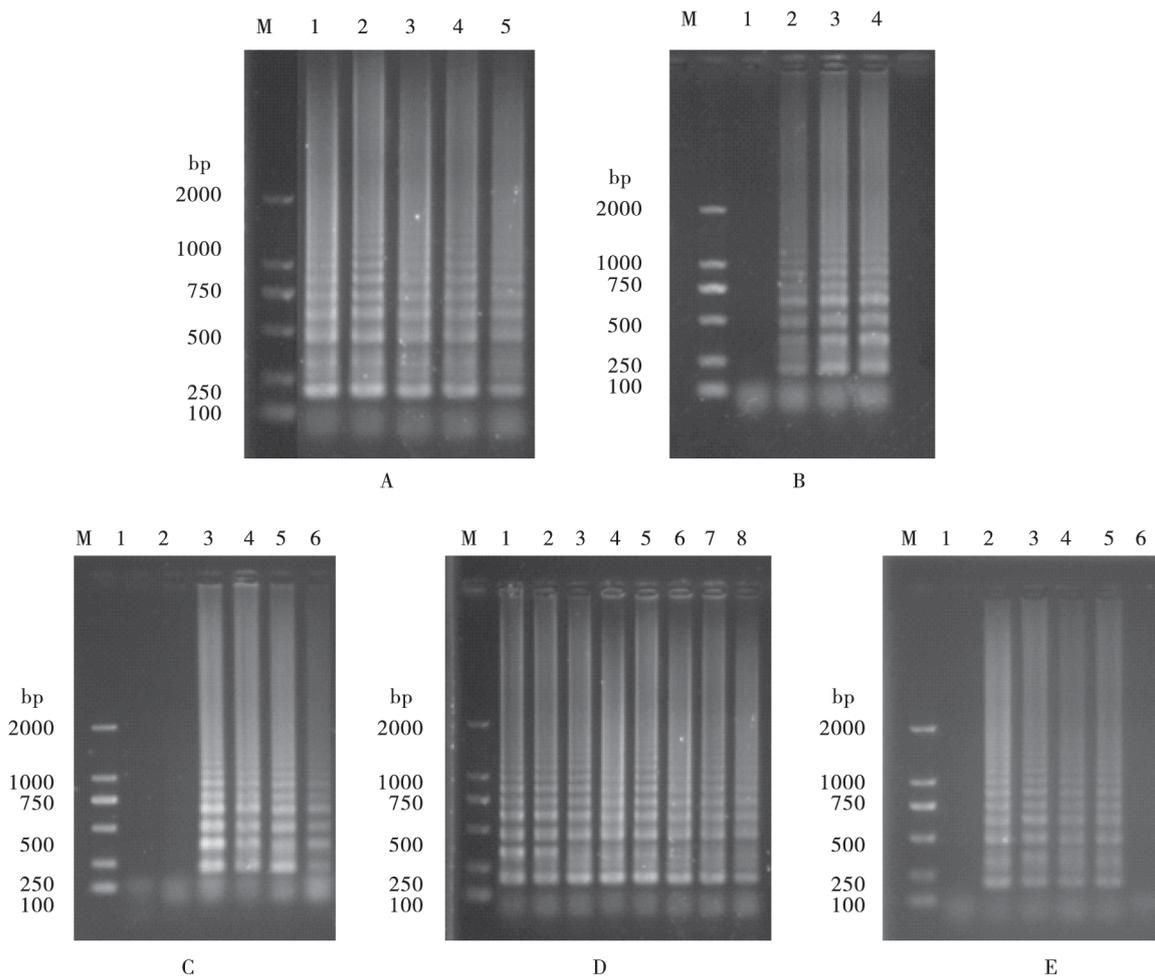


图 1 残翅病毒 LAMP 体系优化

Fig. 1 The optimization of LAMP for DWV

注: M, DNA 分子质量标准; A, 1-5 泳道分别为反应温度 61℃、62℃、63℃、64℃、65℃; B, 1-3 泳道为反应时间 30 min、45 min、60 min、75 min; C, 1-6 泳道为 DWV-LAMP 外引物与内引物比例 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7; D, 1-8 泳道为甜菜碱终浓度 0、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L、1.6 mmol/L、2.0 mmol/L; E, 1-6 泳道为 Mg²⁺ 终浓度 0、2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L、10 mmol/L、18 mmol/L。Note: M, DNA marker; A, Lane 1-5 temperature 61℃, 62℃, 63℃, 64℃, 65℃; B, Lane 1-3 time 30 min, 45 min, 60 min, 75 min; C, Lane 1-6 ratio of the internal to the external primers form 1:2 to 1:7; D, Lane 1-8 Betaine: 0, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L, 1.6 mmol/L, 2.0 mmol/L; E, Lane 1-6 Mg²⁺: 0, 2 mmol/L, 4 mmol/L, 6 mmol/L, 10 mmol/L, 18 mmol/L.

