应用环介导等温扩增技术（LAMP）检测蜜蜂黑蜂王台病毒的研究*

庄明亮** 李江红 陈大福 梁 勤***

（福建农林大学蜂学学院，福州 350002）

摘 要 **【目的】** 本文旨在建立用于临床检测黑蜂王台病毒（Black queen cell virus，BQCV）的环介导等温扩增技术（Loop-mediated isothermal amplification，LAMP），为该疾病的检测和防控提供技术支撑。**【方法】** 根据 BQCV 基因保守序列设计 4 条特异性引物，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。**【结果】** 建立的 LAMP 方法特异性好，检测下限为 86 fg，灵敏度比 PCR 高 100 倍。临床检测显示其对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 和中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 均准确有效，且检出率比普通 PCR 法高 10%~20%。**【结论】** 建立的针对 BQCV 的 LAMP 检测方法为养蜂生产第一线检测和预防 BQCV 提供了技术支持，有一定的应用价值。

关键词 黑蜂王台病毒，环介导等温扩增，检测，诊断

Diagnosis of the black queen cell virus (BQCV) by loop-mediated isothermal amplification

ZHUANG Ming-Liang** LI Jiang-Hong CHEN Da-Fu LIANG Qin***

(College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract **[Objectives]** To establish a simple, fast and accurate method to detect black queen cell virus (BQCV) using loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which provides an experimental data for controlling the disease. **[Methods]** Four primers based on six conserved regions of the BQCV gene sequence were used to develop optimal LAMP amplification conditions and the resultant LAMP amplification results compared those of conventional PCR (polymerase chain reaction). **[Results]** The LAMP method could detect viral concentrations as low as 86 fg DNA, which is 100 times more sensitive than PCR. Clinical results show that LAMP can be used to detect BQCV in either Italian (*Apis mellifera ligustica*) or Chinese bees (*Apis cerana cerana*), with a true positive detection ratio 10%–20% higher than that of PCR. **[Conclusion]** The newly developed LAMP test is a practical and valuable method for detecting and controlling BQCV in honeybees.

Key words black queen cell virus, loop-mediated isothermal amplification, detection, diagnosis

黑蜂王台病是由黑蜂王台病毒（Black queen cell virus，BQCV）引起蜂王蛹和幼虫致死的一种在世界范围广泛传播的疾病（Allen and Ball，1996）。BQCV 最早发现于西方蜜蜂死亡的蜂王蛹和幼虫中（Mongi *et al.*，2002），韩国的东方蜜蜂也有黑蜂王台病毒的报道（Jin *et al.*，2013），中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 还未见报道。春季和初夏为集中发病时期，致死蜂王幼虫后迅速变

* 资助项目：国家蜂产业技术体系专项资金（CARS-44-KXJ7）

**E-mail: mingliang89@126.com

***通讯作者，E-mail: lq-fz@163.com

收稿日期：2014-06-30，接受日期：2014-09-10

成黑色，形成类似于蜜蜂囊状幼虫病的坚韧的囊，王台壁由健康的暗棕色变成黑色（Ellis and Munn，2005）。其对成年工蜂的侵染主要是隐性侵染方式长期存在蜂群中（张炫等，2012），但同时感染 BQCV 和微孢子虫（*Nosema* sp.）的成蜂比单独感染微孢子虫的成蜂寿命明显缩短，这两种病害联合侵染蜜蜂时表现极强的致病性（Ribiere *et al.*，2008）。另外由于在培育蜂王的蜂群中，有大量的王台存在，发病率较高，可导致育王成功率和质量下降，对蜜蜂饲养尤其是种王饲养业危害极大。

BQCV 是双顺反子病毒属的一条正义单链 RNA 病毒（NCBI 收录号：AF183905），4 个衣壳蛋白构成直径 30 nm 的等轴粒子。基因组全长 8 550 bp，有两个开放阅读框（ORF1、ORF2），分别为 5′端的 ORF1（658~5 625）长 4 968 bp，3′端的 ORF2（5 834~8 395）长 2 562 bp（Neil *et al.*，2000；梁勤和陈大福，2009；Jin *et al.*，2013）。

