0254-6124/2023/43(2)-0302-08 *Chin. J. Space Sci.* 空间科学学报

HAN Pei, HOU Hongqu, FAN Yunlong, WANG Wenjia, LÜ Xuefei, ZHANG Wei, LI Xiaoqiong. Space Microbial Detection Method Based on Fluorescent LAMP (in Chinese). *Chinese Journal of Space Science*, 2023, **43**(2): 302–309. DOI:10.11728/cjss2023.02.211125124

LAMP 耦合荧光侧向流层析试纸条的空间微生物快速检测技术*

韩 培[1] 侯红渠[2] 樊云龙[2] 王文甲[2]
吕雪飞[2] 张 伟[1] 李晓琼[2]

1(中国科学院空间应用工程与技术中心 北京 100094)

2(北京理工大学生命学院 北京 100081)

摘 要 微生物种类及其含量监测是空间站内微生物控制的重要环节。但是空间环境的微重力条件及对资源的条件限制导致地面常规检测实验难以开展，因此在轨微生物检测主要依靠培养法。基于侧流层析试纸条的生物分子识别检测方法具有不受微重力环境影响的优点，耦合荧光检测方法可以达到较高的检测灵敏度，是在轨微生物检测的潜在方法之一。针对空间环境中对航天员生活环境及仪器仪表设备具有潜在危害的微生物，研究了一种基于环介导等温扩增（LAMP）耦合荧光侧流层析试纸条的微生物核酸鉴别技术。研究结果表明，该技术可实现对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等空间站常见有害微生物的高灵敏、高特异性、快速检测，检测时间小于 60 min，灵敏度达到 100 copy·μL^{-1}。

关键词 空间微生物，侧流层析试纸条，环介导等温扩增

中图分类号 V524

Space Microbial Detection Method Based on Fluorescent LAMP

HAN Pei[1] HOU Hongqu[2] FAN Yunlong[2] WANG Wenjia[2]
LÜ Xuefei[2] ZHANG Wei[1] LI Xiaoqiong[2]

1(*Center for Space Science and Applied Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100094)

2(*School of Life, Beijing Institute of Technology, Beijing* 100081)

Abstract Relevant studies on the International Space Station have shown that during the long-term

* 中国科学院空间应用工程与技术中心所长基金课题项目（Y903191）和国防科技战略先导计划项目（20-ZLXD-21-03-02-002-03）共同资助

2021-11-24 收到原稿，2022-10-11 收到修定稿

E-mail：hp@csu.ac.cn

©The Author(s) 2023. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

operation of the space station, the existence of microorganisms may pose a threat to the long-term operation of the space station and stay of astronauts. Microbial species and content monitoring are important parts of microbial control in the station. Due to resource constraints such as volume and power consumption in space applications, detection methods based on lateral flow chromatography test strips and supporting handheld devices will be more suitable for daily monitoring of space microorganisms, combined with loop-mediated isothermal amplification and up-conversion luminescence characteristic spectra. Nucleic acid identification technology can meet the needs of rapid, sensitive and specific identification of microorganisms. In this research, aiming at the potential harmful microorganisms in the space for the living environment of astronauts and instrumentation equipment, the nucleic acid identification technology based on fluorescent LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) of the lateral flow chromatography test strip was developed. Research results showed that this technology can achieve high sensitivity, high specificity and rapid detection of common harmful microorganisms on the space station such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The detection time is less than 60 minutes and the sensitivity can reach 100 copy·μL^{-1}.

Key words　Space microorganism, Lateral flow chromatography test strip, Loop-mediated isothermal amplification

0　引言

在利用各类载人航天器探索空间的过程中，微生物也伴随在航天器内生存繁衍。根据已有的研究报道，在和平号空间站(Mir)[1]、天空实验室(Skylab)[2]、国际空间站(ISS)[3]等载人航天器内共检测出超过两百种微生物，包括细菌、真菌，并且部分具有致病性及生物腐蚀性[4]。这些航天器内存在的微生物具有巨大的潜在风险，其滋生不但会污染空气、食物和水，对航天员健康造成威胁，而且对于航天器常用的金属或聚合物材料有一定的腐蚀性，可导致技术故障，影响航天器的正常工作[5, 6]。随着中国空间站投入运营，长期空间探索计划不断推进，航天员在空间驻留时间逐渐延长，空间环境下微生物防控的重要性也不断提升，发展便捷、快速的空间微生物检测技术并进行及时防控是保障载人航天生物安全的重要环节，具有极高的现实意义。

