

重组酶聚合酶扩增技术结合侧向流动试纸条快速检测锦鲤疱疹病毒

楚馨 冯梓钊 姜有声 王浩 吕利群 许丹

RAPID VISUAL DETECTION OF KHV BY RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION (RPA) COMBINED WITH A LATERAL FLOW DIPSTICK (LFD)

CHU Xin, FENG Zi-Zhao, JIANG You-Sheng, WANG Hao, L Li-Qun, XU Dan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0226>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

斑点叉尾病毒实时荧光LAMP检测方法的建立

REAL-TIME FLUORESCENT LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION FOR DETECTION OF CHANNEL CATFISH VIRUS

水生生物学报. 2021, 45(3): 541–546 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.038>

鳗鲡肾脏细胞系的建立及其对鳗鲡疱疹病毒的敏感性

THE ESTABLISHED KIDNEY CELL LINE FROM EUROPEAN EEL *ANGUILLA ANGUILLA* AND ITS SUSCEPTIBILITY TO *ANGUILLID HERPESVIRUS*

水生生物学报. 2020, 44(2): 237–244 <https://doi.org/10.7541/2020.028>

我国北方地区鲤浮肿病毒的流行情况调查与监测分析

EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION AND SURVEILLANCE ANALYSIS OF CARP EDEMA VIRUS SOURCED FROM NORTHERN OF CHINA

水生生物学报. 2018, 42(5): 935–941 <https://doi.org/10.7541/2018.115>

中华鲟Vtg间接竞争ELISA检测方法的建立和应用

ESTABLISHMENT AND APPLICATION OF AN ELISA TECHNIQUE FOR DETECTING CHINESE STURGEON VITELLOGENIN

水生生物学报. 2018, 42(4): 779–785 <https://doi.org/10.7541/2018.095>

兰州鲇精液超低温冷冻保存技术研究及细胞损伤检测

STUDY OF SPERM CRYOPRESERVATION IN *SILURUS LANZHOUENSIS* AND DETECTION OF CELL DAMAGES AFTER CRYOPRESERVATION

水生生物学报. 2021, 45(3): 547–556 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.020>

翘嘴鳊病原嗜水气单胞菌分子特征及LAMP检测方法的建立

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ESTABLISHMENT OF LAMP DETECTION METHOD OF PATHOGENIC *AEROMONAS HYDROPHILA* ISOLATED FROM *SINIPERCA CHUATSI*

水生生物学报. 2017, 41(6): 1225–1231 <https://doi.org/10.7541/2017.152>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2022.0226

重组酶聚合酶扩增技术结合侧向流动试纸条快速检测锦鲤疱疹病毒

楚馨¹ 冯梓钊¹ 姜有声^{1,2,3} 王浩^{1,2,3} 吕利群^{1,2,3} 许丹^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为建立一种快速、灵敏并适用于临床检测III型鲤疱疹病毒(CyHV-3, KHV)的方法, 实验根据KHV SphI-5基因的保守序列片段设计引物及探针, 采用重组酶聚合酶扩增技术结合侧流层析试纸条(RPA-LFD)检测KHV。重组酶聚合酶扩增技术(RPA)具恒温扩增及高灵敏度特点, 简化了设备要求的同时又能做到高效检测病毒, 再结合侧向流动试纸条(LFD)将RPA结果快速地可视化, 提高了该疾病的检测效率。结果表明, 在38℃的最适反应温度下, 采用RPA-AGE技术仅需10min便可检测出病原的目标片段, 结合LFD方法仅需5min便可将RPA结果通过试纸条可视化呈现。研究研发的KHV RPA-LFD检测方法简单、快捷, 可为实验条件有限的养殖场快速诊断需求提供技术支撑。

关键词: 快速检测; 重组酶聚合酶扩增技术; 侧向流动试纸条; 锦鲤疱疹病毒

中图分类号: Q-33; S941.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)06-0866-08



III型鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)又称锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV), 是引起鲤(*Cyprinus carpio*)及锦鲤(*Cyprinus carpio koi*)的疱疹病毒病的病原。III型鲤疱疹病毒与I型鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 1, CyHV-1)、II型鲤疱疹病毒(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)及鳗疱疹病毒(Anguillid herpesvirus 1, AngHV-1)同属于异疱疹病毒科(Alloherpesviridae)、鲤疱疹病毒属(*Cyprinivirus*)^[1]。KHV为具囊膜的二十面体线性双股DNA病毒, 基因组达到295 kb, 相较其同属的其他病毒而言均较大。在基因组中存在164个开放阅读框, 主要包括囊膜蛋白基因、衣壳蛋白基因、DNA聚合酶基因(Sph)、螺旋酶基因和胸苷激酶基因(TK)等^[2]。KHV宿主的特异性较强, 仅感染鲤和锦鲤等变种^[3]。锦鲤疱疹病毒病(Koi herpesvirus disease, KHVD)具有高致病性、高传染性和潜伏感染等特征^[4]。因此给世界多个国家的鲤及锦鲤养殖业造成了严重的经济损失, 阻碍了锦鲤及鲤养殖及出口贸易发展, 世界动物卫生组织(OIE)将

其作为必须申报的疾病, 中国农业部将其列为II类动物疾病^[5]。

鱼类疾病的早期检测是疾病防控的基础, 已经报道的KHV诊断方法主要包括OIE推荐的锦鲤鳍细胞和鲤脑细胞这两种敏感细胞系进行细胞培养分离法、OIE推荐的基于TK基因^[6]和SphI-5基因^[7]的聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR), 由该技术延伸的实时荧光定量PCR、巢式PCR和半巢式PCR、环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、酶联免疫吸附剂实验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等方法^[1], 但都存在着技术难度大、设备要求高和不能检测潜伏感染病毒等缺点。