环介导等温平衡扩增技术（Loop-mediated isothermal amplification，LAMP）是 2000 年日本学者 Notomi 等开发的一种全新的等温核酸扩增方法（Notomi *et al.*，2000；Notomi and Nippon，2007）。其原理是针对目的基因保守序列的 6 个区域设计 4 条引物，通过 30 ~60 min 恒温的环境（60~65℃）进行置换循环扩增，扩增产物的检测可通过染料一步完成（Curtis *et al.*，2008）。该方法具有操作简便、仪器要求简单、高敏感度、高特异性、成本低廉、直接观察结果等特点，尤其适合基层技术人员检测病源使用（刘永生等，2010；Wang *et al*，2010）。目前生产实践中检测蜜蜂黑蜂王台病毒主要通过观察症状和 PCR（Polymerase chain reaction）方法等。但蜂群有明显症状时病害已大面积发生，错过了最佳防控时期，具有明显滞后性；一般 PCR 检测要求专门的热循环仪，价格昂贵不利于在基层广泛的推广和使用。病毒的早期检测技术对于病害的防控意义重大，但在蜜蜂上还未见应用 LAMP 检测病源的报道。本研究针对 BQCV 建立 LAMP 检测方法，为基层养蜂生产对 BQCV 的检测和预防提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

意大利蜜蜂采自福州福建农林大学蜂学学院教学蜂场，中华蜜蜂采自福州闽侯中华蜜蜂蜂场，BQCV、蜜蜂囊状幼虫病毒（SBV）、蜜蜂残翅病毒（DWV）来自本实验室保存的毒株。

1.2　主要试剂及仪器

1.2.1　试剂　TRlzol 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，*DNA* 聚合酶（Bst DNA Polymerase）、10× Thermopol Buffer 购自 NEB 公司，甜菜碱（Betaine）、硫酸镁（$Mgso_4$）购自 Solarbio 公司，DNA Marker、引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，氯仿、异丙醇、琼脂糖、乙醇及其他常用试剂均为分析纯。

1.2.2　仪器　主要仪器有 5418 离心机购自美国 Eppendorf 公司；电泳仪购自北京六一仪器厂，凝胶成像仪购自上海培清生物技术有限公司；PCR 仪购自 Applied Biosystems 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实验设备有限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　在 NCBI 基因库查询全基因序列（收录号: AF183905），通过 NCBI Blast 软件对比得到同源性 95%以上的保守基因序列，利用 Primer Explorer V4（http://primerexplorer.jp/e/v4-manual/index.htmL）在线软件设计 LAMP 引物，首先找到靶基因 6 个特异区域即 F3c、F2c、F1c 和 B1、B2、B3；再设计 4 条引物，外引物为 BQCV-F3 和 BQCV-B3，内引物为 BQCV-FIP 和 BQCV-BIP（图 1）。其中 BQCV-FIP 包含 F1c 和 F2 序列，即 F1c-F2；内引物 BQCV-BIP 包含 B1c 和 B2 序列，即 B1c-B2，具体引物序列见表 1。引物均由上海生工生物科技有限公司合成，

