

重组酶聚合酶扩增结合电化学 DNA 传感器检测日本血吸虫方法的建立

邓王平¹, 徐斌¹, 洪清华², 王盛琳¹, 吕超¹, 李银龙¹, 宋世平³, 陈军虎¹, 许静¹,
李石柱¹, 胡薇^{1,2}, 周晓农^{1*}

【摘要】 目的 联合重组酶聚合酶扩增及电化学 DNA 传感器检测技术, 建立一种敏感、特异且简单的日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 核酸检测方法。 **方法** 提取日本血吸虫基因组 DNA, 以 SjR2 基因片段为靶序列, 设计重组酶聚合酶扩增 (RPA) 引物与探针, 与电化学 DNA 传感器 (EC) 检测技术联合, 将探针固定于多通道电极芯片进行界面 RPA 扩增及电化学检测, 建立日本血吸虫核酸等温检测方法。优化 RPA 反应条件, 通过检测 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} ng 日本血吸虫基因组 DNA, 评价 RPA-EC 方法的敏感性; 通过检测 10 ng 日本血吸虫、埃及血吸虫、曼氏血吸虫、卫氏并殖吸虫、大片吸虫及华支睾吸虫的基因组 DNA, 评价 RPA-EC 方法的特异性。取 10 只 6~8 周龄 C57 成年小鼠, 每鼠经腹部贴片感染 40 条日本血吸虫尾蚴, 分别于感染前 (0 d) 和感染后 7、21、35 d 收集尾静脉血清, 验证 RPA-EC 方法检测感染动物动态血清 DNA 中 SjR2 基因片段的可行性。 **结果** RPA-EC 联合检测方法可在 37 ℃、30 min 内完成 SjR2 基因片段的界面快速扩增及检测, 成虫基因组 DNA 的最低检出限可达 10^{-8} ng, 与曼氏血吸虫、埃及血吸虫、卫氏并殖吸虫、大片吸虫及华支睾吸虫基因组 DNA 无交叉反应, 具有较好的特异性。日本血吸虫感染小鼠实验结果显示, RPA-EC 联合检测方法可高敏感检出感染后 7、21、35 d 等不同感染期小鼠血清中的 SjR2 基因片段。 **结论** 本研究所建立的 RPA-EC 联合检测方法敏感性高、特异性好、操作简便, 具有一定的应用前景。

【关键词】 日本血吸虫; 重组酶聚合酶扩增; 电化学 DNA 传感器; 早期检测

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Establishment of the detection method for *Schistosoma japonicum* by recombinase polymerase amplification combined with electrochemical DNA biosensor

DENG Wang-ping¹, XU Bin¹, HONG Qing-hua², WANG Sheng-lin¹, LV Chao¹, LI Yin-long¹,
SONG Shi-ping³, CHEN Jun-hu¹, XU Jing¹, LI Shi-zhu¹, HU Wei^{1,2}, ZHOU Xiao-nong^{1*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Chinese Center for Tropical Diseases Research; WHO Collaborating Center of Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, Shanghai 200025, China; 2 Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 3 Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

【Abstract】 Objective To establish a sensitive, specific and simple nucleic acid detection method for *Schistosoma japonicum* by combining recombinase polymerase reaction (RPA) with electrochemical DNA sensor. **Methods** Genomic DNA of *S. japonicum* adult worms was extracted. Applying the SjR2 gene fragment as the target sequence, primers and probe were designed for recombinase polymerase amplification (RPA), which was then combined with

基金项目: 国家科技重大专项 (No. 2018ZX10101002-002, No. 2018ZX10004222-004); 第 60 批中国博士后科学基金面上资助 (No. 2016M600111)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 国家热带病研究中心, 世界卫生组织热带病合作中心, 科技部国家级热带病国际联合研究中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025; 2 复旦大学生命科学学院微生物学与微生物工程系, 上海 200043; 3 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800

作者简介: 邓王平 (1984-), 女, 博士, 助理研究员, 从事血吸虫病诊断及分子流行病学研究。E-mail: dengwp@nippd.chinacdc.cn

* 通讯作者, 周晓农, E-mail: zhouxn1@chinacdc.cn

网络出版时间: 2020-04-10 17:06

网络出版路径: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1248.R.20200410.1432.006.html>

electrochemical DNA sensor(EC) technique; the probe was immobilized on the multi-channel electrode chips for interfacial RPA amplification and electrochemical detection, thus establishing the isothermal detection method (RPA-EC) for *S. japonicum* nucleic acid. The RPA reaction conditions were optimized and the sensitivity of the RPA-EC method was tested by detecting 10^{-4} ng, 10^{-5} ng, 10^{-6} ng, 10^{-7} ng and 10^{-8} ng of *S. japonicum* genomic DNA. The specificity of the RPA-EC method was evaluated by detecting 10 ng of genomic DNA of *S. japonicum*, *S. haematobium*, *Paragonimus westermani*, *Fasciola gigantica* and *Clonorchis sinensis*. To verify the feasibility of the RPA-EC method to detect the dynamic changes of the *SjR2* gene fragment in sera, 10 adult C57 mice aged 6 to 8 weeks were each infected with 40 *S. japonicum* cercariae by abdominal challenge, and serum samples were collected on days before infection (0 d), and 7, 21 and 35 after infection. **Results** The RPA-EC assay could complete the amplification and detection of *SjR2* fragment within 30 min at 37 °C, and the lower detectable limit for *SjR2* fragment in adult *S. japonicum* genomic DNA could be 10^{-8} ng. In addition, there was no cross-reaction with the genomic DNA of *S. mansoni*, *S. haematobium*, *P. westermani*, *F. gigantica* and *C. sinensis*, suggesting a high specificity. It is of note, the results of animal experiments showed that the RPA-EC assay could sensitively detect the *SjR2* gene fragment in the sera of mice on day 7, 21 and 35 post infection. **Conclusion** The RPA-EC combinational detection method established in this study exhibits high sensitivity and good specificity, and is easy to operate, showing the potential for future application.

