

# 对虾产品疫病双重荧光 RPA 方法的建立和初步应用

张 娜<sup>1</sup>, 谢艳辉<sup>1</sup>, 仇保封<sup>2</sup>, 郑舒尹<sup>1</sup>, 斯泽恩<sup>1</sup>, 李家侨<sup>\*1</sup>

(1. 湛江海关技术中心, 广东 湛江 524000; 2. 南通海关技术中心, 江苏 南通 226004)

**摘要:** 为实现对虾产品中两种病原体的简便、快速、高效检测, 针对对虾传染性皮下及造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)和虾肝肠胞虫(EHP)进行双重荧光 RPA(recombinase polymerase amplification, 重组酶聚合酶扩增)检测方法的研究。根据 IHNV 和 EHP 的保守序列设计引物、探针, 建立双重荧光 RPA 方法, 同时对方法的特异性、敏感性和重复性进行验证。结果表明, 所建立的方法只对 IHNV 和 EHP 有明显的扩增; 用 IHNV 和 EHP 阳性质粒进行倍比稀释检测, 结果表明双重荧光 RPA 方法对 IHNV 和 EHP 质粒检测灵敏度可以达到  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L; 用 10 个重复质粒样本进行检测, 结果证明方法重复性较好。使用该方法对进口的冷冻对虾样本检测, 检测出 1 例 EHP 阳性和 1 例 IHNV 阳性, 同时样本用荧光 PCR 方法进行比对检测, 两种方法检测结果一致。本研究中所建立的方法对于两种疫病的区分检测具有重要的临床意义, 可应用于养殖场、对虾产品生产企业和口岸实验室疫病的快速筛查。

**关键词:** 冷冻对虾; 传染性皮下及造血器官坏死病毒; 虾肝肠胞虫; 双重荧光 RPA 方法; 临床应用  
中图分类号: S 855.9 文章编号: 1673-1689(2024)01-0078-09 DOI: 10.12441/spyswjs.20210617002

## Establishment and Preliminary Application of Duplex Fluorescent RPA for Detection of Pathogens in Shrimp Products

ZHANG Na<sup>1</sup>, XIE Yanhui<sup>1</sup>, QIU Baofeng<sup>2</sup>, ZHENG Shuyin<sup>1</sup>, SI Ze'en<sup>1</sup>, LI Jiaqiao<sup>\*1</sup>

(1. Zhanjiang Customs Technology Center, Zhanjiang 524000, China; 2. Nantong Customs Technology Center, Nantong 226004, China)

**Abstract:** To achieve a simple, rapid and efficient detection of two pathogens in shrimp products, a duplex fluorescent recombinase polymerase amplification(RPA) detection method was developed for infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). Primers and probes were designed based on the conserved sequences of IHNV and EHP, and the duplex fluorescent RPA method was established. The specificity, sensitivity and repeatability of the method were validated. The results showed that the established method exhibited distinct amplification only for IHNV and EHP. Detection using diluted plasmids of IHNV and EHP demonstrated that the sensitivity of the duplex fluorescent RPA method for detecting IHNV and EHP plasmids could reach  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L. The method showed good repeatability with ten

收稿日期: 2021-06-17 修回日期: 2021-08-13

基金项目: 中华人民共和国海关总署科研项目(2019HK038, 2019HK025, 2021HK007)。

作者简介: 张 娜(1982—), 女, 高级兽医师, 主要从事出入境动物疫病检疫研究。E-mail: vien512@126.com

\* 通信作者: 李家侨(1987—), 女, 兽医师, 主要从事出入境动物疫病检疫研究。E-mail: zjdjys@163.com

repeated plasmid samples. The method was employed to examine imported frozen shrimp samples, resulting in the discovery of one positive EHP and one positive IHNV. Comparison of the detection results with fluorescent PCR showed consistency between the two methods. The method established in this research has important clinical significance for the distinguishing and detection of the two diseases, and can be applied to rapid screening methods for disease diagnosis in aquaculture farms, shrimp product production enterprises, and port laboratories.

**Keywords:** frozen shrimp, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, *Enterocytozoon hepatopenaei*, duplex fluorescent RPA, clinical application

随着南美白对虾养殖规模不断扩大,对虾疫病的发生成为了对虾养殖业发展的瓶颈之一,为保护我国水产养殖业的健康发展,我国对进出口冷冻水产品的疫病监测项目逐渐增多,对出口贸易国家的水产品养殖的疫病评估更加严格。

传染性皮下及造血器官坏死病毒是引起对虾传染性皮下及造血组织坏死病(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, IHNV)的病原<sup>[1]</sup>。IHNV 能够对其造成高的致病率和死亡率(90%),可以使斑节对虾以及凡纳滨对虾等出现矮小残缺综合征(runt-deformity syndrome, RDS),感染该病毒的对虾长不大,导致养殖产量大受影响,养殖过程中进行有效的生物安保措施是预防该病的最有效的方法<sup>[2]</sup>,而该病无有效的治疗方法。