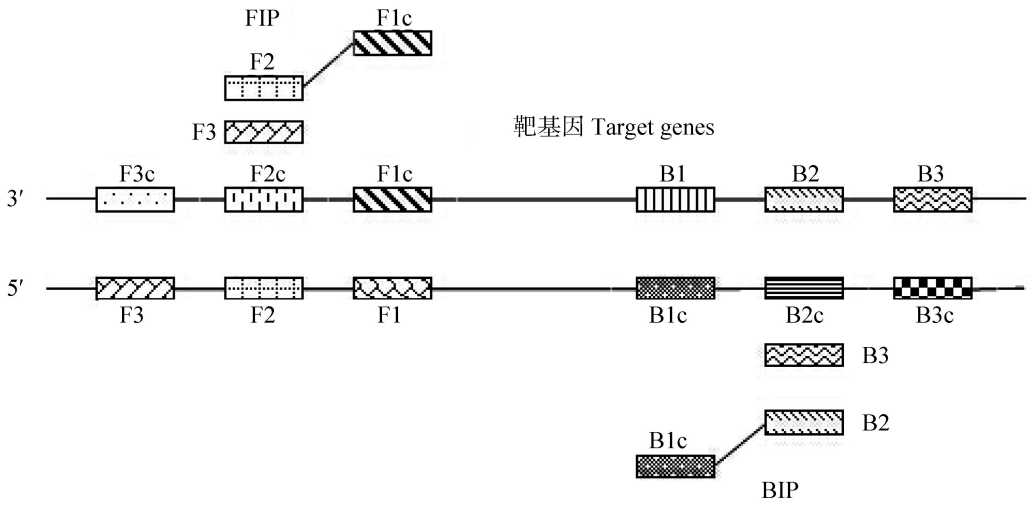

图 1 靶基因 6 个保守区域及引物的设计
Fig. 1 Six regions of target genes and primer design

表 1 LAMP 引物
Table 1 Primers used for LAMP

引物 Primer	序 列(5′-3′) Primer sequence	G+C
BQCV-F3	CTCCTTTGGCAATAGAACAA	40.0%
BQCV-B3	CCGATAAAGATGGAAAAGTCC	42.9%
BQCV-FIP	GCTCTAAACGAAGATGACAAACATG-CCTATAAAGGGAGTCGCAG	45.5%
BQCV-BIP	ATAGTTCAGGTCGGAATAATCTCGA-TATCATCTCCCGCACCAA	44.2%

将引物用去离子水稀释至 100 μm/L，－20℃保存备用。

1.3.2 蜜蜂 RNA 提取及 cDNA 的合成 对蜜蜂成年工蜂去除翅和足，80~100 mg 先加 400 mL 的 Trizol 用研磨棒在冰上进行充分研磨，直到见不到成块的几丁质外壳，转移到 1.5 mL 的离心管中再加 600 mL 的 Trizol，振荡器充分混匀，室温静置 5 min。10 000×4℃离心 10 min，吸取上清 800 mL。加 0.2 mL 的氯仿，剧烈震荡 30 s，室温孵育 3 min。10 000×4℃离心 10 min，吸取上清 600 mL，尽量避免吸取沉淀残渣。使用 1 mL Trizol 加入 0.5 mL 的异丙醇，轻柔地颠倒混匀，室温孵育 10 min。10 000×4℃离心 10 min，去上清，在管底和侧壁形成白色点状沉淀。加－20℃冷藏的 1 mL 75%乙醇，剧烈漩涡。7 500×4℃离心 5 min。去除上清，金属浴 50℃保留 10 s 至半干或室温晾晒 5 min。沉淀溶于 30~50 μL 无酶水中，用移液枪吸吹混匀，－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：5×buffer、$Mgcl_2$、随机引物、PCR Nucleotide Mix、Inhibitor、Transcriptaste。42℃水浴 15 min 延伸反应，

* 资助项目：国家蜂产业技术体系专项资金（CARS-44-KXJ7）
**E-mail: mingliang89@126.com
***通讯作者，E-mail: lq-fz@163.com
收稿日期：2014-06-30，接受日期：2014-09-10

70℃15 min 的反转录酶灭活。所得到的产物作为 LAMP 反应模板。

1.3.3　LAMP 检测黑蜂王台病病毒方法的建立　配制 25 μL 的 LAMP 初始反应体系，具体见表 2。

1.3.4　LAMP 体系主要条件的优化　建立表 2 配置的反应体系，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；反应时间 30、45、60 min 梯度优化；外内引物比 1∶2、1∶3、1∶4、1∶5、1∶6、1∶7 不同比例进行优化；Mg^{+}终浓度以 0、2、4、6、8、10、18、20 mmol/L 梯度优化；甜菜碱终浓度以 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0 mmol/L 分别进行优化。

表 2　黑蜂王台病病毒 LAMP 体系建立
Table 2　The detection system of LAMP for BQCV

成份 Element	使用量 Amount
10×Thermopol Buffer	2.5 μL
Bst DNA	1.0 μL
Polymerase (8 000 U/mL)	1.0 μL
dNTP (10 mm/L)	2.0 μL
$Mgso_4$ (100 mm/L)	2.0 μL
Betaine (10 mm/L)	0.5 μL
B3, F3 (10 mm/L)	0.5 μL
FIP, BIP (40 mm/L)	1.0 μL
模板 Template	1.0 μL
ddH2O	补至 25 μL