传统的微生物培养方法是首次载人航天飞行以来一直采用的微生物监测手段，截至目前仍有效，其主要通过观察微生物生长的基本形态与特殊结构进行分析鉴定[7]。该方法操作简单、稳定可靠，但是存在检测时间长、可检测种类有限、存在二次污染风险等问题。目前随着地面核酸检测技术的成熟，基于核酸的微生物检测方法成为空间微生物检测技术的新主流，例如基因扩增技术与基因测序技术[8]。其中，基因扩增技术包括传统的 PCR 以及日渐成熟的环介导等温扩增(LAMP)[9]、实时荧光定量核酸扩增(RT-qPCR)[10]等检测技术。2015 年国际空间站搭载的空间环境下基因定量分析的实验系统 WetLab-2 即利用了 RT-qPCR 原理，该系统在轨测试时预加载三种不同浓度的大肠杆菌基因组模板，得到与地面控制组无显著性差异的结果，为国际空间站上的快速医学诊断和生物环境监测提供了新的可能[11]。基因测序技术的空间应用代表主要是以第三代测序技术为基础的分子纳米孔测序仪 MinION，该设备已在国际空间站开展相关验证实验，实现对分离培养的三种细菌菌落的鉴定[12]。

与传统微生物培养方法相比，基因扩增或基因测序技术在灵敏度、检测时间等方面有了显著提高，但实验过程的操作专业性要求较高，实验流程也相对复杂，目前仅限于空间科学试验的探索应用。针对空间微生物的定期监测需求，基于荧光 LAMP 的侧流层析试纸条的检测技术不但能够实现微生物的高灵敏度检测，而且具有低成本、易存储、易操作等适于空间应用的优势。

荧光微球(Fluorescent Microspheres, FM)是一

类由荧光材料染色的聚苯乙烯材料，粒径范围为0.1～10 μm，由于其具有较宽的激发光谱，良好的光稳定性以及较窄且对称的发射光谱，可实现极高的信噪比检测，被广泛应用于生物标志物的荧光标记和成像。

等温扩增作为一种聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction，PCR)替代技术，已成为核酸检测的一种有效方法[13]。与有热循环参与的常规 PCR 相比，核酸的等温扩增在恒定温度下进行，在实现高分析灵敏度的同时降低了分析成本。目前常选取的等温扩增方式有等温指数扩增反应(Exponential Amplification Reaction，EXPAR)[14]、滚环扩增(Rolling Circle Amplification，RCA)[15]、环介导等温扩增(Loop-mediated Isothermal Amplification，LAMP)[16]、杂交链式反应(Hybridization Chain Reaction，HCR)[17]、链置换扩增(Strand Displacement Amplification，SDA)[18]等。其中，LAMP 具有时间短、快速简单的特点。与 PCR 相比，LAMP 具有更强的鲁棒性以及与比色等检测方法的高兼容性，被用于检测各种靶标，包括结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis*[19]，SARS-COV-2 等[20,21]。

侧向层析法(Lateral Flow Assay，LFA)属于典型的 POCT 检测技术，是待检测液体样本流经预置敏感干物质材料的条带后呈现一定光学反馈的检测方法[22,23]，可用于检测包括蛋白质、核酸及其他生物化合物在内的大部分生物标志物，具有精确灵敏、所需样品量少、成本低廉、可长期保存等优点[24]，常被用于资源贫乏或非实验室环境的定性或半定量检测。LFA 的生物识别元件通常基于 ELISA 经典的夹心法、竞争法，或者抗体抗原结合捕获目标物等原理。其信号换能元件可依赖比色标签、发光标签、表面增强拉满散射标签、磁性标签、电化学标签、酶或纳米酶介导标签以及热学检测标签等。因此，利用 LAMP 结合 LFA 的检测方法，可实现针对核酸样品的高灵敏度检测[25–27]。

长期在轨微生物定期检测是保障载人航天器内人员健康及设备安全的重要环节。体积小巧、操作简便的检测方法能够有效减少载人航天器的资源消耗，降低航天员在空间环境下的任务负担。针对这一需求，研发了基于荧光 LAMP 的侧流层析试纸条检测方法，对其进行优化表征，研制了配套的小型化光学检测模块，以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌两类常见微生物为目标进行检测，评估了该方法用于在轨微生物定期检测的有效性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Bst 3.0 DNA 聚合酶、10 x Thermopol reaction buffer，dNTP 混合液、$MgSO_4$ 均购自 NEB 公司，EvaGreen Dye（20 x）购自 Biotium 公司，吐温 20(Tween-20)及曲拉通 X-100(Triton X-100)购自美国 Amresco 公司，链霉亲和素(SA)购自索莱宝公司，羧基功能型荧光微球(Fluorescent Microspheres，F1-XC 010)购自美国 Merck Millipore 公司，2-(*N*-吗啉)乙磺酸一水合物(MES)、*N*-羟基硫代琥珀酰亚胺(suLfo-NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸(EDC)购自生工生物工程(上海)股份有限公司，其余试剂及原料均为分析纯级，采用无核酸酶水配制。