虾肝肠胞虫是近几年新发现的寄生于对虾肝胰腺组织的新病原,尽管虾肝肠胞虫不会像对虾白斑病、黄头病、急性肝胰腺坏死病等急性传染病那样引起对虾大量死亡,但会导致虾生长缓慢,参差不齐,养殖效率急剧下降,给对虾养殖业带来了巨大损失<sup>[3-5]</sup>。

随着分子生物学技术的发展,目前出现了多种等温核酸扩增技术,如链置换扩增法(SDA)、转录介导扩增法(TMA)、解旋酶恒温基因扩增法(HAD)、环介导等温扩增法(LAMP)、重组酶聚合酶扩增法和重组酶介导扩增法(RAA)<sup>[6]</sup>。

重组酶聚合酶扩增是高威芳等研究出的一种新型等温 DNA 扩增方法<sup>[7]</sup>,RPA 需要 DNA 聚合酶、T4 重组酶、单链 DNA 结合蛋白(SSB)以及辅助 DNA 聚合酶的蛋白质。在模板 DNA 链上匹配到互补链,并启动 DNA 合成;不进行核酸解链和退火,在 37℃即可进行核酸扩增;在扩增体系中加入一个 EXO 探针,可以在扩增过程中实时监测荧光信号,通过收集荧光即可实现检测的实时监控。该方

法优点在于灵敏、快速,在 20~30 min 即可完成检测,不需要复杂的机器进行热循环<sup>[8-9]</sup>。RPA 技术已经被应用到多种动物病原的检测上,如鳃利斯顿氏菌<sup>[10]</sup>、寄生虫<sup>[11]</sup>、牛冠状病毒<sup>[12]</sup>、犬细小病毒<sup>[13]</sup>、流感病毒<sup>[14]</sup>等。

目前 RPA 技术在虾类病原体检测方面的报道还比较少,为了方便病原监测,希望在重组酶聚合酶等温扩增核酸的基础上,开发出多重荧光 RPA 方法。本研究应用中应用实时荧光 RPA 检测技术,根据虾肝肠胞虫(EHP)和传染性皮下及造血器官坏死病毒(IHNV)的保守序列设计引物、探针,实现对以上两种病原体的简便、快速、高效、高通量检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器设备

centrifuge 5417R 高速冷冻离心机: Eppendorf 公司; 7500 荧光 PCR 仪: ABI 公司; Q5000 核酸浓度分析仪: Qua Well 公司。

### 1.2 主要试剂

RPA 荧光检测试剂盒 (Twist Amp DNA Amplification Exo Kits): TwistDx Inc 公司; DNeasy® Blood and Tissue Kit: Qiagen 公司; DNA 纯化回收试剂盒、质粒 DNA 抽提试剂: TAKARA 公司; PCR 管等: Axygen 公司。

### 1.3 阳性样本

所使用的阳性样本为作者所在实验室保存的 IHNV 和 EHP 阳性南美白对虾组织样本。

### 1.4 引物和探针设计合成

根据 IHNV 基因组序列(GenBank: JX258653), 分析该病原体的特异性序列, 选择 IHNV 中非结构蛋白 2(non-structural protein 2, NS2)和虾肝肠胞虫的核糖体小亚基(small subunit ribosomal, SSR)基因序列(GenBank MT539781.1)的保守序列设计引

物、探针,具体引物、探针见表 1。引物、探针合成由 生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 1 双重荧光 RPA 检测体系所用引物、探针序列

Table 1 Primer and probe sequences for the duplex fluorescent RPA detection system

病原体	名称	引物、探针序列(5'—3')	靶基因
IHHNV	IHHNV-F	CTCCAACACCACAAAAGAGACAGGCGGAGGAGACA	NS2 的基因
	IHHNV-R	CTTCAATAAAGTCGGGTGTGTTCCTCCGTACTAC	
	IHHNV-P	CGACGACATCAGGAAAGCGATCATGGAAGCAA(HEX-dT)GG(THF)AA(BQH1-dT)CGAC TGGAACCTACC-C3-SPACER	
EHP	EHP-F	CTCTTAGACGTATCTGCGGATCAAGGACGAAGGC	SSR 的 RNA
	EHP-R	AAACTAAGATTTCTCCACACCAAGCATCG	
	EHP-P	TATCGAAAGTGATTAGACACCGCTGTAGTTC(FAM-dT)AG(THF)AG(BQH1-dT)AAACTA TGCCGAC-C3-SPACER	

1.5 方法

1.5.1 组织样本 DNA 提取 取作者所在实验室保存的IHHNV 和 EHP 阳性南美白对虾组织样本,放入 1.5 mL 离心管中。两个样本分别按照 DNeasy® Blood and Tissue Kit 的说明提取 DNA,存放于-20 ℃ 冰箱中待用。