1.3.5　PCR 扩增区域的克隆测序　验证扩增区域的正确性，利用 LAMP 外引物 F3、B3 建立 PCR 反应扩增目标区域，理论扩增产物大小为 217 bp。PCR 反应体系：1 μL 的上、下游引物（10 μmol/L），5 μL 的 10×HiFi Buffer，4 μL 的 2.5 mmol/L dNTPs，1 μL 的 HiFi DNA Polymerase，2 μL 模板 cDNA，去离子水 36 μL。PCR 反应程序是：94℃预变性 5 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 45 s，共计 30 个循环；72℃延伸 10 min。使用 1.2%琼脂糖凝胶，100 V 电压，电流 50 mA，时间 35 min，观察是否出现 217 bp 条带。使用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化，然后将 PCR 纯化产物与载体 pEASY T1 Simple vector 进行连接。连接后的产物和感受态细胞热激 1 h，37℃培养过夜。重组质粒提取，通过 PCR 和酶切验证阳性克隆，抽取相应的菌液送往华大科技公司测序。测序得到序列在 NCBI 中的 BLAST 进行对比分析。

1.3.6　敏感性和特异性试验验证　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 LAMP 方法和一般的 PCR 法同时进行检测。

用可视化 LAMP 方法分别对 BQCV、SBV、DWV 进行扩增，即在原体系加入螯合好的 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 LAM 方法的特异性和可视化 LAMP 的可行性。

1.3.7　临床样本的检测　对 2014 年 3—4 月份采集的中华蜜蜂和意大利蜜蜂各 20 份成年工蜂样品进行 PCR 鉴定，同时用已经建立好的 LAMP 方法的检测，并比较两种方法的阳性检测率。

2　结果与分析

2.1　LAMP 反应条件的优化

根据反应原理在 61~65℃进行温度优化，多次重复梯度条带没有明显区别（图 2∶A），最后选择中间温度 63℃作为最终反应温度。第 2 条泳道与第 3 条泳道差别不大，选择时间短的第 2 条泳道作为最终反应时间，即 45 min（图 2∶B）。根据条带清晰、明亮程度选择第 2 条泳道（图 2∶C）、第 4 条泳道（图 2∶D）、第 2 条泳道（图 2∶E）作为外内引物比、Mg^{2+}浓度、Betaine 浓度的最佳浓度，即 BQCV-F3、BQCV-B3 为 0.4 μmol/L，BQCV-FIP、BQCV-BIP 为 1.2 μmol/L；Mg^{2+} 2 mmol/L；Betaine 0.8 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 217 bp 相吻合（图 3）。测序结果在 NCBI 中 Blast 与 JN185932.1 对比覆盖范围 95%，同源率达到 100%，表明检测样本发现 BQCV，同时说明此 LAMP 引物可

用于检测 BQCV。

2.3 LAMP 与 PCR 的敏感性对比试验

使用已经优化的 BQCV-LAMP 体系进行检测，灵敏度结果显示可达 86 fg 的 RNA 模板（图 4：A），常规 PCR 灵敏度 8.6 pg 的 RNA 模板（图 4：B），说明 LAMP 的灵敏度比 PCR 的要高 100 倍。