重组酶聚合酶扩增技术(Recombinase polymerase amplification, RPA)由英国TwistDx生物技术公司发明, 相较于PCR反应, RPA主要利用重组蛋白酶及单链结合蛋白等物质参与反应, 无须高温解链、退火和延伸等步骤也无须昂贵的PCR扩增仪, 仅需恒温条件便可实现扩增。上游引物和下游引

收稿日期: 2022-05-21; 修订日期: 2022-07-25

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项子课题(2019YFD0900101); 上海市自然科学基金面上基金项目(22ZR1427200); 上海海洋大学未来生物技术学院基金资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2019YFD0900101); General Fund Project of Shanghai Natural Science Foundation (22ZR1427200); Open Funding Project of Future Biotechnology College (Shanghai Ocean University)]

作者简介: 楚馨(2000—), 女, 本科; 研究方向为水生动物医学。E-mail: zero0zero0@163.com

通信作者: 许丹, 女, 副教授; 研究方向为水生动物疾病学。E-mail: dxu@shou.edu.cn

物的扩增反应同时进行, 目标扩增子的指数式增长, 仅需不到20min就可以扩增出可供检测的浓度^[8]。重组酶聚合酶扩增测流免疫技术(RPA-LFD)与实时重组酶聚合酶扩增技术(Real-time RPA)是较为常用的RPA衍生技术, RPA结合侧向流动试纸条(Lateral flow dipsticks, LFD), 相较于传统的琼脂糖凝胶电泳技术, 仅需5min就可使结果可视化, 大大缩短了使检测结果可视化时间。近年来RPA技术在水产疾病研究中也有着较多应用, 如对虾白斑病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)^[9]、II型鲤疱疹病毒^[10]和鲤浮肿病毒(Carp oedema virus, CEV)^[11]等。在本实验中, 建立了RPA-LFD快速检测KHV方法, 且该方法需要的设备简单, 操作简便。

1 材料与方法

1.1 病毒与病原样品

传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)基因组DNA、草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)的cDNA、鲤春病毒(Spring viraemia carp virus, SVCV)、大口黑鲈弹状病毒(*Micropterus salmoides* rhabdovirus, MSRV)、II型鲤疱疹病毒由上海海洋大学国家水生动物病原库提供。临床样品共21条, 随机采自上海海洋大学校内景观池、滨海实习基地养殖池及四川成都“跃江源”网店, 数量分别为3条、9条和9条。

1.2 主要试剂和试剂盒

DNA 快速扩增试剂盒(基础型WLB8201KIT)和DNA 恒温快速检测试剂盒(胶体金试纸条型WLN8203KIT)购自中国潍坊安普未来生物科技有限公司; 彩虹型侧向流动试纸条(LFD)购自中国Tiosbio公司; 微量样品基因组DNA提取试剂盒DP316、TIANpure Mini Plasmid Kit II试剂盒和SYBR Green购自TIANGEN生化科技有限公司; 引物和探针由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 RPA引物、探针设计及筛选

本实验选择KHV的SphI-5(AB375381.1)基因序列保守区域作为靶区域, 根据RPA引物设计原则, 应用Prime Premier 6.0软件设计引物并用Oligo 7.0软件对引物初步筛选。设计并合成引物后利用RPA-AGE检测体系筛选出最优引物。探针设计基于合适的目标序列之间的最优上游和下游RPA引物, 上游引物在其序列的5'端加生物素(Biotin)修饰, 下游引物序列不变, 探针则在5'端(30 nt)携带抗原标记物FAM, 通过四氢呋喃碱基位点THF连接3'端,

3'端(15 nt)用聚合酶延伸阻断基团(C3-spacer)修饰。

1.4 RPA反应条件的优化

根据基础型试剂盒说明书, RPA反应体系共50 μ L, 使用RPA-AGE检测体系时将2 μ L上游引物, 2 μ L下游引物, 29.4 μ L A Buffer, 12.1 μ L纯水, 2 μ L DNA混合得到的47.5 μ L溶液, 添加至含重组酶聚合酶的0.2 mL RPA反应管中。混匀后添加2.5 μ L B buffer引发RPA反应, 充分混合后低速离心, 迅速将反应管置于恒温扩增仪反应。反应结束后加入等体积酚氯仿纯化RPA, 最后将以上溶液放入离心机中12000 r/min离心3min, 上清即为获得的RPA产物, 通过1.5%琼脂糖凝胶电泳方法可将其可视化。为了确定RPA反应最佳的扩增温度, 使用T8-ISO恒温扩增仪分别在32 $^{\circ}$ C、32.5 $^{\circ}$ C、33.4 $^{\circ}$ C、35.2 $^{\circ}$ C、37.1 $^{\circ}$ C、38.3 $^{\circ}$ C、39.3 $^{\circ}$ C和40 $^{\circ}$ C下反应40min。为了确定RPA的最佳的反应时间, 在最佳温度下分别反应5min、10min、20min、30min和40min。

1.5 RPA-LFD检测体系

RPA-LFD反应为50 μ L体系, 使用该体系时将2 μ L上游引物, 2 μ L下游引物, 0.6 μ L荧光探针, 29.5 μ L A Buffer, 11.5 μ L纯水, 2 μ L DNA混合后得到的47.5 μ L溶液添加至含重组酶聚合酶的0.2 mL RPA反应管中, 然后每管添加2.5 μ L B buffer以引发RPA反应。充分混合后低速离心, 迅速将反应管置于恒温扩增仪反应。将反应后的RPA产物取5 μ L加入95 μ L的纯水中, 振荡混匀, 最后小心将侧向流动试纸条垂直插入其中, 室温下反应5min, 对反应结果进行可视化。若测试线和控制线同时显色时则说明结果为阳性, 若仅有控制线显色时则说明结果为阴性, 若均不显色则说明试纸条无效。

1.6 特异性试验

本试验选取感染了KHV的样品总DNA、IHNV的DNA、GCRV的cDNA、SVCV和MSRV的cDNA作为模板, 用纯水作为阴性对照。实验在RPA反应最佳的条件下进行, 通过RPA-LFD和RPA-AGE所得到的RPA扩增产物进行分析鉴别, 以确定RPA引物和探针的特异性。