1.5.2 阳性质粒构建 取提取的 IHHNV 和 EHP 的 DNA,分别用设计的上下游引物进行 PCR 扩增,扩增体系为:10×PCR buffer(Mg<sup>2+</sup> plus)2.5 μL,上下游引物各(10 μmol/L)1 μL,dNTP(10 μmol/L)2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,提抽物 5 μL,加水至 25 μL。扩增程序为:95 ℃ 3 min;95 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。扩增产物进行测序分析和比对。

将 10 μL PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,切下目的条带,按照 DNA 纯化回收试剂盒说明书进行回收;将回收的扩增片段与 pMD18-T 载体连接并转化和培养,挑取单克隆进行质粒提取和 PCR 鉴定后进行测序,测序结果与扩增基因的片段序列进行核苷酸序列同源性分析。用核酸浓度分析仪测定提取的重组质粒的 DNA 浓度。将提取好的重组质粒作为本实验标准品,-20 ℃保存。

1.5.3 IHHNV、EHP 的荧光 RPA 方法的建立 以 IHHNV 的阳性质粒为模板,建立荧光 RPA 检测体系,反应体系为 50 μL,包括:Rehydration Buffer 25 μL,双蒸水 15.4 μL,上游引物和下游引物各 2.0 μL,探针为 0.6 μL,模板 5 μL(分别为阳性质粒、阴性对照、空白对照、EHP 的 DNA 模板)。

以 EHP 阳性质粒为模板,建立荧光 RPA 检测体系,反应体系为 50 μL,包括:Rehydration Buffer 25 μL,双蒸水 15.4 μL,上游引物和下游引物各 2.0

μL,探针为 0.6 μL,模板 5 μL(分别为阳性质粒、阴性对照、空白对照、IHHNV 的 DNA 模板)。

以上反应体系溶液混匀后进行瞬时离心,然后加入到含有冻干粉的 0.2 mL 的 Twist Amp Exo RPA 反应管中,充分混匀。最后加入醋酸镁(280 mmol/L)2.5 μL,混匀后进行瞬时离心,分别将反应管放入检测仪器内检测。

扩增程序分别设置为:温度 37 ℃,共 30 个循环,每个循环 1 min,每 1 min 检测一次荧光信号;IHHNV 荧光信号检测通道为 VIC,EHP 荧光信号检测通道为 FAM。

1.5.4 双重荧光 RPA 扩增体系的优化 双重 RPA 荧光检测反应体系为 50 μL,包括:Rehydration Buffer 25 μL,模板 DNA 5 μL(模板样本分别为:IHHNV 和 EHP 混合阳性质粒、阴性对照、空白对照),并对不同体积的引物、探针体系进行优化,所有组分加入后加水至 50 μL。

第 1 组:EHP-F、EHP-R 各 1.5 μL,EHP-P 0.8 μL;IHHNV-F、IHHNV-R 各 2.0 μL,IHHNV-P 0.6 μL。第 2 组:EHP-F、EHP-R 各 2.0 μL,EHP-P 0.6 μL;IHHNV-F、IHHNV-R 各 2.0 μL,IHHNV-P 0.6 μL。第 3 组:EHP-F、EHP-R 各 2.0 μL,EHP-P 0.6 μL;IHHNV-F、IHHNV-R 各 1.5 μL,IHHNV-P 0.8 μL。

每组体系中将以上加入的组分进行涡旋混匀,并在 6 000 r/min 瞬时离心后加入到含有冻干粉的 0.2 mL 的 Twist Amp Exo RPA 反应管中,充分混匀。最后加入醋酸镁(280 mmol/L)2.5 μL,混匀并瞬时离心后放入检测仪器内检测。

扩增程序选择 37 ℃,30 个循环,每个循环 1 min,每个循环采集一次荧光信号;荧光信号检测

通道选择FAM和VIC。

**1.5.5 双重荧光 RPA 方法的特异性验证** 分别抽提 IHNV、EHP、急性肝胰腺副溶血性弧菌(AHPND)、对虾白斑综合征病毒(WSSV)、虾传染性肌肉坏死病毒(IMNV)、虾基因组、鱼基因组的核酸样本。将上述7种病原体样本混合测试,以检验建立的反应体系对EHP和IHNV的检测特异性,以及对干扰核酸的抗干扰检测能力。

**1.5.6 双重荧光 RPA 方法的灵敏度验证** 将建立好的 IHNV 阳性质粒和 EHP 阳性质粒分别进行稀释,得到  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 共5个浓度梯度。每个浓度模板分别测试3个重复,以测试建立方法的灵敏度。

**1.5.7 双重荧光 RPA 方法的重复性验证** 将建立好的 IHNV 阳性质粒和 EHP 阳性质粒分别进行稀释,混合至浓度均为  $2 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L,重复检测10个模板,来验证方法的重复性。分别计算各自的CT值的变异系数( $C_V$ ),计算公式为:

$$C_V = S/X \times 100\%$$

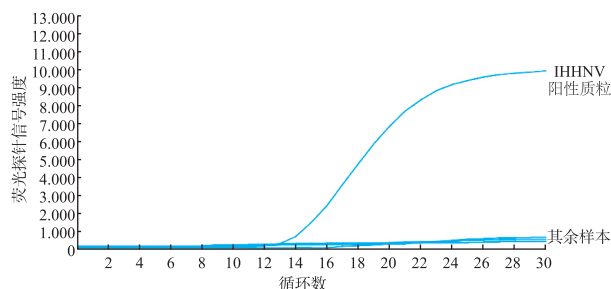
式中: $C_V$ 为10个检测CT值的变异系数,%; $S$ 为10个检测CT值的标准偏差; $X$ 为10个检测CT值的算术平均值。