[Key words] *Schistosoma japonicum*; Recombinase polymerase amplification; Electrochemical DNA sensor; Early detection

Supported by the National Science and Technology Major Projects (No. 2018ZX10101002-002, No. 2018ZX10004222-004) and the 60th Batch of General Financial Grant from the China Postdoctoral Science Foundation (No. 2016M600111)

* Corresponding author, E-mail: zhoun1@chinaadec.cn

血吸虫病是一种危害严重的人兽共患寄生虫病^[1-2]。经过 70 年的积极防治, 当前我国血吸虫病防治工作已进入消除的关键阶段, 流行区居民和家畜的血吸虫感染率及感染度均下降至历史极低水平, 全国已连续 4 年未发现镜检感染血吸虫 (*Schistosoma*) 阳性钉螺, 上述现状对血吸虫病诊断及监测技术提出了更高的要求^[3-6]。与此同时, 我国采用的免疫学及病原学诊断技术的弊端日益明显, 无法满足低流行态势下血吸虫病疫情监测需求^[7-9]。检测血吸虫核酸序列的分子诊断方法因其敏感性高、特异性强等优势, 有望为血吸虫病疫情的精准监测提供有效的技术手段^[10-13]。

近年来, 已有许多日本血吸虫 (*S. japonicum*) 核酸检测方法的相关报道, 包括 PCR^[14]、巢式 PCR^[15]、实时定量 PCR^[16-17]、数字 PCR^[18-19]、环介导等温扩增 (loop mediated isothermal amplification, LAMP)^[20-21]、重组酶聚合酶等温扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)^[22-23]及重组酶介导的等温扩增 (recombinase aided amplification, RAA)^[24-26]等, 检测靶标主要是日本血吸虫基因组 DNA 中的非长末端重复序列反转录转座子 *SjR2* 基因, 该靶标在基因组 DNA 中的拷贝数高, 为日本血吸虫特异片段, 具有良好的检测潜力。RPA 和 RAA 技术是近年来备受关注且迅速发展的等温扩

增技术, 25~43 °C 恒温下 5~20 min 可将核酸扩增至可检测水平, 操作简单、快速, 且可结合多种方法读取结果, 尤其适合基层应用。然而目前报道的基于 RPA 或 RAA 的日本血吸虫核酸检测方法的敏感性仍不够理想。

电化学生物传感器是新型的生物分子检测技术, 其将生物分子识别过程转换为电信号进行检测, 具有操作简单、快速、灵敏, 对样品要求低等特点, 且易于微型化及集成化, 具备现场分析生物分子的潜力^[27-29]。为提高血吸虫核酸检测敏感性及其特异性, 本研究以 *SjR2* 基因片段为靶序列, 将探针固定于电极芯片界面以构建电化学 DNA 传感器 (electrochemical DNA sensor, EC), 界面上 RPA 扩增形成的生物素标记双链 DNA 与链霉亲和素-多聚辣根过氧化物酶偶联物 (streptavidin poly-horseradish peroxidase conjugate, SA-Poly-HRP) 结合, 通过检测 SA-Poly-HRP 催化底物的还原电流实现信号采集, 以此建立 RPA 结合 EC 的组合检测方法, 并对其敏感性、特异性以及检测血吸虫早期感染的可行性进行评价, 以期日本血吸虫感染检测提供新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 寄生虫虫体样品、实验动物来源

日本血吸虫阳性钉螺及尾蚴、曼氏血吸虫 (*S. mansoni*) 成虫、埃及血吸虫 (*S. haematobium*) 虫卵、卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) 囊蚴、华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*) 成虫及大片吸虫 (*Fasciola gigantica*) 成虫由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所提供。6~8 周龄 C57 成年小鼠, 购自上海杰思捷实验动物有限公司 [动物生产许可证号为: SCXK (沪) 2018-0004]。

1.2 主要试剂和仪器

组织 DNA 抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 血清循环 DNA 抽提试剂盒购自美国 Omega 公司, RPA 扩增试剂盒购自英国 TwistDx 公司, 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、N-N 羟基琥珀酰亚胺、牛血清白蛋白、酪蛋白均购自美国 Sigma 公司, SA-Poly-HRP 购自美国 Fitzgerald 公司, 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 购自美国 Neogen 公司。16 通道电化学仪及电极芯片为浙江纳智汇生物科技有限公司产品。

