

# 基于 RPA-LFD 的日本血吸虫循环核酸快速可视化检测方法的建立及初步评价

邓王平<sup>1</sup>, 洪清华<sup>2</sup>, 徐斌<sup>1</sup>, 王盛琳<sup>1</sup>, 王丽萍<sup>1</sup>, 许静<sup>1</sup>, 胡薇<sup>1,2</sup>, 周晓农<sup>1\*</sup>

**【摘要】 目的** 结合重组酶聚合酶扩增 (RPA) 技术及侧流层析试纸条法 (LFD) 建立日本血吸虫特异核酸片段的快速可视化检测方法, 并初步评价其检测日本血吸虫感染小鼠血清中血吸虫循环核酸的应用价值。 **方法** 以日本血吸虫非长末端重复序列逆转录转座子 SjCHGCS19 为靶标, 设计 RPA 引物和探针, 以日本血吸虫基因组 DNA 为模板进行 RPA 及 LFD 检测, 并优化 RPA 反应温度及时间, 建立日本血吸虫核酸 RPA-LFD 快速可视化检测方法。用 RPA-LFD 检测模板量为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-7}$  ng 的日本血吸虫基因组 DNA, 评价其敏感性; 用 RPA-LFD 方法检测日本血吸虫、埃及血吸虫、曼氏血吸虫、卫氏并殖吸虫及华支睾吸虫基因组 DNA, 评价其特异性。制备含 0.01、0.1、1、10 和 100 ng 日本血吸虫成虫基因组 DNA 的模拟阳性鼠血清。用 40 条日本血吸虫尾蚴感染小鼠, 采集并分离感染前及感染后 7、21、35 d 小鼠尾静脉血清。提取模拟阳性鼠血清、感染小鼠血清样品中的循环 DNA, 评价 RPA-LFD 检测血清中血吸虫特异核酸的可行性及其早期检测价值。 **结果** 建立了快速可视化检测 SjCHGCS19 重复序列的 RPA-LFD 方法, 30~45 °C 反应 10 min 即可检出目的片段。RPA 最优反应条件为 39 °C, 20 min。RPA-LFD 对日本血吸虫成虫基因组 DNA 的最低检出限为  $10^{-6}$  ng (1 fg)。特异性评价结果显示, RPA-LFD 检测曼氏血吸虫和埃及血吸虫基因组 DNA 结果为阳性, 检测卫氏并殖吸虫和华支睾吸虫基因组 DNA 结果为阴性。RPA-LFD 方法可成功检出含 0.01~100 ng 日本血吸虫基因组 DNA 的模拟阳性鼠血清以及血吸虫感染后 7、21、35 d 鼠血清中的游离 SjCHGCS19 DNA 片段。 **结论** 建立了一种快速、可视化检测日本血吸虫循环核酸的 RPA-LFD 方法, 该方法灵敏度高, 具有检测血吸虫早期感染的潜在应用价值。

**【关键词】** 日本血吸虫; 重组酶聚合酶扩增; 侧流层析试纸条; 循环核酸; 可视化检测

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

## Development and preliminary evaluation of a rapid visualization detection method for circulating nucleic acids of *Schistosoma japonicum* based on RPA-LFD

DENG Wang-ping<sup>1</sup>, HONG Qing-hua<sup>2</sup>, XU Bin<sup>1</sup>, WANG Sheng-lin<sup>1</sup>, WANG Li-ping<sup>1</sup>,  
XU Jing<sup>1</sup>, HU Wei<sup>1,2</sup>, ZHOU Xiao-nong<sup>1\*</sup>

(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)

**【Abstract】 Objective** To develop a rapid visualization method for specific nucleic acid fragments of *Schistosoma japonicum* by combining recombinase polymerase amplification (RPA) and lateral flow dipstick (LFD) methods, and evaluate its application value in detecting circulating nucleic acid of *Schistosoma* spp. in infected

**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, 国家卫生健康委员会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 200433