**1.5.8 双重荧光 RPA 方法的实际样本检测及方法学对比** 进口冷冻带头对虾样本共20份,每份样本30只虾,无菌采集虾鳃和肝胰腺等器官制备成一份混合样本。分别进行组织匀浆和离心并提取核酸。每个样本取5  $\mu$ L核酸分别用建立的双重荧光RPA方法检测,同时每个样本用荧光PCR方法进行平行对比。

## 2 结果与分析

### 2.1 IHNV 和 EHP 的荧光 RPA 方法的建立

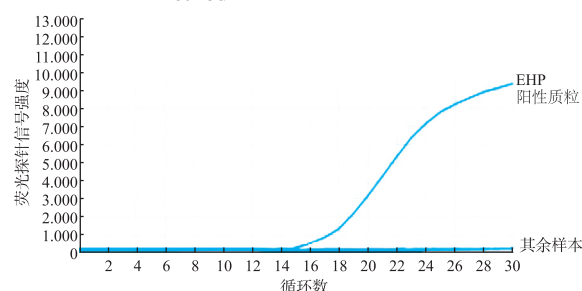
分别以阳性质粒、阴性对照、空白对照、EHP或IHNV的DNA作为模板,建立IHNV和EHP荧光RPA检测体系。IHNV荧光RPA方法扩增结果如图1所示,可以看出只有IHNV阳性质粒扩增明显,EHP的DNA模板、阴性对照、空白对照均没有扩增;EHP荧光RPA方法扩增结果如图2所示,结果只有EHP阳性质粒有明显扩增,IHNV的DNA模板、阴性对照、空白对照均没有扩增。结果证明IHNV、EHP的荧光RPA方法构建成功。



其余样本为阴性对照、空白对照、EHP的DNA模板。

图1 IHNV 荧光 RPA 方法扩增结果

Fig. 1 Amplification results of IHNV by fluorescent RPA method



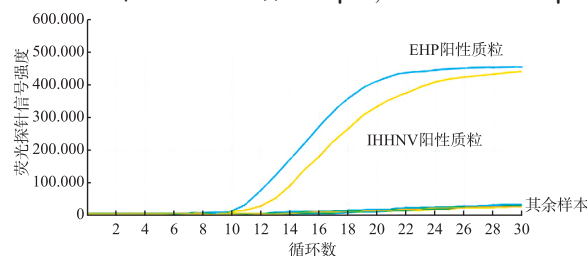
其余样本为阴性对照、空白对照、IHNV的DNA模板。

图2 EHP 荧光 RPA 方法扩增结果

Fig. 2 Amplification results of EHP by fluorescent RPA method

### 2.2 双重荧光 RPA 方法扩增体系的优化

分别设置3组不同体积的引物、探针体系,IHNV选择VIC荧光信号检测通道,EHP选择FAM荧光信号检测通道。3组体系扩增结果如图3~5所示。由图3可以看出,第1组的扩增效果最好,IHNV和EHP阳性质粒扩增曲线均匀性最好,扩增效率最高;而第2组的IHNV阳性质粒扩增效率差(见图4);第3组的IHNV和EHP的阳性质粒扩增效率最差(见图5)。综合对比,第1组的体系扩增效果最优,即EHP-F、EHP-R各1.5  $\mu$ L,EHP-P 0.8  $\mu$ L;IHNV-F、IHNV-R各2.0  $\mu$ L,IHNV-P 0.6  $\mu$ L。