2.2 LAMP 外引物的 PCR 反应与鉴定

1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 阳性扩增可见清晰明亮的条带, 大小片段与预期 216 bp 相吻合 (图 2B)。测序结果在 NCBI 中 Blast 与 AJ489744 对比覆盖范围 86%, 同源率达到 96%, 表明检测样本发现 DWV, 同时说明此 LAMP 引物可用于检测 DWV。

2.3 LAMP 与 PCR 的敏感性对比实验

用已完成优化的 DWV LAMP 体系与常规 PCR 同等条件下进行检测, 灵敏度结果显示 DWV LAMP 体系可达 8.9 fg 的 RNA 模板 (图 2A)、DWV PCR 体系可达 8.9 pg 的 RNA 模板 (图 2B), 说明 DWV LAMP 的灵敏度比常规 PCR 高 100 倍。

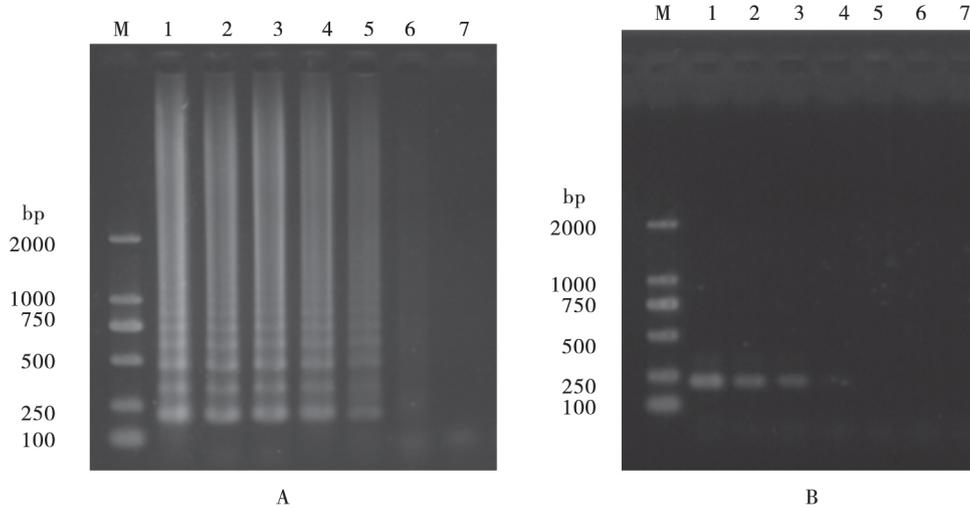


图 2 LAMP (A) 与 PCR (B) 敏感性对比图

Fig. 2 The sensitivity comparison of LAMP and PCR

注: M, DNA 分子质量标准; A, 依次稀释 10 倍 DWV 模板的 LAMP 琼脂糖凝胶电泳结果, 1-7: 8.9 ng、0.89 ng、89 pg、8.9 pg、0.89 pg、89 fg、8.9 fg; B, 依次稀释 10 倍 DWV 模板的 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果, 1-7, 8.9 ng、0.89 ng、89 pg、8.9 pg、0.89 pg、89 fg、8.9 fg。Note: M, DNA marker; A, Agarose gel electrophoresis of LAMP products using 10-fold dilution DWV, 1-7, 8.9 ng, 0.89 ng, 89 pg, 8.9 pg, 0.89 pg, 89 fg, 8.9 fg; B, Agarose gel electrophoresis of PCR products using 10-fold dilution DWV, 1-7, 8.9 ng, 0.89 ng, 89 pg, 8.9 pg, 0.89 pg, 89 fg, 8.9 fg.