1.3 日本血吸虫感染小鼠模型的建立

10 只小鼠每鼠经腹部贴片感染 40 条日本血吸虫尾蚴, 分别于感染前 (0 d) 和感染后 7、21、35 d 收集各鼠血清 50 μ l, 制备混合血清样品。于感染后 42 d 剖杀小鼠, 收集日本血吸虫成虫。所有样品置-20 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

1.4 引物及探针设计

以 *SjR2* 基因片段 (GenBank 登录号为 AF412221) 为靶序列, 参考文献 [22], 设计 RPA 引物及探针。上游引物为 5'-CCCAAGTCTCAGT-GAAGTTGTGAAGGCTAT-3', 下游引物为 5'-GT-TAGTGTTCGAGACCACTCAGATGGGATT-3' (5'端生物素化), 探针序列为 NH₂-CTTAAAGCGAGGGA-GAGCGGCAGGACCAGATG [THF]ATTGACCCCTGAGATAT-ph (5'端氨基修饰), [THF] 是四氢呋喃的缩写, 为核酸外切酶的识别位点; ph 代表磷酸基团, 用以阻断 DNA 链的延伸。所有引物及探针 DNA 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.5 寄生虫组织基因组 DNA、感染小鼠血清循环 DNA 提取

采用组织 DNA 抽提试剂盒提取日本血吸虫成虫、曼氏血吸虫成虫、埃及血吸虫虫卵、卫氏并殖吸虫囊蚴、华支睾吸虫成虫及大片吸虫成虫的基因组 DNA; 采用血清循环 DNA 抽提试剂盒提取小鼠感染日本血吸虫前和感染后 7、21、35 d 血清中的循环 DNA。

1.6 RPA-EC 检测方法的建立

1.6.1 RPA-EC 电化学传感界面的构建 采用循环伏安法对印刷电极表面进行清洗及活化扫描, 滴加 10 μ l 含 400 mmol/L 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺及 100 mmol/L N-N 羟基琥珀酰亚胺的混合溶液^[30], 室温活化 15 min。之后滴加 10 μ l 探针溶液 (1 μ mol/L) 于电极表面, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 用 0.01 mmol/L PBS 洗涤电极表面。滴加 50 μ l 含 1% 牛血清白蛋白及 1% 酪蛋白的封闭液, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 4 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

1.6.2 界面 RPA 反应 参照 RPA 扩增试剂盒说明书, 配置 RPA 反应体系: 模板 DNA 1.0 μ l, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 2.1 μ l, 缓冲液 29.5 μ l, ddH₂O 12.8 μ l, 醋酸镁 2.5 μ l (最后加入)。空白对照组使用同体积的 ddH₂O 代替模板 DNA。取 10 μ l RPA 混合液滴加于固定了探针的电极界面上, 37 $^{\circ}$ C 反应 10~50 min。采用 0.01 mmol/L PBS 冲洗电极后滴加 5 μ l 的 SA-PolyHRP (1 μ g/ml) 于电极表面, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗。

1.6.3 电流信号采集 滴加 TMB 溶液到印刷电极上, 用 16 通道电化学仪检测, 分别进行循环伏安曲线及电流时间曲线扫描, 扫描电压为-100 mV, 记录 100 s 的稳态电流值为检测信号

1.7 RPA-EC 检测可行性评价及检测时间优化

选取 37 $^{\circ}$ C、50 min 为初始反应条件, 分别以 1 fg、1 pg、1 ng 日本血吸虫基因组 DNA 和 1 ng 曼氏血吸虫基因组 DNA 为模板, 设空白对照组双蒸水, 进行电化学传感界面上 *SjR2* 基因片段的 RPA 扩增及检测的可行性分析。以 1 fg 日本血吸虫基因组 DNA 为模板, 分别设置 10、20、30、40、50 min 的反应时间, 以优化 RPA-EC 最佳反应时间, 每组实验重复 3 次。

1.8 RPA-EC 检测敏感性及特异性评价

采用优化后的 RPA 反应条件, 通过检测不同浓度日本血吸虫基因组 DNA (10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ ng) 评价 RPA-EC 方法的检测敏感性。检测相同浓度日本血吸虫、埃及血吸虫、曼氏血吸虫、卫氏并殖吸虫、大片吸虫及华支睾吸虫的基因组 DNA (10 ng), 评价 RPA-EC 方法的特异性。每个浓度设 3 组重复实验。

1.9 RPA-EC 检测日本血吸虫感染小鼠动态血清 DNA 的效果评价

采用优化后 RPA 反应条件, 对小鼠感染日本血吸虫前和感染后 7、21、35 d 的血清 DNA 进行 RPA-EC 检测, 评价该方法检测动物动态血清 DNA

的可行性, 每组实验重复 3 次。

1.10 伦理批准和患者知情同意

动物实验获得中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所动物实验伦理审查委员会批准 (伦理批准号为 IPD-2019-18)。本研究不涉及患者知情同意。