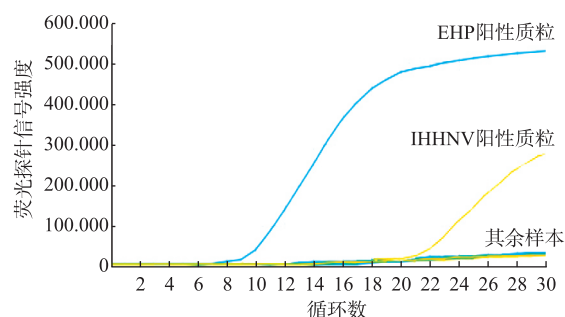


其余样本为阴性对照、空白对照。

图3 第1组引物、探针体系扩增结果

Fig. 3 Amplification results of the first set of primer and probe system

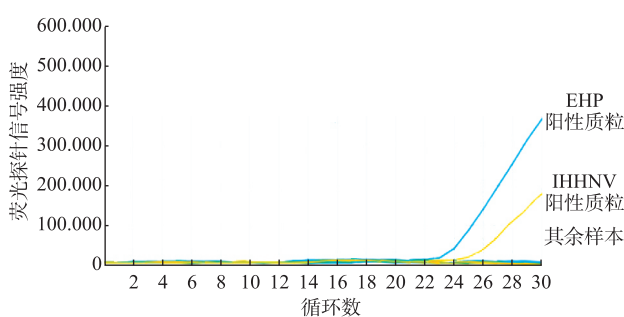




其余样本为阴性对照、空白对照。

图4 第2组引物、探针体系扩增结果

Fig. 4 Amplification results of the second set of primer and probe system



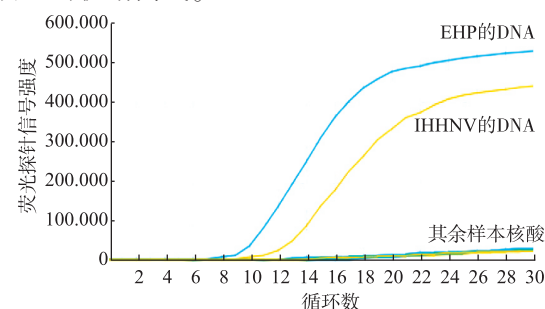
其余样本为阴性对照、空白对照。

图5 第3组引物、探针体系扩增结果

Fig. 5 Amplification results of the third set of primer and probe system

### 2.3 双重荧光 RPA 方法特异性验证结果

使用 IHNV、EHP、AHPND、WSSV、IMNV、虾基因组、鱼基因组的核酸,将上述 7 种病原体核酸混合测试,检验所建立的双重荧光 RPA 方法的特异性。结果如图 6 所示,IHNV 和 EHP 的 DNA 样本检测结果扩增曲线明显,其余 5 种核酸样本都未见明显的扩增曲线。



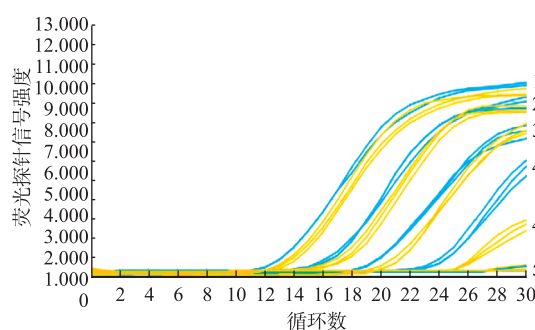
其余样本为 AHPND、WSSV、IMNV、虾基因组、鱼基因组的核酸。

图6 双重荧光 RPA 方法特异性验证结果

Fig. 6 Specificity verification results of the duplex fluorescent RPA method

### 2.4 双重荧光 RPA 方法灵敏度验证结果

将建立好的 IHNV 阳性质粒和 EHP 阳性质粒分别进行稀释,得到  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 共 5 个浓度梯度。每个浓度模板分别测试 3 个重复,以测试建立方法的灵敏度。检测结果如图 7 显示, $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L 的样本均有明显的扩增曲线, $1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的样本扩增曲线接近水平。可见建立的双重荧光 RPA 方法对 IHNV 阳性质粒和 EHP 阳性质粒的检测灵敏度可以达到  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L。



1~5 分别为  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的 IHNV 阳性质粒(蓝色条带)和 EHP 阳性质粒(黄色条带)。

图7 双重荧光 RPA 方法灵敏度扩增检测结果

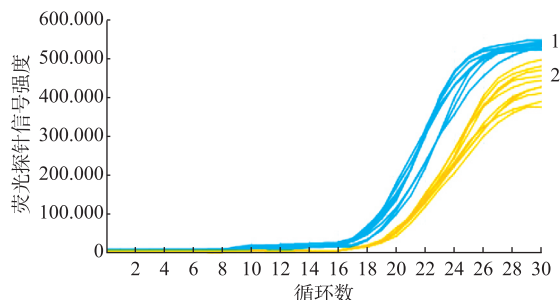
Fig. 7 Detection results of sensitivity amplification of the duplex fluorescent RPA method

### 2.5 双重荧光 RPA 方法重复性验证结果

将建立好的 IHNV 阳性质粒和 EHP 阳性质粒分别进行稀释,混合至浓度均为  $2 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L,重复检测 10 个模板,来验证方法的重复性,分别计算各自的 CT 值的变异系数,IHNV 检测的 CT 值分别为 20.12、19.54、19.01、19.83、19.72、19.53、20.03、19.89、19.47、19.88,变异系数为 1.65%;EHP 检测的 CT 值分别为 17.12、17.24、17.35、17.46、17.92、18.21、18.31、17.65、17.94、17.46,变异系数为 2.32%。具体结果如图 8 所示,双重荧光 RPA 方法对于 IHNV 和 EHP 的重复性验证结果较好。