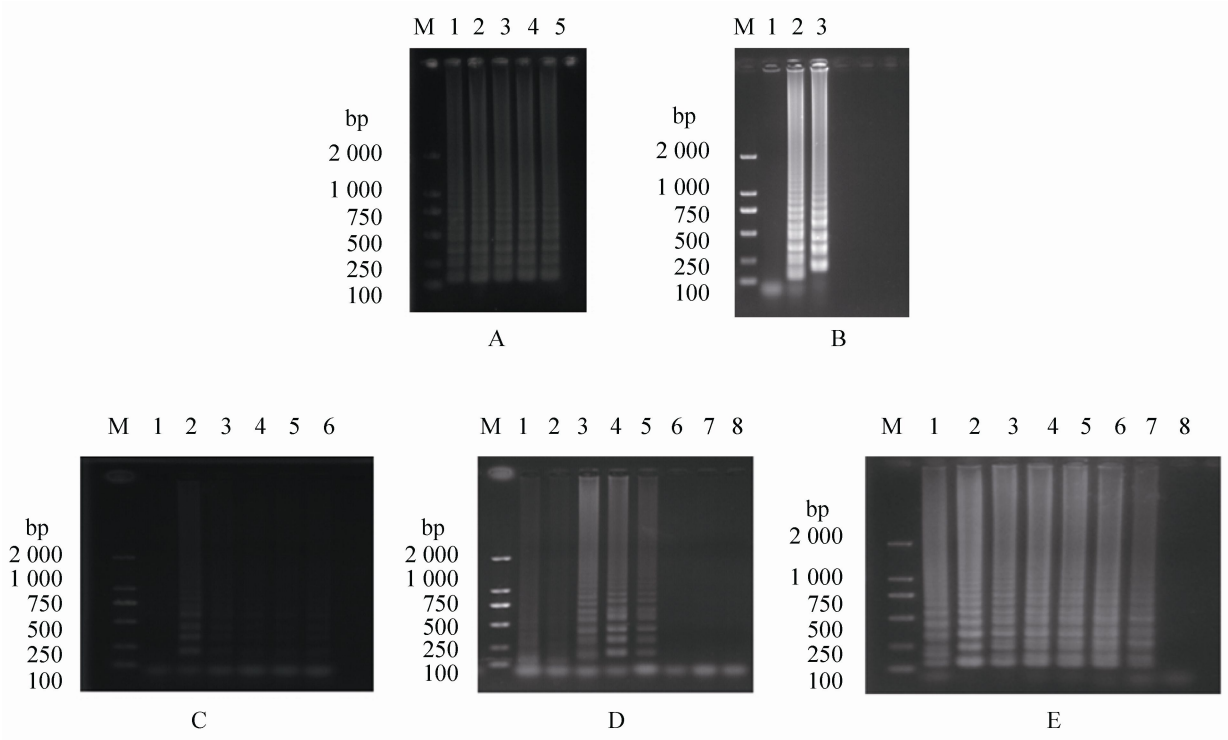

图 2 黑蜂王台病毒 LAMP 体系优化

Fig. 2 The optimization of LAMP for BQCV

泳道 M：DNA 分子质量标准；A：1~5 泳道为反应温度 61、62、63、64、65℃；B：1~3 泳道为反应时间 30、45、60 min；C：1~6 泳道为 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、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0 mmol/L；E：1~8 泳道为 Mg^{+}终浓度 0、2、4、6、8、10、18、20 mmol/L。

Lane M: DNA marker; A: Lane 1-5 temperature 61, 62, 63, 64, 65℃; B: Lane 1-3 time 30, 45, 60 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, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2,1.6 mmol/L; E: Lane 1-8 $MgSO_4$: 0, 2, 4, 6, 8,10, 18, 20 mmol/L.

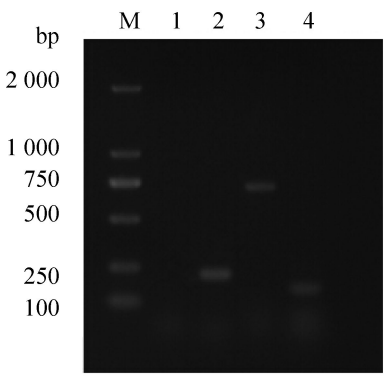

图 3 PCR 检测黑蜂王台病毒结果

Fig. 3 The detection results of PCR for BQCV

M: DNA 分子质量标准；1：阴性对照；2：BQCV LAMP 外引物；3：Yuriko 已发表；4：内参 150 bp。

M: DNA marker; 1: Negative control; 2: The former primer of LAMP for BQCV; 3: Yuriko published; 4: β-actin 150 bp.