2 结果

2.1 RPA-EC方法的建立及检测时间优化

37 ℃、50 min 条件下, 建立的 RPA-EC 方法可高敏感检出 1 fg、1 pg、1 ng 日本血吸虫基因组 DNA, 电流信号分别为 (13 713.3 ± 662.7)、(15 396.7 ± 194.3)、(16 026.7 ± 310.1) nA; 双蒸水、1 ng 曼氏血吸虫 DNA 组的电流信号分别为 (232.0 ± 82.2)、(212.3 ± 60.7) nA (图 1)。日本血吸虫 DNA 组电流信号与双蒸水组电流信号差异有统计学意义 ($t = 35.0$, $P < 0.01$), 与曼氏血吸虫组电流信号差异有统计学意义 ($t = 35.1$, $P < 0.01$)。

37 ℃条件下, RPA 扩增 10、20、30、40、50 min 时, 1 fg 基因组 DNA 组的电流信号分别为 (331.5 ± 55.9)、(1 125.0 ± 18.4)、(3 648.5 ± 249.6)、(6 411.0 ± 131.5)、(13 415.0 ± 586.9) nA, 双蒸水组电流信号分别为 (87.0 ± 36.8)、(189.0 ± 24.0)、(227.0 ± 46.7)、(257.0 ± 38.2)、(277.5 ± 33.2) nA, DNA 组电流信号随扩增时间延长逐渐增强, 50 min 时 DNA 组阳性信号达最高, 不同时间组阳性电流信号差异有统计学意义 ($F = 350.9$, $P < 0.01$)。空

白对照组信号随扩增时间无明显增加, 维持在 300 nA 以下。20 min 后检测电流信噪比 (DNA 组与双蒸水组信号比值) 明显提高, 50 min 时信噪比最高, 但信号稳定性较差 (图 2)。从反应稳定性及时效性考虑, 对于低浓度模板检测, 选择 37 ℃、反应 30 min 作为 RPA-EC 法的最佳反应条件。

2.2 RPA-EC检测日本血吸虫基因组DNA的敏感性 & 特异性评价

37 ℃、30 min 条件下, 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} ng 日本血吸虫基因组 DNA 基于 RPA-EC 方法获取的电流信号分别为 (5 779.5 ± 137.5)、(3 504.5 ± 419.5)、(2 372.0 ± 213.0)、(815.0 ± 43.0)、(392.5 ± 6.5) nA (图 3), 检测电流信号随 DNA 模板量增加而梯度增强。将双蒸水组电流信号平均值 (227.5 nA) 与其 3 倍标准差的和设为阳性阈值 (cut off 值 = 268 nA) RPA-EC 对日本血吸虫基因组 DNA 的最低检出限可达 10^{-8} ng (10 ag)。

37 ℃、30 min 条件下, 10 ng 日本血吸虫、埃及血吸虫、曼氏血吸虫、卫氏并殖吸虫、大片吸虫及华支睾吸虫基因组 DNA 基于 RPA-EC 方法获取的电流信号分别为 (18 757.5 ± 265.5)、(230.5 ± 24.6)、(378.5 ± 2.5)、(482.0 ± 9.0)、(327.0 ± 29.0)、(264.0 ± 31.0) nA (图 4)。其中日本血吸虫组检出较强信号; 其他虫种组电流信号非常弱, 与空白对照组电流信号 [(222.5 ± 19.5) nA] 差异较小; RPA-EC 检测特异性较好。

2.3 RPA-EC检测日本血吸虫感染小鼠动态血清 DNA 效果评价

37 ℃、30 min 条件下, 小鼠感染日本血吸虫前

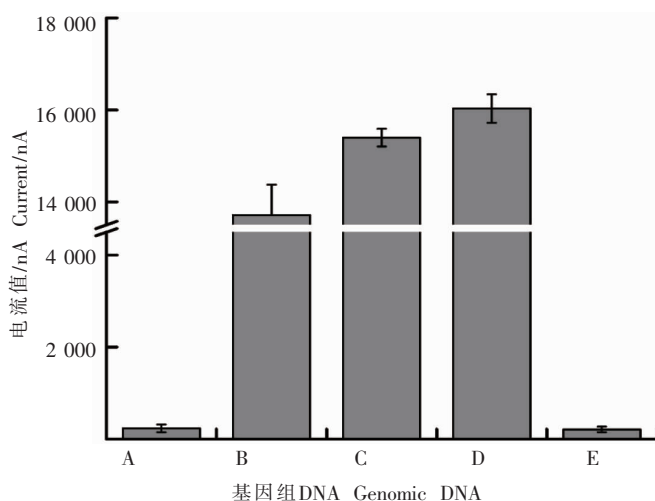


图1 RPA-EC检测日本血吸虫基因组DNA的可行性分析
A: 双蒸水; B: 1 fg日本血吸虫基因组DNA; C: 1 pg日本血吸虫基因组DNA; D: 1 ng日本血吸虫基因组DNA; E: 1 ng曼氏血吸虫基因组DNA

A: ddH₂O; B: 1 fg of *S. japonicum* genomic DNA (SjgDNA); C: 1 pg of SjgDNA; D: 1 ng of SjgDNA; E: 1 ng of SmgDNA