### 2.6 实际样本检测及方法学对比结果

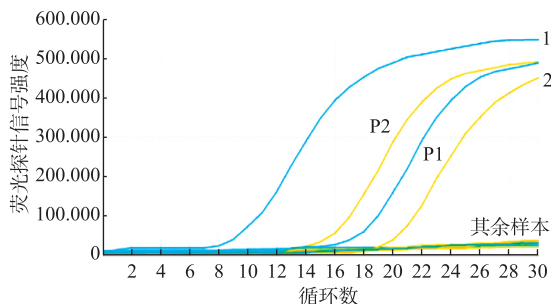
进口冷冻带头对虾样本共 20 份,每个样本取 5  $\mu$ L 核酸分别采用建立的双重荧光 RPA 方法进行检测,同时每个样本用荧光 PCR 方法进行平行检测。由图 9 可以看出,采用双重荧光 RPA 检测出 1 例 EHP 阳性和 1 例 IHNV 阳性。荧光 PCR 方法检测结果与双重荧光 RPA 方法结果一致(见图 10)。



1. EHP 阳性质粒的 10 个重复样本;2. IHNV 阳性质粒的 10 个重复样本。

图 8 双重荧光 RPA 方法重复性验证结果

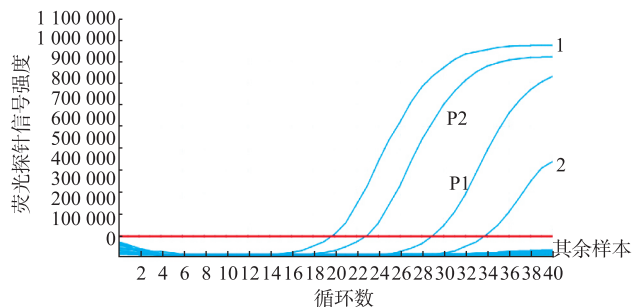
Fig. 8 Repeatability verification results of the duplex fluorescent RPA method



1. 检测的一例 EHP 阳性样本;2. 检测的一例 IHNV 阳性样本;P1. EHP 阳性对照;P2. IHNV 阳性对照;其余样本. 阴性对照和其他检测样本。

图 9 双重荧光 RPA 方法检测 20 例实际样本的结果

Fig. 9 Results of 20 clinical samples detected by the duplex fluorescent RPA method



1. 检测的一例 EHP 阳性样本;2. 检测的一例 IHNV 阳性样本;P1. EHP 阳性对照;P2. IHNV 阳性对照;其余样本. 阴性对照和其他检测样本。

图 10 荧光 PCR 方法检测 20 例实际样本的结果

Fig. 10 Results of 20 clinical samples detected by the fluorescent PCR method

## 2.7 讨论

IHHNV 感染可以在对虾生长的整个周期,对虾感染 IHHNV 后,可能会终身带病毒,并通过垂直传染途径感染子代,或透过食物链和污染水质等引起水平感染<sup>[15-16]</sup>。目前,虾肝肠胞虫的传播越来越广泛,有研究表明在中国、印度尼西亚、马来西亚、越南、印度和泰国等国家均有检出<sup>[17]</sup>。EHP 感染在苗种培育和成虾养殖阶段均有出现,严重影响对虾的生长速度和成虾品质,给该产业带来巨大的经济损失,在亚洲地区每年损失上亿美元<sup>[18]</sup>,特别是和其他疫病混合感染时,使对虾疫情加重,增加致死率。

IHHNV 和 EHP 两种疫病都会引起对虾生长缓慢,影响投入产出比,当幼虾出现生长缓慢、死亡率高的情况时,就需要养殖人员快速和准确地判断出病原,以及时作出预防和治疗方案来减少发病引起的更大损失。所以,对于这两种疫病的区分检测具有重要的临床意义。特别是当临床出现混合感染的时候,建立 IHHNV 和 EHP 的双重检测方法可以为确定病原节省更多的时间。

澳大利亚作为全球动植物检验检疫最严格的国家之一,一直以来对进口的生虾仁、面包虾、去头虾等产品采取严格的检疫措施<sup>[19]</sup>,使养殖企业和生产企业的负担加重,给我国虾生产企业,乃至整个虾产业造成了严重的经济和社会影响,严重影响了对虾进出口贸易和对虾养殖产业的发展。所以,针对冷冻水产品的疫病监测,全球各个国家所制定的检疫措施也越来越严格。因此,必须足够地重视和关注原料、生产线及成品质量,加强企业对疫病检疫的力度,降低企业的生产成本和出口风险。

王金凤等构建了猪瘟病毒重组酶聚合酶扩增检测方法(RT-RPA 方法),该方法的检出限为 $1.0 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L<sup>[20]</sup>。万文妍等将重组酶聚合酶扩增(RPA)与胶体金侧向流试纸条(LFD)技术联合,建立了禽腺病毒血清 4 型 RPA-LFD 快速检测方法,该方法的最低检出限为 $1.0 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,可用肉眼直接观察结果<sup>[21]</sup>。杨洋等建立了口蹄疫病毒实时荧光反转录重组酶聚合酶扩增检测方法,该方法特异性较高,重复性好,灵敏度为 $5.0 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,与 RT-qPCR 检测结果具有 100% 的符合率<sup>[22]</sup>。作者从临床应用考虑建立双重荧光 RPA 方法,对方法的特异性、灵敏度和重复性进行验证,结果显示所建立的方法只对 IHHNV 和 EHP 的核酸样本有明显的