划膜喷金仪购自上海捷宁公司，荧光定量 qPCR 仪购自西安天隆科技有限公司，凝胶成像系统购自美国 Biorad 公司，等温扩增 PCR 仪购自德国 Biometra 公司。

1.2 特异性基因的选择与引物设计

选取大肠杆菌麦芽糖操纵子保守区 malB 基因及金黄色葡萄球菌耐热核酸酶 nuc 基因作为特异性基因，利用基因组 DNA 提取试剂盒(天根)提取大肠杆菌和金黄色葡萄球菌基因组，针对 malB 基因及 nuc 基因设计引物并扩增，得到特异性目的基因 malB 及 nuc 基因模板。引物设计使用 LAMP 在线设计软件 Primer-Explore V5 并由上海生工合成，根据 LAMP 引物设计筛选原则及目的片段保守区域筛选出如下特异性引物，并在内引物 FIP/BIP 两端分别修饰 Dig 和 Biotin 应用于下游试纸条检测。

nuc 基因引物序列如下。

F3 CGATTGATGGTGATACGGTTA

B3 CAGTTCTTTGACCTTTGTCA

Dig-FIP GCTTTGTTTCAGGTGTATCAACCAAATTAATGTACAAAGGTCAACCAATG

Biotin-BIP AAGGTGTAGAGAAATATGGTCCTGATCGACTTCAATTTTCTTTGCA

malB 基因引物序列如下。

F3　GCCATCTCCTGATGACGC

B3　ATTTACCGCAGCCAGACG

Dig-FIP　CGCCATGCCCTTCTCCCTTTCAGCCCATCATGAATGTTGC

Biotin-BIP　GTAACGAAAGCCTGGGGCGAACACCACGAATTCACCTTCA

1.3　LAMP 体系及反应条件的优化

LAMP 反应体系采用 Bst 3.0 DNA 聚合酶 8 U, 10 x Thermopol reaction buffer 2.5 μL, dNTP 混合液 1.4 mmol, $MgSO_4$ 6 mmol, EvaGreen Dye 1.25 μL, FIP/BIP 1.6 μmol, F3/B3 0.2 μmol,, DNA 模板 1 μL, 灭菌无核酸酶水定容至 25 μL。采用荧光定量 qPCR 进行荧光曲线测定, 设置恒温 65℃ 持续 60 min, 检测间隔 1 min, 针对反应时间进行优化。以大肠杆菌 malB 序列为模板, 选取不同梯度浓度的 dNTPs 和 Mg^{2+}, 改变反应时间和温度进行 LAMP 反应。实验结果通过电泳及荧光定量 PCR 分析, 以确定最佳反应条件。

1.4　FMs-SA 偶联物的制备及表征

FMs-SA 偶联过程采用基于 EDC 和 NHS 的两步共价偶联步骤进行, 取 50 μL FMs 溶液 (2 mg·mL^{-1}) 以及 450 μL MES 缓冲液振荡混匀, 以 12000 r·min^{-1} 转速离心 15 min, 弃上清再加入 500 μL MES 缓冲液, 重悬, 重复两次完成洗涤步骤。取 19.2 mg EDC 及 21.7 mg Sulfo-NHS 加入 2 mL 超纯水, 混匀, 并取 12 μL 混合液加入 FMs 溶液, 旋转孵育 20 min 完成 FMs 表面修饰羧基的活化。

取 16 μL 浓度为 1 mg·mL^{-1} 的链霉亲和素 (SA) 加入 FMs 溶液, 旋转孵育 3 h, 以 12000 r·min^{-1} 转速离心 15 min 后加入 500 μL Tris-HCl 封闭液过夜避光孵育, 封闭 FMs 颗粒表面多余反应位点, 并利用添加蔗糖 (5%, w/v) 的 Tris-HCl 溶液重悬, 完成 FMs-SA 偶联物的制备。选用荧光光谱及吸收光谱对 FMs-SA 偶联物进行测定并表征。

1.5　侧流层析试纸条的制备

利用喷金划膜仪将 FMs-SA 偶联物预置于试纸条结合垫上, 分别将地高辛抗体 (Anti-Dig) 及牛血清白蛋白 (BSA) 固定的生物素 (Biotin) 作为试纸条的检测线和质控线, 置于室温晾干备用。