2.4 可视化 DWV-LAMP 的特异性试验

用已完成优化反应的 DWV-LAMP 检测, 最终结果显示只有 DWV 的 cDNA 反应呈多梯形条带出现, 对照的 BQCV、SBV 的 cDNA 和阴性对照没有多梯形条带 (图 3A)。荧光可视化结果只有 DWV 试管显绿色荧光, 其他阴性对照和 BQCV、SBV 试管显橘色 (图 3B)。

2.5 临床样本的检测

检测意大利蜜蜂 20 个样品 LAMP 检测阳性数量分别为 11; PCR 检测阳性数量为 7 (表 3)。PCR 检测阳性的样品 LAMP 均显示阳性, 说明 LAMP 检测准确度高。且 LAMP 阳性数量比 PCR 多检出 4 个, 说明 LAMP 检测灵敏度高。且 LAMP 方法在在一个水浴锅反应仪器下比 PCR 节约 2 h。

表 3 LAMP 和 PCR 对临床样本检测结果

Table 3 Results of LAMP and PCR for clinical samples

品种 Variety	方法 Methods	样品数 Samples	阳性检测数 Positive counts
意大利蜜蜂	LAMP	20	11
<i>Apis mellifera ligustica</i>	PCR	20	7

3 结论与讨论

蜜蜂的残翅病毒病是由病原体 DWV 所引起的一种病害, 感染率高严重危害蜜蜂群势健康发展。提前、快速、准确的发现病原对于早期病害的防控至关重要。

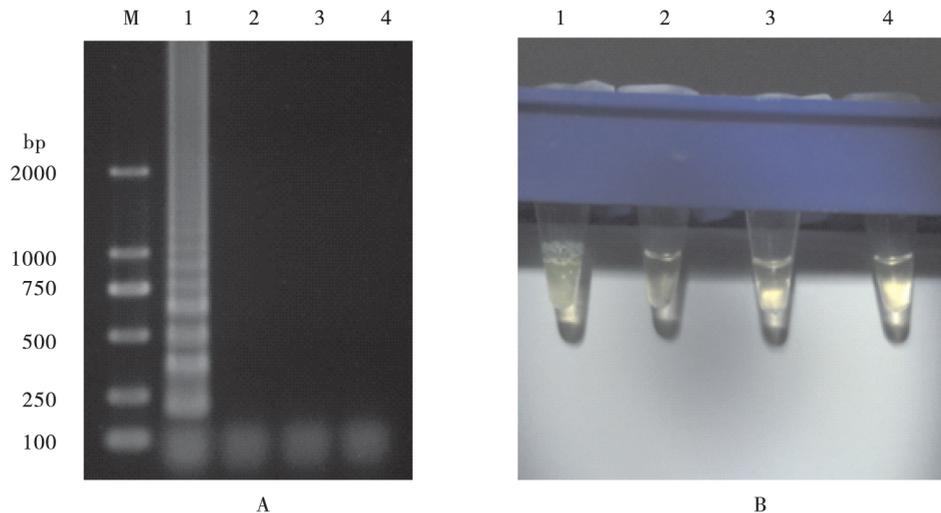


图3 DWV LAMP 反应特异性扩增结果

Fig. 3 LAMP specific amplified products of DWV

注: M, DNA 分子质量标准; A, DWV-LAMP 反应特异性琼脂糖凝胶电泳图: 1, 残翅病毒; 2, 黑蜂王台病毒; 3, 囊状幼虫病毒; 4, 阴性对照; B, 荧光可视化特异性试验: 1, 残翅病毒; 2, 黑蜂王台病毒; 3, 囊状幼虫病毒; 4, 阴性对照。Note: M, DNA marker; A, LAMP specific amplified products of DWV: 1, DWV, deformed wing virus; 2, BQCV, black queen bee viruses; 3, SBV, sacbrood virus; 4, Negative control; B, the visual observation of specific amplified products of BQCV: 1, DWV, deformed wing virus; 2, BQCV, black queen bee viruses; 3, SBV, sacbrood virus; 4, Negative control.

目前应用检测 DWV 技术主要有免疫学方法及 PCR 方法。免疫学方法存在操作时间长、敏感性和特异性低、有效的抗血清不易寻找等弊端。随着 PCR 技术发展, 现已成为主流的 DWV 检测方法, 但在生产实践中, PCR 检测方法需要特定的仪器和较长的时间, 在一些基层单位无法应用。而 LAMP 技术是一种等温核酸扩增技术, 通过可视化方法, 整个反应过程只需要恒温水浴锅在一个小时内即可完成检测, LAMP 方法发明至今已被广泛用于多种病原体的检测, 如兔出血病病毒 (原冬伟等, 2013)、禽流感病毒 (Dinh *et al.*, 2011)、家蚕核型多角体病毒 (唐芬芬等, 2013) 等。本试验经过多次验证及重复性试验优化后的 LAMP 体系对 SBV、BQCV 的检测均为阴性, 表明所建立的 DWV-LAMP 体系特异性强; 而且 DWV-LAMP 方法检测灵敏度比 DWV 用 PCR 灵敏度高出 100 倍, 可用于 DWV 的早期诊断。建立的 DWV LAMP 可视化反应体系, 只需在水浴锅中反应 65 min 即可观察结果。