2.4 可视化 LAMP 的特异性试验

使用已经优化的 BQCV-LAMP 体系进行检测，结果显示只有 BQCV 的 cDNA 反应有梯形条带，对照的 SBV、DWV 的 cDNA 没有梯形条带出现（图 5：A）。可视化结果只有 BQCV 有绿色荧光，其他

的 SBV、DWV 和阴性对照呈橘色（图 5：B）。

2.5　LAMP 反应结果的观察

阳性结果会有白色焦磷酸镁试管出现浑浊，但肉眼往往不易分辨。可通过以下 3 种方法鉴定：1）离心后试管底部有白色沉淀；2）加入钙黄绿素荧光染料，在紫外灯下发出明亮的绿色荧光；3）反应产物经过琼脂糖凝胶电泳，可发现弥散状梯形条带。

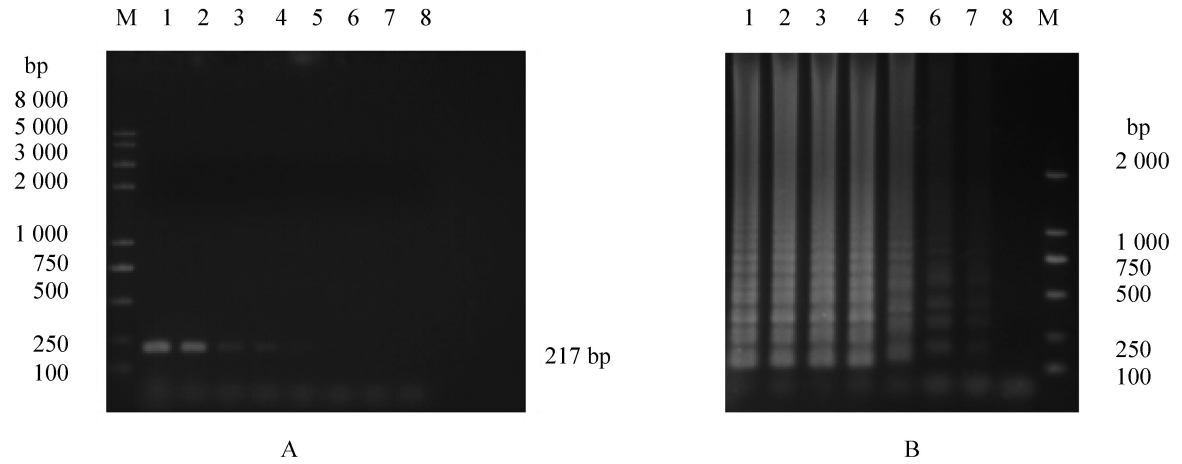

图 4　PCR（A）与 LAMP（B）敏感性对比图

Fig. 4　The sensitivity comparison of PCR and LAMP

M：DNA 分子质量标准；A：以 10 倍稀释 BQCV 模板的 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果，1~8: 86 ng、8.6 ng、0.86 ng、86 pg、8.6 pg、0.86 pg、86 fg、8.6 fg；B：以 10 倍稀释 BQCV 模板的 LAMP 琼脂糖电泳结果，1~8: 86 ng、8.6 ng、0.86 ng、86 pg、8.6 pg、0.86 pg、86 fg、8.6 fg。

M：DNA marker; A: Agarose gel electrophoresis of PCR products using 10-fold dilution BQCV, 1-8: 86 ng, 8.6 ng, 0.86 ng, 86 pg, 8.6 pg, 0.86 pg, 86 fg, 8.6 fg; B: Agarose gel electrophoresis of LAMP products using 10-fold dilution BQCV, 1-8: 86 ng, 8.6 ng, 0.86 ng, 86 pg, 8.6 pg, 0.86 pg, 86 fg, 8.6 fg.