图1 RPA-EC检测日本血吸虫基因组DNA的可行性分析

Fig. 1 Analysis of feasibility of the RPA-EC assay for detecting *Schistosoma japonicum* genomic DNA

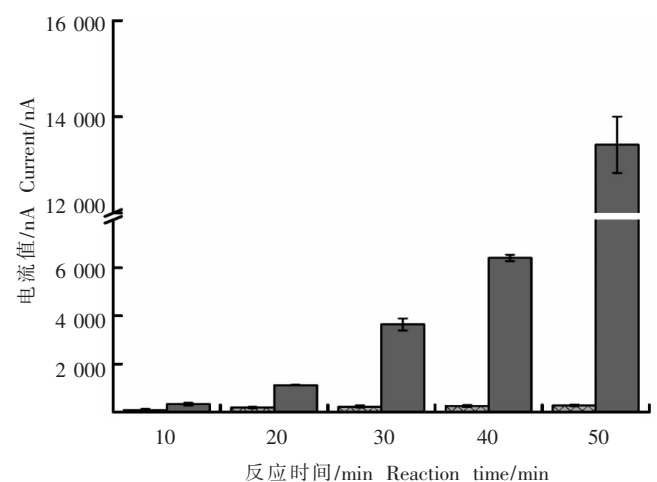


图2 RPA-EC检测日本血吸虫基因组DNA的反应时间优化

Fig. 2 Optimization of the reaction time of RPA-EC for detecting *Schistosoma japonicum*

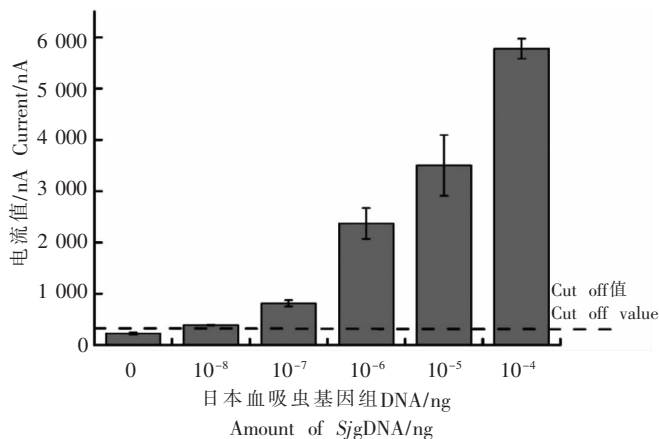
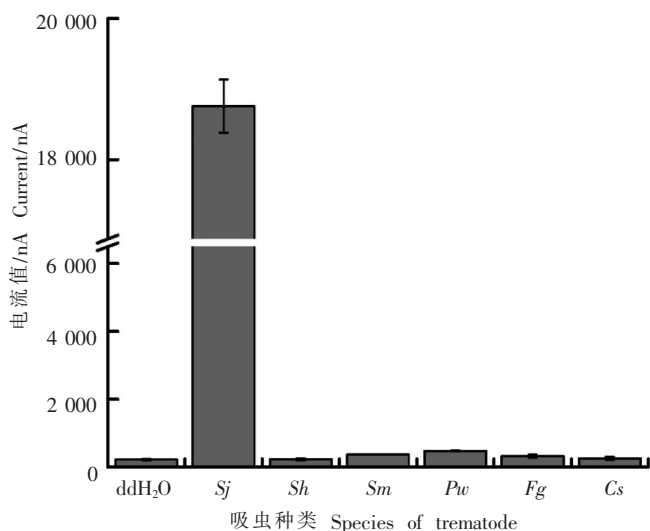


图3 RPA-EC检测日本血吸虫基因组DNA的敏感性评价
Fig. 3 Evaluation of sensitivity of RPA-EC in detecting different concentrations of *S. japonicum* genomic DNA



Sj: 日本血吸虫 *S. japonicum*; Sh: 埃及血吸虫 *S. haematobium*; Sm: 曼氏血吸虫 *S. mansoni*; Pw: 卫氏并殖吸虫 *Paragonimus westermani*; Fg: 大片吸虫 *Fasciola gigantica*; Cs: 华支睾吸虫 *Clonorchis sinensis*

图4 RPA-EC检测多种吸虫基因组DNA的特异性评价
Fig. 4 Evaluation of the specificity of RPA-EC assay in detecting genomic DNA from various trematode species

和感染后 7、21、35 d 的血清 DNA 基于 RPA-EC 方法获取的电流信号分别为 (655.5 ± 24.5)、(7708.5 ± 197.5)、(6723.5 ± 129.5)、(8389.5 ± 239.5) nA (图 5)。感染后 35 d 组电流信号最高, 其次为感染后 7 d 组, 感染后 21 d 组电流信号最低, 3 个时间点的电流信号差异具有统计学意义 ($F = 55.8$, $P < 0.01$)。将 0 d 组电流平均值与其 3 倍标准偏差的和设为阳性阈值 (cut off 值 = 729 nA) 时, 感染 7、21、35 d 组电流信号均大于阈值, 说明 RPA-EC 可检出感染后 7、21、35 d 血清中 *Sj*R2 DNA 片段。