LAMP 的引物设计工作在整个实验中起十分关键的作用。由于 LAMP 设计要针对靶基因序列 6 个区域设计 4 条引物, 要求靶基因序列的保守性较高。首先通过 NCBI 找到 DWV 同属其他病毒基因

的全序列, 通过 DNAMAN 软件进行序列对比, 找到同源性高的区域, 这是在长期进化变异过程中保守的部分; 对照在国内的不同亚型, 发现这 3 种亚型基因序列上差异不大, 找到的大约 800 bp 的序列。而且可以设计 2-3 对引物, 通过引物筛选设计成功率比较高。具体的引物设计过程需要注意如下几步: 1) 5'端 F2 区域到 B2 区域之间的距离控制在 120-180 bp, F1、F2、F3 和 B1、B2、B3 各个区域间距在 18-20 bp; 2) 引物 Tm 值: 富含 AT 片段 55℃-60℃, 富含 GC 片段 60℃-65℃。6 个区域的 TM 值满足: F2 > F3、B3; B2 < F1、B1; F2 < B2。

本研究建立的 LAMP 方法和可视化 LAMP 方法具有操作简便、快速、灵敏度高特点, 可用于快速准确诊断出残翅病毒, 对病毒侵染初期时, 为蜜蜂残翅病毒病诊断、防治提供了一种准确、简便的新方法。为提前预防有效防控该病和降低蜂产品中药物残留提供了技术保障, 对日后蜜蜂病害诊断和检测必能起到促进作用。

参考文献 (References)

- Allen M, Ball B. The incidence and world distribution of honey bee viruses [J]. *Bee World*, 1996, 77 (3): 141-162.
Chen YP, Siede R. Honey bee viruses [J]. *Advances in Virus Research*,

- 2007, 70 (7): 33–80.
- Dinh DT, Le MT, Vuong CD, *et al.* An updated loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of H5N1 avian influenza viruses [J]. *Tropical Medicine Health*, 2011, 39 (1): 3–7.
- Ellis JD, Munn PA. The worldwide health status of honey bees [J]. *Bee World*, 2005, 86 (4): 88–101.
- Gaetana L, Miranda JR, MaRIA BB, *et al.* Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honey bees (*Apis mellifera*) [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80 (10): 4998–5009.
- Jia HR, Liu JZ, Wang X, *et al.* Occurrence and prevalence of six bee viruses in Beijing [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2014, 51 (3): 772–780. [贾慧茹, 刘进祖, 王星, 等. 北京地区六种蜜蜂病毒病的流行病学研究 [J]. *应用昆虫学报*, 2014, 51 (3): 772–780]
- Liang Q, Chen DF. Bee Protection [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2009: 216. [梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 216]
- Martin SJ, Ball BV, Carreck NL, *et al.* Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated *Varroa destructor* infested honey bees (*Apis mellifera*) colonies [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2010, 49 (1): 72–79.
- Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103 (1): 48–61.
- Neumann P, Carreck NL. Honey bee colony losses [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2010, 49 (1): 1–6.
- Tentcheva D, Gauthier L, Jouve S, *et al.* Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor* [J]. *Apidologie*, 2004, 35 (4): 431–439.
- Tang FF, Yang WK, Shao YL, *et al.* Prompt diagnosis of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50 (4): 1013–1019. [唐芬芬, 杨伟克, 邵榆岚, 等. 应用环介导等温扩增技术 (LAMP) 快速检测家蚕核型多角体病毒的研究 [J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50 (4): 1013–1019]
- Yuan DW, Liu JS, Guo DC, *et al.* Application of a loop-mediated isothermal amplification method in detection of RHDV [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43 (4): 390–395. [原冬伟, 刘家森, 郭东春, 等. 环介导等温扩增技术兔出血症病毒检测中的应用 [J]. *中国兽医科学*, 2013, 43 (4): 390–395]