**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@nipd.chinaacdc.cn

\* 通讯作者, 周晓农, E-mail: zhounx1@chinaacdc.cn

网络出版时间: 2020-06-24 11:32

网络出版路径: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1248.R.20200623.1120.002.html>

mouse serum. **Methods** RPA primers and probe were designed to target the *S. japonicum* non-long terminal repeat retrotransposons SjCHGCS19. RPA was performed using *S. japonicum* genomic DNA as the template, and the amplification product was examined by the LFD method. After optimizing the RPA reaction temperature and time, the RPA-LFD assay was established. The sensitivity of RPA-LFD assay was evaluated by detecting  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  ng of *S. japonicum* genomic DNA; and the assay specificity was evaluated by detecting genomic DNA from *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mansoni*, *Paragonimus westermani* and *Clonorchis sinensis*. Mouse dummy positive sera containing 0.01, 0.1, 1, 10 or 100 ng of *S. japonicum* adult worm genomic DNA were prepared, and mouse experiment was conducted by infection with 40 *S. japonicum* cercariae, from which tail vein serum was obtained before infection and on days 7, 21 and 35 after infection. Then, circulating DNA was extracted from mice dummy positive sera and infected mice sera, and examined by the RPA-LFD method, to evaluate the method's feasibility and value of early detection in assaying specific schistosome nucleic acids in serum samples. **Results** The RPA-LFD assay was established to rapidly detect SjCHGCS19 repeat sequence with visualized results. The target fragments could be detected in 10 min, at 30–45 °C. The optimal reaction condition was 39 °C for 20 min. The lowest detectable limit for *S. japonicum* adult worm genomic DNA was  $10^{-6}$  ng (1 fg). Evaluation of the specificity indicated that the RPA-LFD method showed cross-reaction with the genomic DNA of *S. mansoni* and *S. haematobium*, but not with that of *P. westermani* and *C. sinensis*. The RPA-LFD assay was able to detect 0.01–100 ng of schistosome DNA fragment in mice dummy positive sera, and the free SjCHGCS19 DNA fragment in the infected mice sera on days 7, 21 and 35 after infection. **Conclusion** A RPA-LFD method was established for rapid visualizing detection of circulating nucleic acids of *S. japonicum*. This method is highly sensitive and has potential applicability for early detection of schistosome infection.

**[Key words]** *Schistosoma japonicum*; Recombinase polymerase amplification; Lateral flow dipstick; Circulating nucleic acid; Visualization detection

Supported by the National Science and Technology Major Project (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@chinacdc.cn

血吸虫病是一种危害严重的人兽共患寄生虫病<sup>[1-2]</sup>, 流行于全球 78 个国家和地区, 被 WHO 列为极易复现的被忽视热带病之一。中国仅流行日本血吸虫病。经过 70 年的积极防治, 我国血吸虫病感染率及感染度已降低至历史极低水平<sup>[3-4]</sup>。然而, 随着全球一体化进程的提速, 人员流动愈发频繁, 境外输入性血吸虫病病例不断出现, 已成为我国血吸虫病防治工作面临的新挑战及新困难<sup>[5-6]</sup>。新形势下, 现有病原学及免疫学诊断技术在血吸虫检测敏感性、早期检测及输入性血吸虫鉴别检测方面的弊端日趋明显, 尚不足以满足消除阶段对血吸虫病疫情及时、敏感及有效监测的需求<sup>[7-9]</sup>。近年来, 检测血吸虫特异核酸序列的多种分子诊断方法已有诸多报道, 展示了核酸检测在血吸虫感染检测中的应用价值。然而, 这些方法大多基于 PCR<sup>[10]</sup>、巢式 PCR<sup>[11]</sup>、实时定量 PCR<sup>[12-13]</sup>及数字 PCR<sup>[14-15]</sup>等, 在敏感性及特异性方面虽具有优势<sup>[16-19]</sup>, 但因大多依赖昂贵的仪器设备, 具有操作繁琐、耗时较长等缺点, 一定程度上限制了其推广应用, 因此迫切需要探索更为简便的核酸检测方法用于血吸虫病的检测