结合垫上的 FMs-SA 与目标基因扩增产物在溶液中特异性结合形成复合物, 并在侧向流层析的作用下移动, 被固定在检测线处的 Anti-Dig 特异性结合并捕获。没有与目标扩增产物结合的 FMs-SA 被固定在质控线上的 Biotin 捕获。通过激发荧光可检测质控线和检测线处的荧光强度, 实现对目标基因的半定量检测。

1.6　试纸条反应条件的优化及检测限

上样缓冲液种类及体积、FMs-SA 偶联物比例及上样体积等是影响侧向层析试纸条检测的重要因素。针对样品垫预处理液中荧光微球–抗体偶联物上样体积 (5, 10, 15, 20 μL), Tris-HCl (0.5% Tween-20), PBST (0.5% Tween-20), 1 × SSC (0.5% Tween-20), 5 × SSC (0.5% Tween-20), 10 × SSC (0.5% Tween-20) 5 种不同的上样缓冲液种类, 试纸条反应检测时间 (1～45 min), 以及不同的 FMs-SA 偶联物比例 (2, 4, 8, 16, 32 mg·g^{-1}) 和体积进行优化实验。

以稀释后的大肠杆菌 malB 基因和金黄色葡萄球菌 nuc 基因 (浓度为 1 × 10^0, 1 × 10^1, 1 × 10^2, 1 × 10^3, 1 × 10^4, 1 × 10^5, 1 × 10^6 copy·μL^{-1}) 为模板, 取 1 μL 进行 LAMP 扩增, 研究该两种微生物的检测限。设定检测激发波长为 470 nm, 发射波长为 532 nm。每组实验重复三次以消除偏差。

2　结果

2.1　LAMP 反应条件

扩增体系方面, 选择 0.8～1.6 mmol 的 dNTPs 进行扩增, dNTPs 浓度为 1.4 mM 时扩增效果最佳; 选择 4～10 mmol 的 Mg^{2+} 进行扩增, Mg^{2+} 浓度为 6 mMol 时扩增效果最佳。反应温度方面, 当反应温度为 65℃ 时扩增效果最佳, 且由荧光定量 PCR 仪扩增 nuc 和 malB 的荧光曲线确定最佳扩增时间为 20 min。

最终确定 LAMP 等温扩增的最佳反应条件为: Bst 3.0 DNA 聚合酶 1 μL, 10 x Thermopol reaction buffer 2.5 μL, dNTPs 1.4 mmol, $MgSO_4$ 6 mmol, FIP/BIP 1.6 μmol, F3/B3 0.2 μmol, DNA 模板 1 μL, 无核酸酶水定容至 25 μL, 65℃ 扩增 20 min 后进行试纸条上样检测。优化过程扩增曲线如图 1 所示。