扩增,而对其他病原和宿主基因均不会扩增; IHNV 和 EHP 阳性质粒的检测灵敏度可以达到  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,表明方法的灵敏度较高。同时,进行重复性验证,结果显示方法重复性较好。

目前,对于对虾疫病的主流方法是荧光 PCR 和普通 PCR 方法<sup>[23-24]</sup>,这些方法均需要使用荧光定量 PCR 仪和普通 PCR 仪,设备需要使用 220 V 交流电源,需要在实验室环境下使用,不利于在野外实施检测;同时荧光定量 PCR 方法需要循环升降温,检测时间比较长,一般需要 1.0~1.5 h。

使用本文中建立的方法对进口冻虾进行检测,检出 1 例 EHP 感染和 1 例 IHNV 感染,同时用荧光 PCR 方法进行比对检测,两种方法的检测结果一致。但是,双重荧光 RPA 方法中的弱阳性样本扩增曲线效率更高,同时双重荧光 RPA 方法的检测速度明显短于荧光 PCR 方法。

### 3 结 语

当前,疫病检测的要求越来越严格,不仅要缩短检测时间,还要提高检测灵敏度,在这样的要求下,需要开发出更多快速、简便、灵敏度高的检测方法。重组酶聚合酶扩增技术是恒温核酸扩增技术的

一种,该方法灵敏、快速,有着广阔的应用前景<sup>[25-27]</sup>。本研究建立了同时检测 IHNV 和 EHP 的双重荧光 RPA 方法,不需要使用复杂的设备,在现场即可以检测,并且检测时间可以缩短到 20~30 min。

目前,对于双重疫病 RPA 检测方法的报道较少,所以对于多重荧光 RPA 方法的建立还需要更多的研究,比如较高要求的引物设计。进行引物设计时,需要注意:RPA 的 5'端 3~5 个碱基处,最好是嘧啶碱基(T/C),不要出现 G,嘧啶有利于引物与重组酶形成复合体;RPA 的 3'端最好是 G/C,这样引物与模板的结合更稳定。本研究建立的双重荧光 RPA 方法的引物、探针的设计是依据 Twist Amp™ Basic Kit 中的说明书进行操作,首先找到一对碱基 T,这对 T 碱基被 1~5 个碱基隔开,靠近 5'端 T 碱基被荧光基团取代,3'端 T 碱基被淬灭基团取代,在隔开的中间碱基中挑一个用 THF (tetrahydrofuran) 取代;从 5'端到荧光基团至少 30 个碱基,从 3'到淬灭基团至少 15 个碱基,且 3'端碱基需要被修饰。

虽然双重荧光 RPA 方法还有很多需要改进的地方,但是其不可忽视的特点和优势会使该方法应用前景广阔,对于临床养殖场的病原筛查具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] LIGHTNER D V, REDMAN R M, BELL T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp[J]. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1983, 42(1): 62-70.
- [2] TANG K F, POULOS B T, WANG J, et al. Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates and characteristics of their infection[J]. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2003, 53(2): 91-99.
- [3] TOURTIP S, WONGTRIPOP S, STENTIFORD G D, et al. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): fine structure and phylogenetic relationships[J]. **Journal Invertebrate Pathology**, 2009, 102(1): 21-29.
- [4] JAROENLAK P, BOAKYE D W, VANICHVIRIYAKIT R, et al. Identification, characterization and heparin binding capacity of a sporewall, virulence protein from the shrimp microsporidian, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)[J]. **Parasites and Vectors**, 2018, 11(1): 177.
- [5] TANGPRASITTIPAP A, SRISALA J, CHOUWDEE S, et al. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. **BMC Veterinary Research**, 2013, 9: 139.
- [6] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 体外核酸快速扩增技术的发展和不断创新[J]. **中国生物工程杂志**, 2011, 31(3): 91-96.
- LYU B, CHENG H R, YAN Q F, et al. The development and recent improvements of *in vitro* nucleic acid amplification