1.7 灵敏度试验

选取感染了KHV的样品总DNA进行梯度稀释(1.0 fg/ μ L—1.0 ng/ μ L), 分别将1.0 fg/ μ L、10 fg/ μ L、100 fg/ μ L、1.0 pg/ μ L、10 pg/ μ L、100 pg/ μ L和1.0 ng/ μ L作为反应模板, 实验在RPA的最佳反应条件下进行。通过RPA-LFD和RPA-AGE方法所得到的RPA扩增产物进行分析鉴别。使用相同的反应模板在OIE推荐的PCR方法的最佳反应条件(94 $^{\circ}$ C预变性30s; 94 $^{\circ}$ C变性30s、63 $^{\circ}$ C退火30s、72 $^{\circ}$ C延伸

表 1 实验所用的引物和探针
Tab. 1 Primers and probes used in the assay

名称 Name	引物序列 Sequence (5'—3')
F1	TCAGAGGGACAATCTCAGCAACACCTACCA
R1	AGTATGTGCTTCTTGAACGACTGCGACTGT
F2	AACAGTCGCAGTCGTTCAAGAAGCACATAC
R2	ACATGTTACAATGGTCGCATCAATGTTGGG
F3	CTCAGAGGGACAATCTCAGCAACACCTAC
R3	CACATGTTACAATGGTCGCATCAATGTTGG
KHV-LFD-CTCAGAGGGACAATCTCAGCAACACCTAC F3	
KHV-LFD-5'Biotin- R3	CACATGTTACAATGGTCGCATCAATGTTGG
KHV-LFD-(FAM)cgcaacagtcgcagtcgttaagaagcacaTA(THF)Tgcg Probe	gtgagacgacgg(C3-spacer)

表 2 OIE推荐的PCR引物序列
Tab. 2 Primers and probes used in the assay

名称 Name	引物序列 Sequence (5'—3')
F	GACACCACATCTGCAAGGAG
R	GACACATGTTACAATGGTCGC

30s, 40次循环; 72℃延伸7min)下进行, 将结果与RPA方法比较, 对3种不同检测方法的结果进行分析。

1.8 RPA-LFD 方法临床实用

选取21条锦鲤及鲤样品, 检测其携带病毒情况, 使用TIANamp Genomic DNA提取试剂盒从组织样品中提取总的基因组DNA, 分别采用常规PCR、RPA-AGE和RPA-LFD方法在最佳反应条件下检测, 从而评估本实验RPA-LFD方法检测KHV的实际应用性。

2 结果

2.1 实验引物的筛选

针对KHV的SphI-5保守序列设计出KHV-F1/R1、KHV-F2/R2和KHV-F3/R3共3对引物(表1), 用RPA-AGE方法将3对引物在38℃反应温度及30min反应时间下, 分别用10 pg/μL和100 pg/μL浓度的KHV总DNA作为模板进行RPA扩增, 使用琼脂糖凝胶对扩增产物电泳从而可视化。电泳结果(图1)显示, 3对引物在100 pg/μL浓度下均扩增出对应大小的KHV目的条带, 第1、第3对引物的均在较低的检测浓度即10 pg/μL下扩增出了相应条带, 但第3对引物条带更清晰明亮, 表明第3对引物(KHV-F3/R3)检测灵敏度更高, 因此本实验将选择该引物作为后续实验的研究。

2.2 反应条件的优化

本实验在30min的扩增过程中评估了30—42℃的温度范围以优化RPA和RPA-LFD的反应温度(图2),

KHV的RPA反应可以在30—42℃的温度范围内均可进行, 扩增子带在37.1—38.3℃的温度范围内最亮, 因此随后的RPA-AGE和RPA-LFD检测均选取38℃作为反应温度。本实验在最佳反应温度条件下测试了5次反应时间(5min、10min、20min、30min和40min; 图3)。KHV的RPA及RPA-LFD反应10min便可出现较明显条带, 当反应持续时间大于10min时, 随着时间增加扩增条带也随之变亮。

2.3 特异性实验

分别使用RPA-AGE及RPA-LFD方法对从上海海洋大学国家水生动物病原库保存的IHNV的

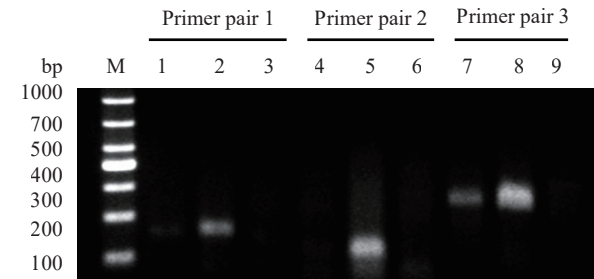


图1 KHV-RPA检测的引物筛选(AGE方法)
Fig. 1 RPA reaction products using different pair primers detected by agrose gel electrophoresis (AGE)
M. DL1000 DNA marker; 1. F1/R1(10 pg/μL); 2. F1/R1(100 pg/μL); 3. F1/R1(阴性对照); 4. F2/R2(10 pg/μL); 5. F2/R2(100 pg/μL); 6. F2/R2(阴性对照); 7. F3/R3(10 pg/μL); 8. F3/R3(100 pg/μL); 9. F3/R3(阴性对照)
M. DL1000 DNA marker; 1. F1/R1(10 pg/μL); 2. F1/R1(100 pg/μL); 3. F1/R1(negative control); 4. F2/R2(10 pg/μL); 5. F2/R2(100 pg/μL); 6. F2/R2(negative control); 7. F3/R3(10 pg/μL); 8. F3/R3(100 pg/μL); 9. F3/R3(negative control)