2.2　试纸条反应条件及检测限

优化 FMs-SA 二者偶联时的比例是偶联效率的重要因素, 在以不同比例 FMs-SA 偶联成功后, 针对

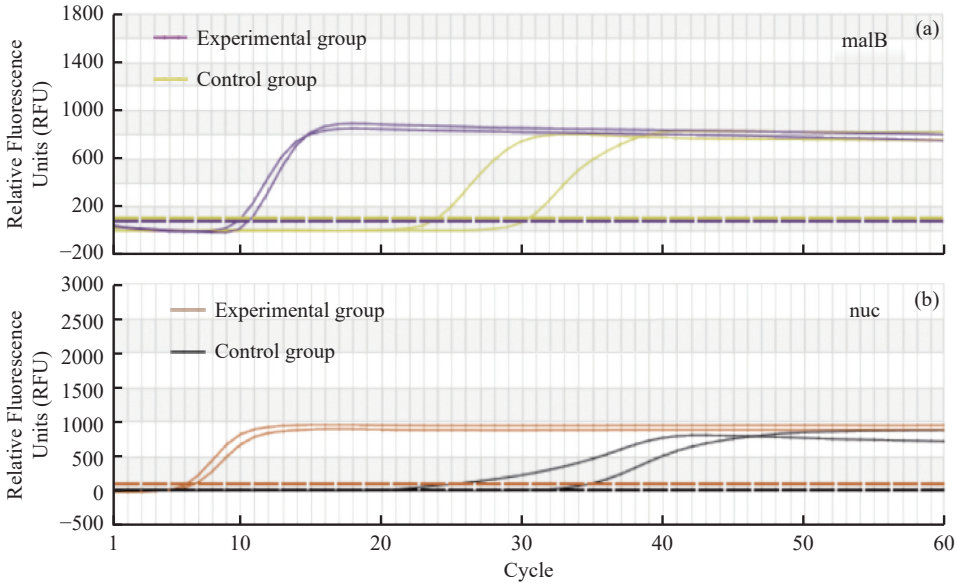

图 1 malB 及 nuc 基因的 LAMP 扩增荧光曲线

Fig. 1 LAMP amplification fluorescence curves of malB and nuc genes

同一批次试纸条以相同扩增反应物进行检测，并且在 32 mg·g^{-1} 的偶联比例时达到最大响应，原因是被偶联在荧光材料表面的包被链霉亲和素会使偶联物捕获扩增产物的概率增加，使得 T 线上富集捕获的复合物增加，由于 FMs 表面羧基位点有限，过多的 SA 无法进一步偶联在表面，偶联效率逐渐恒定，因此确定最佳偶联比例为 32 mg·g^{-1}。

通过对试纸条上样缓冲液种类及体积、上样反应时间及 FMs-SA 偶联物体积的优化，确定最佳反应条件，选用 5×SSC(0.5% Tween-20)85 μL 作为上样缓冲液，FMs-SA 偶联物上样体积 15 μL，结合 10 μL LAMP 扩增后产物进行侧向层析反应 15 min，扩增曲线如图 2(a)所示。

将已知拷贝数的 malB 基因进行 10 倍系列稀释，使用所建立的 LAMP 方法进行荧光定量 PCR 及琼脂糖凝胶电泳表征，并取 10 μL 扩增后反应物进行试纸条上样，结果如图 2(b)所示，在 20 min 时 100 copy·μL^{-1} 的样本扩增产物可检测，10 copy·μL^{-1} 的样本有可检出概率，并且试纸条上样 15 min 后荧光检测结果与电泳结果一致，如图 2(c)所示，因此确定 LAMP-LFA 检测大肠杆菌的检测限约为 10～100 copy·μL^{-1}。

2.3 荧光检测模块设计及评价

为提高系统灵敏度，光学检测系统采用共聚焦式光路结构。荧光的发射光强度与光源光强直接相关，但是过强的光源强度会使荧光物质发生光漂白，导致荧光猝灭，因此激发光源采用 470 nm 的光电二极管。共焦结构中的二色镜采用截止频率为 505 nm 的二向色镜。光源从激光器出射，经反射镜调整角度，从二向色镜穿过，通过汇聚透镜聚焦在检测条带上，激发出 532 nm 荧光。532 nm 荧光从汇聚透镜聚焦后在长通二色镜处反射，通过 532 nm 滤色镜滤除杂散光后，再次由汇聚透镜聚焦至光电传感器进行数据读取。其光学原理如图 3 所示。

光学系统采用镜笼套筒结构搭建，二向色镜及反射镜采用 1/2 英寸镜笼装配，滤色镜、汇聚透镜装配在 1/2 英寸套筒结构中，利用卡环固定，光电传感器通过转接件固定在套筒结构上。光学结构整体外包络尺寸小于 7 cm×7 cm×3 cm。荧光检测光学结构实物如图 4 所示。

采用 FMs 溶液作为标准溶液，对荧光检测光学系统进行线性度测试，配置浓度梯度为 0.1 × 10^3，0.2 × 10^3，0.4 × 10^3，0.8 × 10^3，1.0 × 10^3 μg·mL^{-1} 溶液，放置在检测区域，通过测试传感器测得电压值，如图 5 所示。

采用 10^6 copy·μL^{-1} 大肠杆菌样本进行 LAMP 扩增，将扩增后的样本在构建好的试纸条上样。上样结束后放置在荧光检测系统检测窗口处，匀速移动试纸