- technology[J]. **China Biotechnology**, 2011, 31(3):91-96. (in Chinese)
- [7] 高威芳,朱鹏,黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术:一种新的核酸扩增策略[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 627-634.  
GAO W F, ZHU P, HUANG H L. Recombinase polymerase amplification: a new DNA/RNA amplification strategy[J]. **Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 2016, 32(6): 627-634. (in Chinese)
- [8] PÉREZ R, CALLEROS L, MARANDINO A, et al. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain[J]. **PLoS One**, 2014, 9(11): e111779.
- [9] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications[J]. **Clinical Chemistry**, 2016, 62(7): 947-958.
- [10] 庞建虎, 乔龙亮, 黄海龙, 等. 重组酶聚合酶扩增技术快速检测鳗利斯顿氏菌[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(6): 1056-1063.  
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. (in Chinese)
- [11] 李婷, 杨坤. 等温扩增技术在寄生虫及其他病原体检测中的应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(2): 232-236.  
LI T, YANG K. Application of isothermal amplification technology for pathogen detection in parasitic and other diseases[J]. **Chinese Journal of Schistosomiasis Control**, 2018, 30(2): 232-236. (in Chinese)
- [12] AMER H M, WAHED A A E, SHALABY M A, et al. A new approach for diagnosis of bovine coronavirus using a reverse transcription recombinase polymerase amplification assay[J]. **Journal of Virological Methods**, 2013, 193(2): 337-340.
- [13] 姜一瞳, 王昭华, 鑫婷, 等. 基于重组酶聚合酶扩增技术的犬细小病毒快速检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(10): 926-929.  
JIANG Y T, WANG Z H, XIN T, et al. Development of the recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of canine parvovirus[J]. **Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine**, 2018, 40(10): 926-929. (in Chinese)
- [14] YEHIA N, ARAFA A S, WAHED A A E, et al. Development of reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for avian influenza H5N1 HA gene detection[J]. **Journal of Virological Methods**, 2015, 223: 45-49.
- [15] BONAMI J R, TRUMPER B, MARI J, et al. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps[J]. **Journal of General Virology**, 1990, 71(11): 2657-2664.
- [16] JIN M, GUO X, WANG X W, et al. Development of a novel filter cartridge system with electropositive granule media to concentrate viruses from large volumes of natural surface water[J]. **Environmental Science and Technology**, 2014, 48(12): 6947-6956.
- [17] 赵若恒. 虾肝肠胞虫的流行病学及防控药剂的筛选和效果的研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2020.
- [18] BIJU N, SATHIYARAJ G, RAJ M, et al. High prevalence of *Enterocytozoon hepatopenaei* in shrimps *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* sampled from slow growth ponds in India[J]. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2016, 120(3): 225-230.
- [19] 张娜, 谢艳辉, 刘建芳, 等. 我国出口澳大利亚生虾产品技术贸易措施分析及对策研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8173-8179.  
ZHANG N, XIE Y H, LIU J F, et al. Analysis and countermeasure research on technical trade measures of raw shrimp products exported to Australia[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2020, 11(22): 8173-8179. (in Chinese)
- [20] 王金凤, 张若曦, 刘立兵, 等. 猪瘟病毒重组酶聚合酶扩增检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(6): 687-693.  
WANG J F, ZHANG R X, LIU L B, et al. Rapid and simple detection of classical swine fever virus by reverse transcription



- recombinase polymerase amplification assay[J]. **Chinese Veterinary Science**, 2019, 49(6): 687-693. (in Chinese)
- [21] 万文妍, 刘延珂, 吴艳阳, 等. 禽腺病毒血清 4 型 RPA-LFD 快速检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(1): 41-45.
- WAN W Y, LIU Y K, WU Y Y, et al. Rapid detection of fowl adenovirus serotype 4 by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick[J]. **Chinese Journal of Veterinary Science**, 2019, 39(1): 41-45. (in Chinese)
- [22] 杨洋, 秦晓东, 宋一鸣, 等. 口蹄疫病毒 real-time RT-RPA 检测方法的建立与应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(9): 172-176.
- YANG Y, QIN X D, SONG Y M, et al. Establishment and application of real-time RT-RPA for rapid detection foot-and-mouth disease virus[J]. **Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine**, 2017(9): 172-176. (in Chinese)
- [23] 胡吉卉, 李正民, 段健诚, 等. 虾类肝肠胞虫流行病学研究进展[J]. 水产养殖, 2020, 41(11): 1-4.
- HU J H, LI Z M, DUAN J C, et al. Advances in epidemiological studies of *Enterocytozoon hepatopenaei* cysts in shrimp[J]. **Journal of Aquaculture**, 2020, 41(11): 1-4. (in Chinese)
- [24] 吴思思, 金立方, 余招锋. 南美白对虾桃拉病毒和白斑病毒多重 PCR 检测体系的建立[J]. 农业与技术, 2012, 32(10): 81-83.
- [25] 庞建虎, 乔龙亮, 朱鹏, 等. 核酸等温扩增技术在水产病原体快速检测中的应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2018, 47(5): 530-540.
- PANG J H, QIAO L L, ZHU P, et al. Application of isothermal nucleic acid amplification technologies in rapid detection of aquatic pathogens[J]. **Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)**, 2018, 47(5): 530-540. (in Chinese)
- [26] LIU H B, ZANG Y X, DU X J, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella bacteria*[J]. **Journal of Dairy Science**, 2017, 100(9): 7016-7025.
- [27] YANG H L, WEI S, GOONERATNE R, et al. Development of a recombinase polymerase amplification assay for *Vibrio parahaemolyticus* detection with an internal amplification control[J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 2018, 64(4): 223-230.