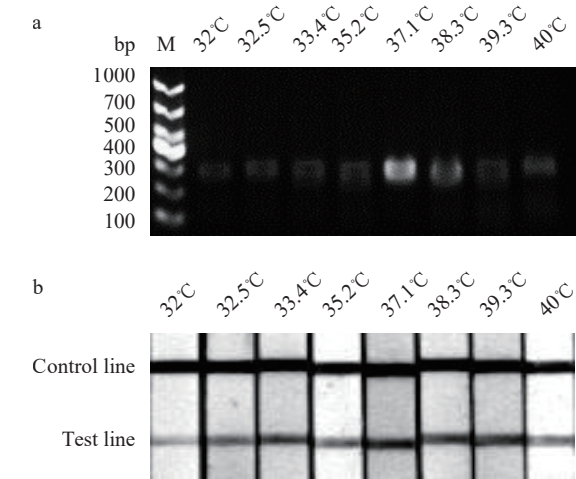


图2 在不同温度条件下扩增反应
Fig. 2 Amplification performance of assays conducted at different temperature
a. 采用AGE方法; b. 采用LFD方法; 下同
a. AGE; b. LFD; the same applies below

DNA、GCRV的cDNA、SVCV和MSRV的cDNA作为模板, 用纯水作为阴性对照以及KHV的基因组DNA进行检测(图4)。仅有KHV的基因组DNA产生了阳性结果, 说明本实验筛选的引物是针对于

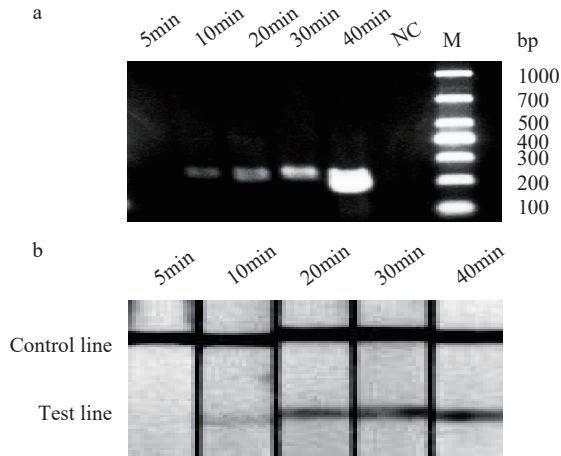


图3 实验在38℃条件下分别反应5min、10min、20min、30min和40min

Fig. 3 Amplification performance of assays conducted at 38℃ for 5min, 10min, 20min, 30min and 40min respectively

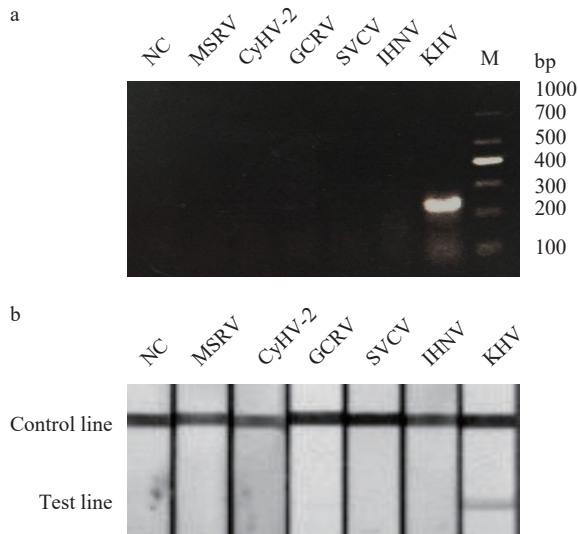


图4 RPA特异性实验检测结果

Fig. 4 Results of RPA specificity assay

M. 1000 marker; NC. 阴性对照; MSRV. 大口黑鲈弹状病毒的cDNA; CyHV-2. II型鲤疱疹病毒的基因组DNA; GCRV. 草鱼呼肠孤病毒的cDNA; IHNV. 传染性皮下及造血组织坏死病毒的基因组DNA; SVCV. 鲤春病毒的基因组DNA; KHV. 锦鲤疱疹病毒的基因组DNA

M. 1000 marker; NC. negative control; MSRV. cDNA of *Microporus salmoides* rhabdovirus; CyHV-2. genomic DNA of Cyprinid herpesvirus 2; GCRV. cDNA of grass carp reovirus genotype I; IHNV. genomic DNA of Infectious hematopoietic necrosis virus; SVCV. genomic DNA of Spring viraemia carp virus; KHV. genomic DNA of Koi herpesvirus

KHV检测的特异性引物。

2.4 灵敏度实验

分别使用RPA-AGE、RPA-LFD方法以常规OIE推荐引物(表2)的PCR方法分别将稀释后的不同浓度的KHV的总DNA模板(1.0 fg/μL、10 fg/μL、100 fg/μL、1.0 pg/μL、10 pg/μL、100 pg/μL和1.0 ng/μL)作为反应模板, 实验在RPA的最佳反应条件下进行(图5)。RPA-AGE及RPA-LFD方法的灵敏度效果一致, 最低检测浓度为10 pg/μL, 灵敏度低于OIE推荐的PCR方法的10 fg/μL最低检测浓度。

2.5 RPA-LFD 方法临床实用

分别使用RPA-AGE及RPA-LFD方法及常规OIE推荐的引物的PCR方法分别对临床样品提取后的DNA进行检测(图6)。3种检测方法均表明2号临床样品呈阳性, 结果说明本实验创建的检测体系在实际检测中有效。