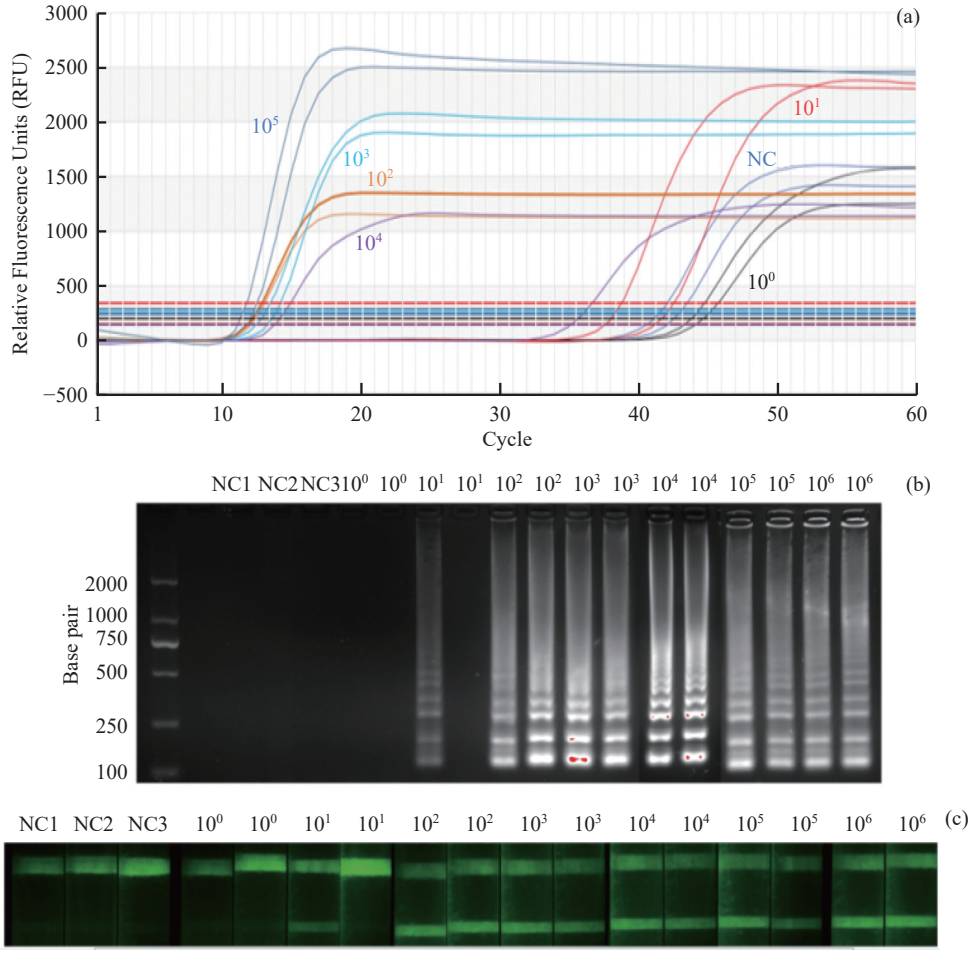

图 2　偶联后不同浓度样品 LAMP 扩增曲线（a）；偶联后不同浓度样品 LAMP 扩增产物凝胶电泳成像（b）；偶联后不同浓度样品 LAMP 扩增产物试纸条上样，采用 470 nm 波段激发后荧光成像结果（c）

Fig. 2　LAMP amplification curves of samples with different concentrations after coupling (a); Gel electrophoresis imaging of LAMP amplification products of samples with different concentrations after coupling (b); Test strip loading of LAMP amplification products of samples with different concentrations after coupling, fluorescence imaging results after excitation at 470 nm (c)

条使窗口扫过整个试纸条，对采集信号进行曲线绘制，如图 6 所示。

3　讨论与结论

研究设计并构建了一种基于荧光 LAMP 的侧流层析试纸条空间微生物检测方法，以大肠杆菌及金黄色葡萄球菌作为检测目标，初步构建并优化了 LAMP 扩增体系及扩增参数，对 FMs-SA 偶联物进行制备及表征，对侧流层析试纸条的制备工艺进行探索，优化了试纸条反应条件并研究了该方法的检测限；以小型化为目标，设计了可配套检测试纸条的小型化光学检测模块，对其线性度进行评估并对试纸条进行初步的扫描读取测试。目前从获取样本后进行 LAMP 扩增至试纸条上样检测整个过程时间小于 60 min，对大肠杆菌检测限可达 100 copy·μL^{-1}，配套研制的小型化光学检测模块外包络尺寸小于 7 cm×7 cm×3 cm，线性拟合优度 R^2>0.99。

相比传统培养检测方式，LAMP 耦合荧光侧向流层析试纸条方法具有操作简单、检测速度快、灵敏度高、成本低等优势。并且与聚合酶链式反应（PCR）、基因测序等方式相比，其所需条件简单（60℃ 左右恒温即可），配套设备在功耗、体积、复杂度等方面具有显著优势，例如不用提供高功耗的快速升降温变温平台，也不用进行复杂的流体控制，因而更符合载人航