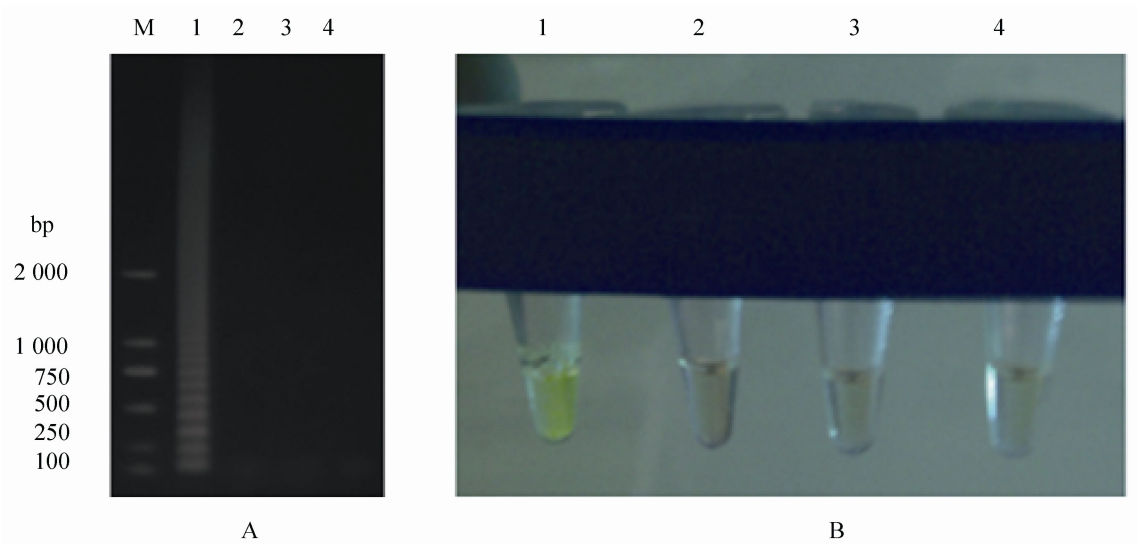

图 5 BQCV LAMP 反应特异性扩增结果
Fig. 5 LAMP specific amplified products of BQCV

M: DNA 分子质量标准；A：BQCV LAMP 反应特异性电泳图，1：BQCV，2：SBV，3：DWV，4：阴性对照；B：可视化观察特异性，1：BQCV，2：SBV，3：DWV，4：阴性对照。

M：DNA marker, A: LAMP specific amplified products of BQCV，1:BQCV, 2:SBV, 3:DWV, 4:Negative control ; B:The visual observation of specific amplified products of BQCV, 1:BQCV, 2:SBV, 3:DWV, 4: Negative control.

表 3 LAMP 和 PCR 对临床样本检测结果比较
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	阳性率 Positive rate
中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*	LAMP	20	5	25%
	PCR		3	15%
意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*	L AMP	20	15	75%
	PCR		11	55%

2.6 临床样品的检测

对疑似感染 BQCV 的中华蜜蜂和意大利蜂群各抽取 20 份样品同时用 LAMP 和 PCR 检测。LAMP 检测中华蜜蜂和意大利蜜蜂阳性数量分别为 5 和 15，阳性检测率分别为 25%和 75%；PCR 检测中华蜜蜂和意大利蜜蜂阳性数量分别为 3 和 11，阳性检测率分别为 15%和 55%（表 3）。可见无论意大利蜜蜂还是中华蜜蜂 LAMP 阳性检测率均明显高于 PCR 检出率，与敏感性试验结果一致。

3 讨论

目前应用检测 BQCV 技术主要有免疫学方法（免疫扩散法、ELISA、免疫印迹法）及 PCR 方法。免疫学方法存在特异性和敏感性低、操作复杂时间长、有效的抗血清难以寻找等弊端。随着 PCR 技术发展，针对 BQCV 的 PCR 技术也已经建立，但在生产实践中，PCR 需要 PCR 仪、电泳仪、成像系统和较长的时间，仍然不够快捷和简便。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 1 h 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，如兔出血病症病毒（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。本试验经过多次重复性验证试验发现优化后的 LAMP 体系对 SBV、DWV 的检测均为阴性，表明所建立的 BQCV LAMP 体系特异性强；而且 BQCV 用 LAMP 方法检测灵敏度比 BQCV 用 PCR 灵敏度高出 100 倍，可用于 BQCV 的临床早期诊断。建立的 BQCV LAMP 可视化反应体系，只需要在水浴锅中反应 50 min 即可完成检测，可望应用于一线的养蜂生产。

黑蜂王台病在西方蜜蜂上被广泛发现并研究，而中华蜜蜂关于 BQCV 的发现还未见报道。本试验用已经建立的 LAMP 体系在中华蜜蜂体内也检测出了 BQCV，证明了在中华蜜蜂中同样可被 BQCV 侵染。这与韩国的东方蜜蜂 *Apis cerana* 检出黑蜂王台病毒的结果一致（Jin *et al.*，2013），说明东方蜜蜂可以被 BQCV 侵染，其危害和防治等方面的工作理应在未来的研究和应用中予以关注。

总之，本研究建立的 LAMP 方法和可视化 LAMP 方法具有操作简便、快速、灵敏度高等特点，可用于快速准确诊断黑蜂王台病毒，尤其对病毒侵染初期病毒滴度较低时，为蜜蜂黑蜂王台病诊断、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, 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 77(3) : 141–162.

Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM, 2008. Rapid detection of HIV-1 by reverse- transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virological Mthods*, 151(2): 264–270.

Dinh DT, Le MT, Vuong CD, Hasebe F, Morita K, 2011. An updated loop—mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of H5N1 avian influenza viruses. *Trop. Med. Health*, 39(1): 3–7.

Ellis JD, Munn PA, 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86(4): 88–101.

Mongi B, Neil L, Mike A, Sean D, 2002. Development of infectious transcripts and genome manipulation of Black queen-cell virus of honey bees. *Journal of General Virology*, 83(12): 3139–3146.

Jin HN, Kondreddy ER, Se EC, Mi SY, Huong TT, Doan, Chang HK, Mummadireddy R, Byoung-Su Y, Lien TKN, Thuy TDN, Dong VQ, Suk-Chan J, Ki-Yoon C, Seung WK, 2013. Phylogenetic analysis of black queen cell virus genotypes in South Korea. *Virus Genes*, 46(1): 362–368.

Neil L, Brenda B, Sean D, 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology*, 81(8): 2111–2119.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*., 28(12): 63–65.

Notomi T, Nippon R, 2007. Loop-mediated isothermal amplification. *Japanese Journal of Clinical Medicine*, 65(5): 957–961.

Ribiere M, Ball BV, Aubert M, 2008. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses // Aubert M, Ball BV, Fries I, Morritz RFA, Milani N, Bernardinelli I (eds) .Virology, and the Honey Bee. European Communities, Luxembourg. 15–84.

Wang LX, He L, Fang R, Song QQ, Tu P, Jenkins A, Zhou YQ, Zhao JL, 2010. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Theileria sergenti infectiontar- getting the p33 gene. *Veterinary Parasitology*, 171(1/2): 159–162.

Yuriko K , Taku T, Tomomi M, Mikio Y, Kiyoshi K, Tatsuhiko K, 2011. Infestation of Japanese native honey bees by tracheal mite and virus from non-native European honey bees in Japan. *Microb. Ecol*., 62(4): 895–906.

梁勤, 陈大福, 2009. 蜜蜂保护学. 第二版. 北京：中国农业出版社. 102 – 103. [Liang Q, Chen DF, 2009. Conservation of honeybee. 2th edition. Beijing: China Agricultural Press. 102-103]

刘永生, 丁耀忠, 张杰, 2010. 环介导等温扩增（LAMP）技术的应用研究. 中国农学通报, 26(8): 87–89. [Liu YS, Ding YZ, Zhang J, 2010. Application and research of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26(8): 87-89.]

唐芬芬, 杨伟克, 邵榆岚, 谢道燕, 廖鹏飞, 杨海, 白兴荣, 2013. 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. 应用昆虫学报, 50(4): 1013–1019. [Tang FF, Yang WK, Shao YL, Xie DY, Liao PF, Yang H, Bai XR, 2013. Prompt diagnosis of the bombyx mori nucleopolyhedrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(4): 1013-1019.]

原冬伟, 刘家森, 郭东春, 姜骞, 林欢, 司昌德, 曲连东, 2013. 环介导等温扩增技术兔出血症病毒检测中的应用. 中国兽医科学, 43(04): 390–395. [Yuan DW, Liu JS, Guo DC, Jiang Q, Lin H, Si CD, Qu LD, 2013. Application of a loop-mediated isothermal amplification method in detection of RHDV. *Veterinary Science in China*, 43(04): 390-395.]

张炫, 陈彦平, 和绍禹, 2012. 蜜蜂病毒学研究进展. 应用昆虫学报, 49(5): 1100 – 1101. [Zhang X, Chen YP, He SY, 2012. A review of bee virology progress. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1100-1101.]