3 讨论

鲤是我国重要的传统养殖品种, 具有较高的经济价值、营养价值和生态价值, 锦鲤是鲤的突变种, 被称为“观赏之王”, 具有极高的观赏价值。自

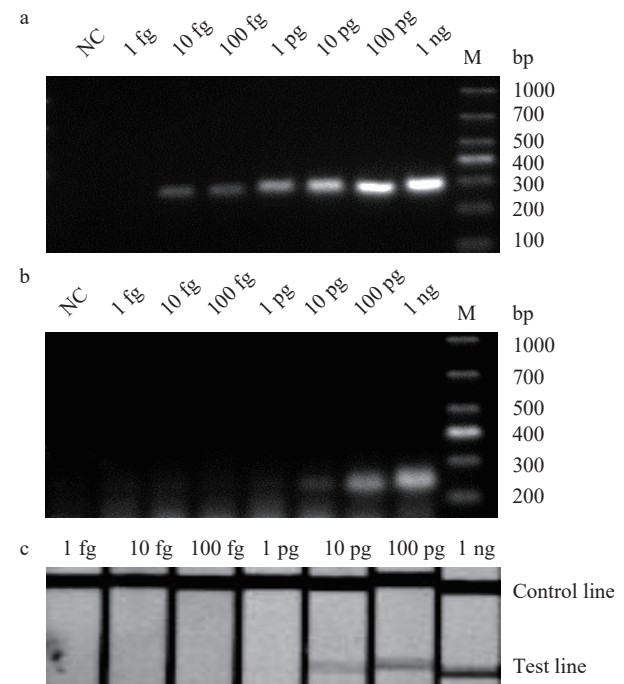


图5 比较常规PCR、RPA-AGE和RPA-LFD

Fig. 5 Comparison of the sensitivity of routine PCR, RPA-AGE and RPA-LFD assays

a. 常规PCR检测; b. RPA-AGE; c. RPA-LFD. 1.0 fg/μL—1.0 ng/μL; NC. 阴性对照(水)

a. routine PCR assay; b. RPA-AGE; c. RPA-LFD. 1.0 fg/μL—1.0 ng/μL; NC. negative controls (water)

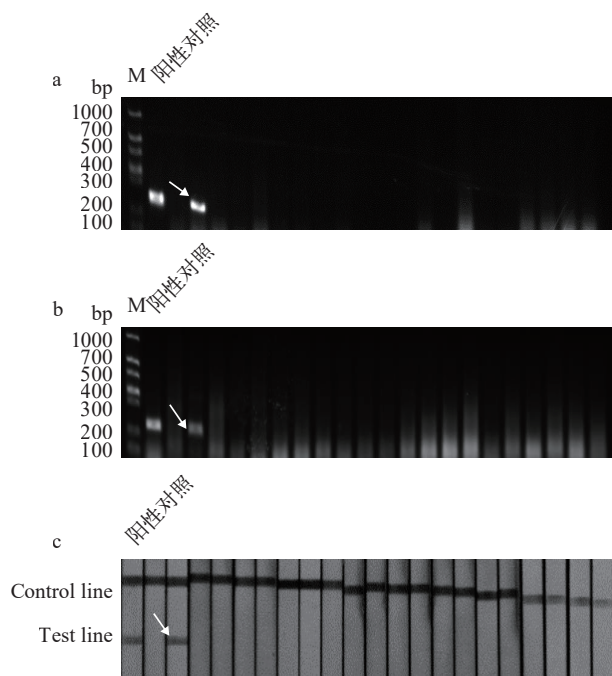


图6 比较常规PCR、RPA-AGE和RPA-LFD临床效果

Fig. 6 Comparison of the sensitivity of routine PCR, RPA-AGE and RPA-LFD assays

a. 常规PCR检测; b. RPA-AGE; c. RPA-LFD

a. routine PCR assay; b. RPA-AGE; c. RPA-LFD

1996年来, 特异性感染鲤、锦鲤及普通鲤变种的锦鲤疱疹病毒病出现, 给世界多个国家的鲤及锦鲤养殖业造成了严重的经济损失, 锦鲤疱疹病毒病可通过水体、鱼体、组织脱落物和粪便等进行横向传播, 也可垂直传播, 具有高传染性, 其造成的死亡率可达85%—100%, 具有高致病性^[12]。同时锦鲤疱疹病毒病的病原KHV可在鲤和锦鲤中潜伏感染, 不易被及时观察、检测和防控, 因此如果水体中存在KHV, 水体保持在最适温度15—25℃的时间越长, 病毒越容易复制和增殖, 则疾病就越有可能暴发^[13]。这些特征使得锦鲤疱疹病毒病自首次发现至今几乎造成了全球性的传染, 阻碍了锦鲤及鲤养殖及出口贸易发展, 2017年农业农村部将KHV纳入《国家水生动物疫病监测计划》方案^[14], 被列为二类动物疫病。

我国的鲤养殖面积和产量所占比重较大, 锦鲤也是我国观赏的主要品种, 锦鲤疱疹病毒病的出现, 对全球锦鲤和鲤养殖业的发展产生严重危害和威胁。目前针对锦鲤疱疹病毒病没有较为有效的治疗方法, 对其防治主要依靠综合防控, 包括疫苗研发、抗病育种选育和水环境监控等方法^[1, 13]。目前在疫苗的使用方面存在着安全隐患, 不适于大规模普及接种等问题, 因此对锦鲤疱疹病毒病的及时防

控就显得十分重要, 疾病的早期诊断更是疾病防控的前提, 建立对KHV的及时准确的检测方法可以有效防止锦鲤疱疹病毒病的进一步扩散。目前针对KHV的检测上有OIE推荐的KF和CCB的细胞培养分离法、基于OIE推荐的TK及Sph基因的常规PCR法、实时定量TaqMan PCR法^[15]、Real-Time PCR法^[16]、nest-PCR法^[17]、多重PCR法^[18]、环介导等温扩增技术(LAMP)法^[19]、单交叉引物等温扩增检测法(Single cross priming amplification, SCPA)^[20]、酶联免疫吸附(ELISA)法^[21]、透射电镜法、间接免疫荧光检测法(Immunofluorescence assay, IFAT)^[21]和原位杂交技术^[22]等检测方法, 但其都存在着技术难度较大、设备要求高等缺点, 不适用于野外场地的检测, 而重组酶聚合酶扩增技术可以有效弥补这些缺陷。