3 讨论

血吸虫病诊断在防治过程中始终处于中心位

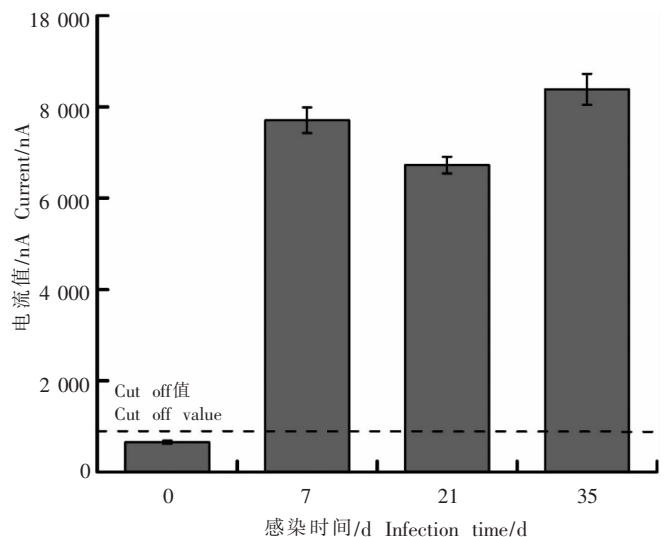


图5 RPA-EC检测不同感染时间小鼠动态血清DNA的结果
Fig. 5 Detection of the *Sj*R2 gene fragment by RPA-EC in the sera of mice with *S. japonicum* infection for different times

置, 可用于确定化疗对象、评价防治效果以及传播控制或阻断后监测等^[31-32]。当前我国血吸虫病防治工作已进入传播阻断与消除阶段, 流行区血吸虫感染率及感染度显著下降。传统的病原学诊断方法对低感染度患者的检测敏感性较低, 漏检率高, 且费时、费力, 群众依从性不高。血清学抗体检测方法敏感性高, 操作简便, 已广泛应用于对流行区化疗对象的大规模筛查和血清流行病学调查, 但易出现假阳性, 且抗体水平检测难以区分现症感染和既往感染^[7]。

近年来检测血吸虫核酸序列的分子诊断方法逐渐受到关注, 研究者们发展了多种灵敏且特异的核酸检测方法, 展示了核酸检测在血吸虫低度感染、早期感染及现症感染检测中的应用前景^[20]。这些方法大多基于 PCR, 部分基于等温扩增技术。近期, 王盛琳^[33]等应用价值 Meta 分析关于日本血吸虫核酸检测技术的诊断, 结果提示, 等温扩增技术的诊断效能优于依赖变温扩增设备的 PCR 类技术; 而等温扩增技术中, RPA 具有明显的诊断优势。但该技术若用于现场仍存在的问题, 如 Sun 等^[22]利用 RPA 技术结合侧流层析试纸条检测日本血吸虫基因组 DNA 中 *Sj*R2 片段的检测限可达 5 fg, 但该方法需对样品进行稀释处理, 操作过程中易产生污染。Xing 等^[23]建立的实时定量 RPA 技术在 15 min 内检测日本血吸虫基因组中 *Sj*R2 DNA 的敏感性可达 0.9 fg, 但需借助荧光检测设备。赵松等^[24,26]和李婷等^[25]建立的 RAA 结合电泳法检测基因组中 *Sj*R2 的敏感性为 0.5 ng, 结合荧光法检测使敏感性提高了 2 个数量级, 但相对已建立的 RPA 方法, 敏感性仍

不够理想。综上,今后仍需探索更加灵敏的检测技术与 RPA 结合,从而提高核酸检测敏感性及其特异性,并通过简化设备及操作,提高检测时效性及重复性,使之更适于现场应用。

本研究探索了重组酶聚合酶等温扩增技术与电化学 DNA 传感器结合用于日本血吸虫核酸快速敏感检测的可行性,建立的 RPA-EC 检测方法,采用敏感性及其特异性均较好的 *SjR2* 片段作为靶标,通过设计修饰引物及探针,实现了界面上 RPA 的可控反应,且有望通过控制反应时间对低浓度核酸进行定量检测。此方法在界面上进行 RPA 反应,其反应速率降低,但扩增特异性及稳定性提高。采用生物素-亲和素放大及 HRP 聚合酶放大技术进一步提高了电化学检测的敏感性。本方法可在 37 °C 甚至室温下进行,反应 10 min 即可检出阳性信号,30 min 内可检出 10 ag 日本血吸虫基因组 DNA 中的 *SjR2* 片段,相比之前报道的 RPA 检测方法敏感性提高了 2 个数量级^[22-23],且与其他相关吸虫基因组 DNA 不存在交叉反应,具有较理想的日本血吸虫核酸检测特异性。本方法借助于小型的多通道电化学仪及配套电极芯片,可在较短时间内实现多个样品的 RPA 扩增及检测,提高了检测时效性。

本研究建立的 RPA-EC 法可成功检出经 40 条日本血吸虫尾蚴感染后 7、21、35 d 的小鼠血清 DNA 样品中的 *SjR2* 片段,显示了该方法用于血清等复杂样品中痕量血吸虫循环核酸检测的可行性及优良性能,同时提示该方法用于血吸虫早期(童虫期)、中期(未产卵成虫期)及后期(产卵期)感染宿主血清 DNA 检测的潜在应用价值。