与监测<sup>[20]</sup>。

重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 技术<sup>[21-22]</sup>及重组酶介导的扩增 (recombinase aided amplification, RAA) 技术<sup>[24-26]</sup>是近年来备受关注且迅速发展的等温扩增技术, 主要依据 T4 噬菌体核酸复制机制, 利用重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶的作用, 实现目的基因在恒温条件 (25~42 °C) 下的快速扩增, 20 min 内即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。目前报道的基于 RPA 或 RAA 的核酸检测方法大多以日本血吸虫非长末端重复序列反转录转座子 (*Schistosoma japonicum* non-long terminal repeat retrotransposons, SjR2) 片段为靶标, 特异性较好, 但敏感性不够, 需借助相应的仪器, 不适宜基层应用。

cDNA 克隆号为 SjCHGCS19 的 DNA 序列是研究者们筛选出的另外一种日本血吸虫非长末端重复序列逆转录转座子片段<sup>[26]</sup>。已有研究显示, 以 SjCHGCS19 为靶标建立的核酸检测方法具有更高的敏感性, 有望用于血吸虫属的特异性检测, 并具有

早期检测的应用前景<sup>[27]</sup>。为实现日本血吸虫循环核酸的敏感及快速检测,本研究以 *SjCHGCS19* 为靶序列,建立一种 RPA 技术和侧流层析试纸条 (lateral flow dipsticks, LFD) 相结合的日本血吸虫核酸快速可视化检测方法 (RPA-LFD),并对其检测日本血吸虫核酸的敏感性、特异性及早期检测可行性进行初步评价。

## 1 材料与方 法

### 1.1 相关寄生虫及实验动物来源

日本血吸虫感染钉螺、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 小鼠购自上海杰斯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

RPA 试剂盒购自英国 TwistDx 公司, LFD 购于德国 Milenia 公司,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,分光光度计 (Nanodrop 2000) 购自美国 Thermo Fisher 公司。水浴锅购自北京长风仪器仪表公司。

### 1.3 小鼠感染日本血吸虫后血样及成虫收集

C57 小鼠随机分为健康对照组及日本血吸虫感染组 (感染组),每组 10 只。感染组每鼠经腹部贴片感染 40 条日本血吸虫尾蚴。经尾静脉采集血吸虫感染前及感染后 7、21 和 35 d 小鼠血样,37 ℃ 静置 2 h,3 000 × g 离心 10 min 收集血清,并制备每个时间点的小鼠混合血清样品。感染后 45 d 安乐死后解剖小鼠,生理盐水灌注门静脉收集成虫。所有样品置 -20 ℃ 保存。

### 1.4 模拟阳性血清制备及各样品 DNA 抽提

将 0.01、0.1、1、10 及 100 ng 日本血吸虫成虫基因组 DNA 分别混入 500 μl 正常小鼠血清中,制备梯度浓度模拟阳性小鼠血清。采用组织 DNA 抽提试剂盒抽提日本血吸虫、曼氏血吸虫、华支睾吸虫成虫,埃及血吸虫卵、卫氏并殖吸虫囊蚴的基因组 DNA;采用血清循环 DNA 抽提模拟阳性血清、血吸虫感染前及感染后 7、21 和 35 d 小鼠血清中的游离 DNA,测定 DNA 浓度后于 -20 ℃ 保存。

### 1.5 RPA-LFD 方法建立

1.5.1 RPA 扩增引物及探针序列 以 *SjCHGCS19* (GenBank 登录号: FN356221) DNA 片段为靶序列,

采用 Primer primer 5 软件结合 BLAST 设计 RPA 引物及探针,扩增产物长度为 183 bp。RPA 上游引物序列为 5'-AAGACAATGAAGAAGGGGATTACAATGAAC-3',下游引物序列为 Biotin-AGTGTGTC-CATTCCGACTTTGGCATTAG;探针序列为 FAM-CT-TAAAGCGAGGGAGAGCGGCAGGACCAGATG [THF] ATTGACCCCTGAGATAT-ph,其中,FAM 为荧光素,THF 为四氢呋喃残基,ph 为磷酸基团。引物及探针均由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