RPA是于2006年开发的一种可进行快速检测的新型等温核酸扩增方法^[23], 2014年出现商品化试剂盒^[24], 自此之后相关研究呈爆发式增加, 其低温、恒温 and 快速扩增的优点使它被认为是可以替代PCR的检测技术。RPA通过重组酶、蛋白酶和单链结合蛋白等, 相较于PCR反应, 仅需恒温条件便可实现快速扩增, 无须昂贵的PCR扩增仪。相较于常用的LAMP技术, RPA仅需一对引物便可完成扩增, 省略了复杂的引物设计, 更加简洁快速, 且假阳性反应较少^[25]。近十年来, RPA及其衍生的技术在藻类环境监测^[26]、植物病害^[27, 28]、畜禽类疾病^[29]和人类疾病^[30]等各个方面都得到了普遍应用, RPA技术在水产病原检测中已有广泛应用, 包括病毒^[5, 14]、细菌^[31]、寄生虫^[32]和立克次氏体^[33]。

RPA是酶介导的恒温快速扩增, 扩增体系中存在的大量蛋白酶^[27], 正因如此, RPA-AGE检测体系得到扩增产物后需进行纯化才能得到清晰准确的目标条带, 如酚氯仿提纯法^[34]。除此之外, 有研究表明分别在RPA反应开始时和反应开始后4min对体系进行搅拌, 有利于各试剂均衡和充分接触以提高反应效率^[23]。RPA最重要的特点即它的恒温特征, 基于RPA的大多数研究可以在37—42℃进行, 不需要严格控制温度控制, 可实现在条件有限的养殖现场进行RPA检测。其次, 引物和探针的设计是RPA反应体系构建的核心^[35], 但由于RPA体系的特殊和复杂性, 还没有出现专门用于体系引物和探针设计的软件, 目前通常采用常规PCR引物设计软件如Prime Premier, 设计合成多对引物, 然后进行进一步筛选^[36]。RPA引物选择主要为靶区域选择、引物设计、实验筛选3个步骤^[30], 扩增子需要具有高敏感性和特异性, 扩增长度在100—200 bp为佳。若

基因片段过短, 采用正反引物与探针、模版杂交可能会出现二聚体^[9], 出现的非特异性扩增可能造成假阳性从而影响最终判读结果。本研究基于KHV的SphI-5基因保守序列设计引物, 扩增子长度168 bp。RPA引物设计通常需要遵循特定的规则^[37], 如长度一般为30—35 bp, 太短会影响扩增速度, 过长则易出现发卡结构等二级结构, 引物的GC含量在30%—70%, 5'末端避免长链鸟嘌呤, 3'末端建议胞嘧啶或者鸟嘌呤。通过RPA技术能够在较低的温度下恒温扩增, 快速得到可靠的结果, 且反应操作简便、对仪器要求较低, 随着RPA技术的改进, 该技术有望在基层诊断实验室和野外养殖场病原诊断上得到广泛应用。

RPA-LFD是采用LFD与RPA相结合的一种检测方法, 相较于AGE检测的方法, LFD无须电泳装置, 仅需不到10min便可对结果进行可视化, 大大缩短了检测时间。LFD方法需要将产物稀释后再使用试纸条进行结果的检测, 以防反应底物的干扰^[28], 因此在使用该方法时需要避免开盖造成的气溶胶污染, 避免假阳性^[38]。本研究中开发了KHV的RPA-LFD方法, 首先针对KHV的DNA聚合酶基因(SphI-5)设计了3对引物, 对其采用RPA-LFD方法分析选择扩增效率最高的最佳引物对即F3/R3(图1)用于后续RPA实验, 对RPA条件的优化(图2)表明, 反应在32—40℃下均可以进行有效地扩增(图2a), 但在37.1—38.3℃的扩增效率最高, 因此选择38.0℃作为标准反应温度。此外, RPA-AGE及RPA-LFD反应仅需10min就可出现可视化结果(图3), 本实验选择30min作为RPA-AGE标准反应时间以确保良好的反应结果, 选择10min作为RPA-LFD标准反应时间以确保快速检测的适用性。经特异性实验验证该检测方法与IHNV、GCRV、SVCV、MSRV、CyHV-2均无交叉反应(图4), 结果表明RPA-AGE和RPA-LFD检测仅特异性检测KHV。RPA-LFD法的灵敏度与RPA-AGE法相当, 最低检测限达到1 pg/μL(图5), RPA检测方便、用时短、简单可适用于养殖一线的快速检测。最后, 分别使用RPA-AGE及RPA-LFD方法以及常规PCR方法分别对临床样品提取后的DNA进行检测(图6), 表明了检测体系的可靠性与实用性。

综上, 本研究以KHV的SphI-5为靶基因建立了RPA-LFD快速检测方法, 该方法有以下优点: 其反应时间短, 能够在30min内完成检测, 比传统PCR方法快5倍; 不需要如热循环仪等特殊的仪器设备和实验条件, 适合基层单位和仪器设备匮乏的现场检测环境使用; 设备便携, 操作简单, 无须专业的操作

人员, 特异性强; 除此之外, 本实验采用国产RPA试剂盒及试纸条, 价格低廉, 也为KHV快速检测试剂盒的开发提供了技术支持。总之, 本研究有望为塘、养殖场、海关出入境动物疫病检疫实验室、水生动物疫病检测等机构实施KHV的检测和监控以及预防提供更加快捷、可靠的检测技术^[39], 并提供了一种快速检测病毒的新方法及有效控制病毒病的研究方向, 同时为开发水生动物疫病检测技术提供参考。

参考文献:

- [1] Zheng S C, Wang Q, Li Y Y, *et al.* Research advances in cyprinid herpesvirus 3 [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, **32**(1): 108-120. [郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒3型研究进展 [J]. *病毒学报*, 2016, **32**(1): 108-120.]
- [2] Kim H J, Kwon S R. Evidence for two koi herpesvirus (KHV) genotypes in south Korea [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, **104**(3): 197-202.
- [3] Gotesman M, Kattlun J, Bergmann S M, *et al.* CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, **105**(2): 163-174.
- [4] Prescott M A, Reed A N, Jin L, *et al.* Rapid detection of cyprinid herpesvirus 3 in latently infected koi by recombinase polymerase amplification [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2016, **28**(3): 173-180.
- [5] Cui L C, Guan X T, Liu Z M, *et al.* Recombinant lactobacillus expressing G protein of spring viremia of carp virus (SVCV) combined with ORF81 protein of koi herpesvirus (KHV): a promising way to induce protective immunity against SVCV and KHV infection in cyprinid fish via oral vaccination [J]. *Vaccine*, 2015, **33**(27): 3092-3099.
- [6] Gray W L, Mullis L, LaPatra S E, *et al.* Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, **25**(3): 171-178.
- [7] Yuasa K, Sano M, Kurita J, *et al.* Improvement of a PCR method with the sph I-5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV) [J]. *Fish Pathology*, 2005, **40**(1): 37-39.
- [8] Li J, MacDonald J, von Stetten F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. *Analyst*, 2019, **144**(1): 31-67.
- [9] Zhang N, Xie Y H, Qiu B F, *et al.* Establishment and clinical application of fluorescent RPA detection method for shrimp white spot syndrome virus [J]. *China Port Science and Technology*, 2021, **3**(7): 48-56. [张娜, 谢艳辉, 仇保丰, 等. 对虾白斑综合征病毒荧光RPA检测方法的建立和临床应用 [J]. *中国口岸科学技术*, 2021, **3**(7): 48-56.]
- [10] Wang H, Sun M, Xu D, *et al.* Rapid visual detection of

- cyprinid herpesvirus 2 by recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 2018May28.
- [11] Soliman H, El-Matbouli M. Rapid detection and differentiation of carp oedema virus and cyprinid herpes virus-3 in koi and common carp [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, **41**(5): 761-772.
- [12] Duan H A, Zhou Y, Xu Y, *et al.* Koi herpesvirus disease [J]. *China Animal Health Inspection*, 2015, **32**(6): 48-52. [段宏安, 周毅, 徐晔, 等. 锦鲤疱疹病毒病简述 [J]. *中国动物检疫*, 2015, **32**(6): 48-52.]
- [13] Wang Q, Zheng S C, Li Y Y, *et al.* Risk assessment on the introduction of koi herpes virus disease [J]. *China Animal Health Inspection*, 2016, **33**(10): 42-46. [王庆, 郑树城, 李莹莹, 等. 锦鲤疱疹病毒病的传入风险评估 [J]. *中国动物检疫*, 2016, **33**(10): 42-46.]
- [14] Wen J X, Yang Q L, Chen Y, *et al.* A real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of CyHV₂ [J]. *Microbiology China*, 2021, **48**(2): 676-685. [闻金萱, 杨倩玲, 陈燕, 等. 实时荧光重组酶聚合酶扩增技术(RPA)快速检测 II 型鲤疱疹病毒 [J]. *微生物学通报*, 2021, **48**(2): 676-685.]
- [15] Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara F J, *et al.* Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, **60**(3): 179-187.
- [16] Chen J J, Li Y Y, Yang R X, *et al.* Method of Real-Time PCR for the detecting latent infection of koi herpesvirus [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2017, **43**(3): 310-314. [陈俊杰, 李媛媛, 阳瑞雪, 等. 锦鲤疱疹病毒潜伏感染实时荧光定量PCR检测方法的建立 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2017, **43**(3): 310-314.]
- [17] Liu H, Shi X J, Gao L Y, *et al.* Study on the aetiology of koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay (nested-PCR) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural*, 2002, **21**(5): 414-418. [刘荭, 史秀杰, 高隆英, 江育林. 进口锦鲤暴发病原的nested-PCR鉴定 [J]. *华中农业大学学报*, 2002, **21**(5): 414-418.]
- [18] Wu R Q, Liu Z Y, Huang B C. Detection of kio hespesvirus gene segment by using polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2005, **15**(2): 6-8. [乌日琴, 刘中勇, 黄宝春. PCR方法快速检测锦鲤疱疹病毒基因 [J]. *检验检疫科学*, 2005, **15**(2): 6-8.]
- [19] Chen J J, Wang K Y, Zhou L X, *et al.* Establishment of a LAMP assay for detection of koi herpesvirus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, **38**(5): 390-393. [陈俊杰, 汪开毓, 周立新, 等. 锦鲤疱疹病毒环介导等温扩增检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2016, **38**(5): 390-393.]
- [20] Li C H, Xu J, Liu W Z, *et al.* Establishment of single cross priming isothermal amplification for Koi herpesvirus detection [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(9): 1422-1431. [李聪慧, 徐进, 刘文枝, 等. 锦鲤疱疹病毒单交叉引物等温扩增检测方法的建立 [J]. *水产学报*, 2015, **39**(9): 1422-1431.]
- [21] Liu T Q. Serological detection methods of anti koi herpesvirus antibody [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012: 1-6. [刘亭岐. 锦鲤疱疹病毒抗体血清学检测方法的建立及应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 1-6.]
- [22] Yang X, Zhao P, Dong Y, *et al.* An improved recombinase polymerase amplification assay for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* with lateral flow strips [J]. *Journal of Food Science*, 2020, **85**(6): 1834-1844.
- [23] Shi Y, Xu C P, Yu B B, *et al.* Research progress in recombinase polymerase amplification (RPA) [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2020, **36**(3): 522-532. [施奕, 徐昌平, 余蓓蓓, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展 [J]. *病毒学报*, 2020, **36**(3): 522-532.]
- [24] Pang J H, Qiao L L, Huang H L, *et al.* Rapid detection of *Listonella anguillarum* by recombinase polymerase amplification technique [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, **26**(6): 1056-1063. [庞建虎, 乔龙亮, 黄海龙, 等. 重组酶聚合酶扩增技术快速检测鳃利斯顿氏菌 [J]. *农业生物技术学报*, 2018, **26**(6): 1056-1063.]
- [25] Tan L Q, Zheng X C, Wang C P, *et al.* Development of real time RT-RPA for rapid detection of rabies virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, **55**(5): 44-47. [谭理琦, 郑晓聪, 王翠萍, 等. 狂犬病病毒实时荧光 RT-RPA等温检测方法的建立 [J]. *中国兽医杂志*, 2019, **55**(5): 44-47.]
- [26] Zhang C, Yang Y, Liu F, *et al.* Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick for the rapid detection of *Chattonella marina* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2022, **34**(3): 1607-1620.
- [27] Zhang N, Qian Y K, Wei S, *et al.* Based on recombinase polymerase amplification, the method of detection of *Grapevine leafroll-associated virus 3* [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2016, **53**(2): 302-308. [张娜, 乾义柯, 魏霜, 等. 基于重组酶聚合酶扩增技术(RPA)的葡萄卷叶伴随病毒3号检测方法 [J]. *新疆农业科学*, 2016, **53**(2): 302-308.]
- [28] Luo X C, An M N, Wu Y H, *et al.* Applications of recombinase polymerase amplification in plant virus detection [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, **38**(2): 269-280. [罗雪琮, 安梦楠, 吴元华, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在植物病毒检测中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2022, **38**(2): 269-280.]
- [29] Zhao G, He H, Wang H. Use of a recombinase polymerase amplification commercial kit for rapid visual detection of *Pasteurella multocida* [J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, **15**(1): 154-161.
- [30] Vlachakis D, Labrou N E, Iliopoulos C, *et al.* Insights into the influence of specific splicing events on the structural organization of *LRRK2* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(9): 2784.