本研究中采用的电化学 DNA 传感器灵敏度高,且具有操作简单、成本低廉等优势,通过与 RPA 技术的结合将更具现场应用前景。然而,RPA-EC 法若要用于现场仍需进一步改善,例如目前仍需要借助小型电化学仪进行检测,后期可探索采用集成的手持智能电化学仪实现现场检测。其次,本方法敏感性虽高,但却增加了假阳性出现的概率,从技术操作和实验环境等方面降低假阳性率是一个很关键的问题。另外,该方法在血吸虫感染钉螺及低度感染宿主检测中的应用潜力仍值得进一步探讨。

出版授权 作者同意以纸质版和网络版的形式同时出版。

数据和材料的可及性 可以向同行提供本研究中的相关材料与数据。如有需要,请与邓王平联系。

利益冲突 作者声明无利益冲突。

作者贡献 邓王平完成实验设计、数据分析及论文撰写;徐斌、洪清华参与动物实验及样本采集与处理,王盛琳、吕超及李银龙协助实验数据收集及分析,宋世平提供电化学检测技术支持,李石柱、许静及陈军虎提供项目协调支持与论文修改指导,周晓农及胡薇指导实验设计、实施及论文修改。

参 考 文 献

- [1] Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, *et al.* Human schistosomiasis[J]. *Lancet*, 2014, 383(9936): 2253-2264.
- [2] McManus DP, Dunne DW, Sacko M, *et al.* Schistosomiasis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 13-33.
- [3] Zhou XN. Implementation of precision control to achieve the goal of schistosomiasis elimination in China [J]. *Chin J Schisto Control*, 2016, 28(1): 1-4. (in Chinese)
(周晓农. 开展精准防治实现消除血吸虫病的目标[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2016, 28(1): 1-4.)
- [4] Lv S, Xu J, Cao CL, *et al.* China fighting against schistosomiasis for 70 years: progress and experience[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2019, 37(5): 514-519. (in Chinese)
(吕山, 许静, 曹淳力, 等. 我国血吸虫病防治 70 年历程与经验[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(5): 514-519.)
- [5] Xu J, Lv S, Cao CL, *et al.* Progress and challenges of schistosomiasis elimination in China [J]. *Chin J Schisto Control*, 2018, 30(6): 605-609. (in Chinese)
(许静, 吕山, 曹淳力, 等. 我国血吸虫病消除工作进展及面临的挑战 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30 (6): 605-609.)
- [6] Zhang LJ, Xu ZM, Guo JY, *et al.* Endemic status of schistosomiasis in People's Republic of China in 2018 [J]. *Chin J Schisto Control*, 2019, 31(6): 576-582. (in Chinese)
(张利娟, 徐志敏, 郭婧怡, 等. 2018 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(6): 576-582.)
- [7] Zhang JF, Xu J, Bergquist R, *et al.* Development and application of diagnostics in the national schistosomiasis control programme in the People's Republic of China[J]. *Adv Parasitol*, 2016, 92: 409-434.
- [8] Bergquist R, Zhou XN, Rollinson D, *et al.* Elimination of schistosomiasis: the tools required[J]. *Infect Dis Poverty*, 2017, 6 (1): 158-166.
- [9] Li SZ, Xu J, Lv S, *et al.* Interpretation of the three-year tough action plan for endemic diseases control (2018-2020): schistosomiasis [J]. *Chin J Schisto Control*, 2018, 30 (6): 601-604. (in Chinese)
(李石柱, 许静, 吕山, 等. 《地方病防治专项三年攻坚行动方案(2018-2020 年)》解读: 血吸虫病[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(6): 601-604.)
- [10] Weerakoon KG, Gordon CA, McManus DP. DNA diagnostics for schistosomiasis control [J]. *Trop Med Infect Dis*, 2018, 3 (3): 81-100.
- [11] He P, Song LG, Xie H, *et al.* Nucleic acid detection in the diagnosis and prevention of schistosomiasis [J]. *Infect Dis Poverty*, 2016, 5: 25-35.
- [12] Weerakoon KG, McManus DP. Cell-free DNA as a diagnostic tool for human parasitic infections[J]. *Trends Parasitol*, 2016, 32(5): 378-391.
- [13] Qin ZQ. Strengthening the development and application of molecular diagnostic techniques to facilitate precision schistosomiasis control in China [J]. *Chin J Schisto Control*, 2019, 31(2): 105-106. (in Chinese)