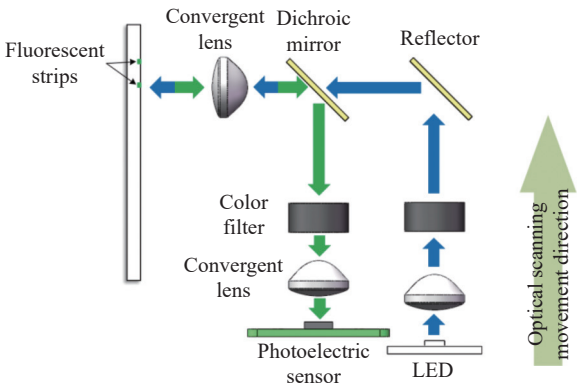

图 3 荧光检测光学原理

Fig. 3 Principle of fluorescence detection

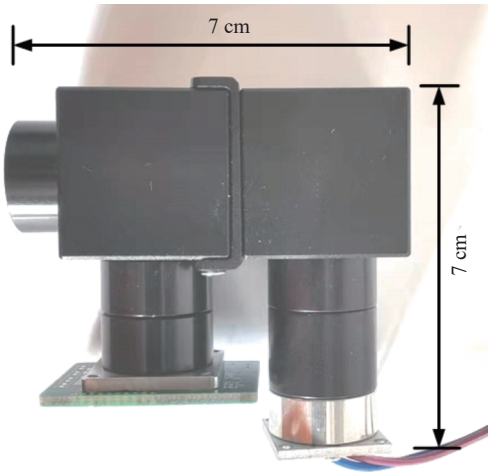

图 4 荧光检测光学结构

Fig. 4 Fluorescence detector optical structure

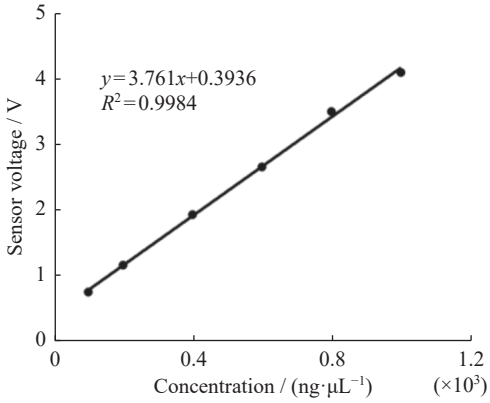

图 5 荧光检测光学线性曲线

Fig. 5 Fluorescence linear curve for fluorescence detector

天器对功耗、体积的严格约束要求。对于所需荧光光学检测模块，也提供了对应的小型化设计方式，并完成搭建及验证。

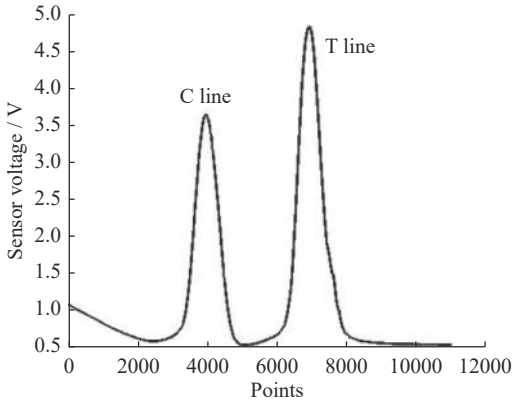

图 6 荧光检测光学试纸条扫描曲线

Fig. 6 Fluorescence curve of test strip scanned by fluorescence detector

更进一步，在检测过程中，LAMP 耦合荧光侧向流层析试纸条方法所需恒温、上样等过程可通过与微流控芯片设计相结合，制成简单易用的一体化耗材，与小型化外设配套，形成“样本进、结果出”的一体化系统。小型化外设在荧光光学检测模块占用体积较小的情况下，具备手持式应用的设计潜力。综上可知，基于荧光 LAMP 的侧流层析试纸条空间微生物检测方法具有良好的空间站应用前景，有望制造简单易用、快捷准确的小型化设备，成为载人航天器微生物检测的有力工具。

参考文献

[1] KAWAMURA Y, LI Y, LIU H, *et al*. Bacterial population in russian space station “Mir” [J]. *Microbiology and Immunology*, 2001, **45**(12): 819-828

[2] BROCKETT R M, FERGUSON J K, HENNEY M R. Prevalence of fungi during Skylab missions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, **36**(2): 243-246

[3] SIELAFF A C, URBANIAK C, MOHAN G B M, *et al*. Characterization of the total and viable bacterial and fungal communities associated with the International Space Station surfaces[J]. *Microbiome*, 2019, **7**(1): 50

[4] ZOU Shiwen, XIAO Kui, DONG Chaofang, *et al*. Corrosion behavior and control methods of microbiologically influenced corrosion of Space Station Environmental Control and Life Support System[J]. *Science & Technology Review*, 2013, **31**(30): 61-66 (邹士文, 肖葵, 董超芳, 等. 空间站环境控制与生命保障系统微生物腐蚀行为与控制方法[J]. 科技导报, 2013, **31**(30): 61-66)

[5] BAI Ziheng, XIAO Kui, YAN Lidan. Recently development of microbial corrosion of space station[J]. *Materials*