- [31] Zeng L M, Gao S, Yu H. Establishment of a recombinase Polymerase amplification and lateral flow strip combined method for the rapid detection of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Jiangsu Ocean University* (Natural Science Edition), 2021, **30**(4): 42-46. [曾丽媚, 高嵩, 余泓. 嗜水气单胞菌RPA-LFS快速检测方法的建立 [J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2021, **30**(4): 42-46.]
- [32] Zheng W B, Wu Y D, Ma J G, *et al.* Recombinase polymerase amplification and its applications in parasite detection [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2015, **33**(5): 382-386. [郑文斌, 吴耀东, 马剑钢, 等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在寄生虫检测中的应用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, **33**(5): 382-386.]
- [33] del Río J S, Svobodova M, Bustos P, *et al.* Electrochemical detection of *Piscirickettsia salmonis* genomic DNA from salmon samples using solid-phase recombinase polymerase amplification [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**(30): 8611-8620.
- [34] Chen K M, Xia Y Z, Zhang S H, *et al.* Comparison of routine phenol/trichloromethane method with TaKaBa purification kit in extracting whole blood genome DNA [J]. *Zhejiang Medical Journal*, 2010, **32**(5): 674-676. [陈昆明, 夏叶子, 章圣辉, 等. 经典酚/氯仿抽提法和纯化试剂盒法提取全血基因组DNA的比较 [J]. 浙江医学, 2010, **32**(5): 674-676.]
- [35] Yan L, Zhou J, Zheng Y, *et al.* Isothermal amplified detection of DNA and RNA [J]. *Molecular BioSystems*, 2014, **10**(5): 970-1003.
- [36] Liang J N, Yin W L, Xie S, *et al.* Recombinase polymerase amplification for the rapid detection of Spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2019, **41**(10): 1037-1040. [梁君妮, 尹伟力, 谢爽, 等. 重组酶聚合酶扩增技术快速检测鲤春病毒血症病毒(SVCV)方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2019, **41**(10): 1037-1040.]
- [37] Daher R K, Stewart G, Boissinot M, *et al.* Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. *Clinical Chemistry*, 2016, **62**(7): 947-958.
- [38] Yu H Y, Shen J Y, Li J J, *et al.* Establishment and application of a real-time RPA rapid detection method for diagnosis of *Neospora caninum* infection [J]. *Journal of Jiangsu Ocean University* (Natural Science Edition), 2021, **30**(4): 30-34. [俞海怡, 沈金阳, 李皎皎, 等. 一种新孢子虫病实时RPA快速检测方法的建立及应用 [J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2021, **30**(4): 30-34.]
- [39] Feng Z, Chu X, Han M, *et al.* Rapid visual detection of *Micropterus salmoides* rhabdovirus using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipsticks [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, **45**(3): 461-469.

RAPID VISUAL DETECTION OF KHV BY RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION (RPA) COMBINED WITH A LATERAL FLOW DIPSTICK (LFD)

CHU Xin¹, FENG Zi-Zhao¹, JIANG You-Sheng^{1,2,3}, WANG Hao^{1,2,3}, LÜ Li-Qun^{1,2,3} and XU Dan^{1,2,3}

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental

Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Cyprinus carpio* and *Cyprinus carpio* kio are important aquaculture varieties in China. Highly pathogenic and infectious of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3, KHV) has caused great losses in the culture of *Cyprinus carpio* and *Cyprinus carpio* kio. Therefore, the rapid and convenient detection technology is desperately needed to be used for non-laboratory and fast detection. Recombinase polymerase amplification (RPA) is such an Isothermal amplification technology which can amplify DNA within 30min under low reaction temperature. Then we combined RPA with lateral flow dipstick (LFD) and established a rapid and sensitive method which are suitable for field clinical detection of KHV. In this study, primers and probe sequences were designed according to the conserved fragment of SphI-5 gene of KHV. The experimental results show that the RPA technique can detect target fragment by agarose gel electrophoresis within 30min at the optimal temperature of 38°C and the RPA results can be visualized in only 5min in combination with the LFD and the entire RPA-LFD assay takes 50min which are a lot faster than PCR method. The method established in this experiment for the detection of KHV by RPA-LFD is so simple and sensitivity that can be useful for rapid diagnosis in aquaculture with limited resources.

Key words: Koi herpesvirus; Rapid detection; Recombinase polymerase amplification technique; Lateral flow dipstick