- (秦志强. 加强分子诊断方法的研发应用助力我国精准血防 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(2): 105-106.)
- [14] Chen JH, Wen LY, Zhang XZ, *et al.* Development of a PCR assay for detecting *Schistosoma japonicum*-infected *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(3): 204-207. (in Chinese)
(陈军虎, 闻礼永, 张旭照, 等. 检测日本血吸虫感染性钉螺 PCR 方法的建立 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(3): 204-207.)
- [15] Zhang X, He CC, Liu JM, *et al.* Nested-PCR assay for detection of *Schistosoma japonicum* infection in domestic animals [J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6(1): 86-92.
- [16] He P, Gordon CA, Williams GM, *et al.* Real-time PCR diagnosis of *Schistosoma japonicum* in low transmission areas of China [J]. Infect Dis Poverty, 2018, 7(1): 8-18.
- [17] Gordon CA, Acosta LP, Gobert GN, *et al.* Real-time PCR demonstrates high prevalence of *Schistosoma japonicum* in the Philippines: implications for surveillance and control [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(1): e0003483.
- [18] Weerakoon KG, Gordon CA, Williams GM, *et al.* Droplet digital PCR diagnosis of human schistosomiasis: parasite cell-free DNA detection in diverse clinical samples [J]. J Infect Dis, 2017, 216(12): 1611-1622.
- [19] Cai PF, Weerakoon KG, Mu Y, *et al.* Comparison of Kato Katz, antibody-based ELISA and droplet digital PCR diagnosis of schistosomiasis *Japonica*: lessons learnt from a setting of low infection intensity [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2019, 13(3): e0007228.
- [20] Xu J, Guan ZX, Zhao B, *et al.* DNA detection of *Schistosoma japonicum*: diagnostic validity of a LAMP assay for low-intensity infection and effects of chemotherapy in humans [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(4): e0003668.
- [21] Qin ZQ, Xu J, Feng T, *et al.* Field evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) platform for the detection of *Schistosoma japonicum* infection in *Oncomelania hupensis* snails [J]. Trop Med Infect Dis, 2018, 3(4): 124-133.
- [22] Sun K, Xing WW, Yu XL, *et al.* Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for rapid and visual detection of *Schistosoma japonicum* [J]. Parasit Vectors, 2016, 9: 476-484.
- [23] Xing WW, Yu XL, Feng JT, *et al.* Field evaluation of a recombinase polymerase amplification assay for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in Hunan Province of China [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 164-170.
- [24] Zhao S, Liu YH, Li T, *et al.* Rapid detection of *Schistosoma japonicum* specific gene fragment by recombinase aided isothermal amplification combined with fluorescent probe [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2019, 37 (1): 23-27. (in Chinese)
(赵松, 刘燕红, 李婷, 等. 结合重组酶介导的核酸等温扩增和荧光探针快速检测日本血吸虫基因片段 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(1): 23-27.)
- [25] Li T, Liu YH, Zhao S, *et al.* Rapid detection of *Schistosoma japonicum*-infected snails with recombinaseaided isothermal amplification assay [J]. Chin J Schisto Control, 2019, 31(2): 109-114, 120. (in Chinese)
(李婷, 刘燕红, 赵松, 等. 重组酶介导的核酸等温扩增荧光法快速检测日本血吸虫感染性钉螺 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(2): 109-114, 120.)
- [26] Zhao S, Li T, Yang K, *et al.* Establishment of a recombinase-aided isothermal amplification technique to detect *Schistosoma japonicum* specific gene fragments [J]. Chin J Schisto Control, 2018, 30(3): 273-277, 306. (in Chinese)
(赵松, 李婷, 杨坤, 等. 重组酶介导的日本血吸虫特异性基因片段核酸等温扩增检测方法的建立 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2018, 30(3): 273-277, 306.)
- [27] Lin MH, Song P, Zhou GB, *et al.* Electrochemical detection of nucleic acids, proteins, small molecules and cells using a DNA-nanostructure-based universal biosensing platform [J]. Nat Protoc, 2016, 11(7): 1244-1263.
- [28] Deng WP, Dou YZ, Song P, *et al.* Lab on smartphone with interfaced electrochemical chips for on-site gender verification [J]. J Electroanal Chem, 2016, 777: 117-122.
- [29] Deng WP, Wang LH, Song SP, *et al.* Biosensors in POCT application [J]. Prog Chem, 2016, 28(9): 1341-1350. (in Chinese)
(邓王平, 王丽华, 宋世平, 等. 生物传感器在 POCT 中的应用研究 [J]. 化学进展, 2016, 28(9): 1341-1350.)
- [30] Deng WP, Xu B, Hu HY, *et al.* Diagnosis of schistosomiasis *Japonica* with interfacial co-assembly-based multi-channel electrochemical immunosensor arrays [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1789.
- [31] Wu GL. Retrospect and prospect of the development of the immune diagnosis of schistosomiasis [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(S1): 323-328. (in Chinese)
(吴观陵. 我国血吸虫病免疫诊断发展的回顾与展望 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(S1): 323-328.)
- [32] Zhu YC. Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review [J]. Acta Trop, 2005, 96(2/3): 130-136.
- [33] Wang SL, Wang LP, Wu LL, *et al.* Diagnostic value of nucleic acid detection in schistosomiasis *Japonica*: a meta-analysis [J]. Chin J Schisto Control, 2020, 32(1): 15-22. (in Chinese)
(王盛琳, 王丽萍, 吴铃铃, 等. 核酸检测技术对日本血吸虫病诊断价值的 meta 分析 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2020, 32(1): 15-22.)

(收稿日期: 2019-12-31 编辑: 杨帆)