China, 2018, **37**(1): 9-13 (白子恒, 肖葵, 颜利丹. 空间站微生物腐蚀研究进展[J]. 中国材料进展, 2018, **37**(1): 9-13)

[6] TANG Guangze, BAI Yu, MA Xinxin. Application of TiO_2 photocatalytic materials in the future space field[C]//Forum on Space Environment and Material Science. Beijing: Editorial Department of Spacecraft Environmental Engineering, 2009: 178-181 (唐光泽, 白羽, 马欣新. TiO_2光催化材料在未来空间领域的应用[C]//2009年空间环境与材料科学论坛论文集. 北京: 航天器环境工程编辑部, 2009: 178-181)

[7] YAMAGUCHI N, ROBERTS M, CASTRO S, *et al*. Microbial monitoring of crewed habitats in space—Current status and future perspectives[J]. *Microbes and Environments*, 2014, **29**(3): 250-260

[8] KAROUIA F, PEYVAN K, POHORILLE A. Toward biotechnology in space: high-throughput instruments for *in situ* biological research beyond Earth[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, **35**(7): 905-932

[9] ABAIBOU H, LASSEUR C, MABILAT C, *et al*. Current progresses of midass: microbial detection in air system for space[C]//40 th COSPAR Scientific Assembly. Moscow, Russia, 2014

[10] ADAMSKI M G, GUMANN P, BAIRD A E. A method for quantitative analysis of standard and high-throughput qPCR expression data based on input sample quantity[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e103917

[11] PARRA M, JUNG J, ALMEIDA E, *et al*. On-orbit quantitative real-time gene expression analysis using the Wetlab-2 system[C]//Annual Meeting of the American Society for Gravitational and Space Research. Alexandria, 2015

[12] BURTON A S, STAHL S E, JOHN K K, *et al*. Off earth identification of bacterial populations using 16 S rDNA nanopore sequencing[J]. *Genes*, 2020, **11**(1): 76

[13] SUN J D, SUN X L. Recent advances in the construction of DNA nanostructure with signal amplification and ratiometric response for miRNA sensing and imaging[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, **127**: 115900

[14] JIA H X, LI Z P, LIU C H, *et al*. Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, **49**(32): 5498-5501

[15] ZHANG L R, ZHU G C, ZHANG C Y. Homogeneous and label-free detection of microRNAs using bifunctional strand displacement amplification-mediated hyperbranched rolling circle amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, **86**(13): 6703-6709

[16] MORI Y, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2009, **15**(2): 62-69

[17] GE Z L, LIN M H, WANG P, *et al*. Hybridization chain reaction amplification of microRNA detection with a tetrahedral DNA nanostructure-based electrochemical biosensor[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, **86**(4): 2124-2130

[18] DONG H F, ZHANG J, JU H X, *et al*. Highly sensitive multiple microRNA detection based on fluorescence quenching of graphene oxide and isothermal strand-displacement polymerase reaction[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, **84**(10): 4587-4593

[19] YEE E H, SIKES H D. Polymerization-based amplification for target-specific colorimetric detection of amplified *Mycobacterium tuberculosis* DNA on cellulose[J]. *ACS Sensors*, 2020, **5**(2): 308-312

[20] YANG W , DANG X , WANG Q , *et al*. Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse transcription RT-LAMP method. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2020

[21] LAMB L E, BARTOLONE S N, WARD E, *et al*. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification[J]. *PLoS One*, 2020, **15**(6): e0234682

[22] HAGREN V, CONNOLLY L, ELLIOTT C T, *et al*. Rapid screening method for halofuginone residues in poultry eggs and liver using time-resolved fluorometry combined with the all-in-one dry chemistry assay concept[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, **529**(1/2): 21-25

[23] LI Z, CHEN H, WANG P. Lateral flow assay ruler for quantitative and rapid point-of-care testing[J]. *Analyst*, 2019, **144**(10): 3314-3322

[24] POSTHUMA-TRUMPIE G A, KORF J, VAN AMERONGEN A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, **393**(2): 569-582

[25] VARONA M, EITZMANN D R, ANDERSON J L. Sequence-specific detection of ORF1 a, BRAF, and ompW DNA sequences with loop mediated isothermal amplification on lateral flow immunoassay strips enabled by molecular beacons[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, **93**(9): 4149-4153

[26] JAWLA J, KUMAR R R, MENDIRATTA S K, *et al*. Paper-based Loop-mediated isothermal Amplification and Lateral Flow (LAMP-LF) assay for identification of tissues of cattle origin[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, **1150**: 338220

[27] DU Y, POTHUKUCHY A, GOLLIHAR J D, *et al*. Coupling sensitive nucleic acid amplification with commercial pregnancy test strips[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, **56**(4): 992-996