1.5.2 RPA 扩增反应体系优化 参照试剂盒说明书,将上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2.1 μl,探针 (10 μmol/L) 0.6 μl、反应缓冲液 29.5 μl、ddH<sub>2</sub>O 12.2 μl,模板 DNA 1 μl,MgAc<sub>2</sub> 2.5 μl 配置成 50 μl 的混合体系,加至 RPA 反应管溶解冻干粉,充分混匀后于水浴锅中反应,以双蒸水为阴性对照。反应温度设置为 7 个梯度:20、25、30、35、40、45 和 50 ℃,反应扩增时间设置为 7 个梯度:0、5、10、15、20、25 和 30 min,以确定最佳的 RPA 反应温度和时间。

1.5.3 LFD 检测 RPA 扩增产物 将扩增产物稀释 50 倍后,取 10 μl 滴加于试纸条样品垫上,将试纸条样品垫垂直插入 200 μl PBST 中,室温反应 5 min,肉眼观察结果。当试纸条检测线及质控线均出现红色条带,表明 RPA 扩增产物为阳性;若仅质控线显色,表明无目标扩增产物;若质控线未显色,表明 RPA 扩增结果无效。

### 1.6 RPA-LFD 检测敏感性及特异性评价

采用优化确认的 RPA 反应条件,将日本血吸虫基因组 DNA 模板设置为 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> ng 等 7 个浓度梯度,评价 RPA-LFD 方法的敏感性。以曼氏血吸虫、埃及血吸虫、卫氏并殖吸虫、华支睾吸虫基因组 DNA 各 1 ng 为模板,评价 RPA-LFD 方法的特异性。

### 1.7 RPA-LFD 检测小鼠血清中血吸虫循环核酸的效果评价

采用优化的实验条件,对模拟阳性血清 DNA 进行 RPA-LFD 检测,评价该方法检测血清中循环血吸虫核酸的可行性及性能。以血吸虫感染前及感染后 7、21、35 d 的小鼠血清 DNA 作为模板进行 RPA-LFD 检测,评价该方法检测血吸虫感染血清样本中循环核酸的性能,评价其早期检测价值。

### 1.8 伦理批准和患者知情同意

本研究获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),不涉及人的伦理批准和患者知



情同意。

## 2 结 果

### 2.1 RPA-LFD 的最佳反应条件

7 个梯度温度下反应 30 min 质控线均出现条带, 其中 30~45 °C 的检测线条带均较明显, 且 35~40 °C 的检测线条带颜色最深 (图 1A), 表明 30~45 °C 为 RPA 适合反应温度区间, 35~40 °C 为最佳反应温度。选择 RPA 试剂盒推荐的 39 °C 作为后续实验扩增温度。

39 °C 扩增温度条件下, 扩增 10 min 即达到可检出的产物水平; 10~20 min 内, 阳性条带随着反应时间的增加逐渐增强, 20 min 达到饱和 (图 1B)。为满足低浓度模板的检测效率并提高时效性, 同时避免非特异性扩增反应的产生, 选择 20 min 作为后续性能评价的反应时间。

### 2.2 RPA-LFD 检测日本血吸虫基因组 DNA 的敏感性及其特异性

选择 39 °C、20 min 作为 RPA 扩增条件, 用 RPA-LFD 检测日本血吸虫基因组 DNA, 结果显示, 除双蒸水及  $10^{-7}$  ng 组外,  $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$  ng 组均可见明显的检测线条带, 且随模板量增加检测线颜色逐渐加深 (图 2A), RPA-LFD 对日本血吸虫基因组 DNA 的最低检出限为  $10^{-6}$  ng (1 fg)。特异性评价结果显示, RPA-LFD 检测卫氏并殖吸虫和华支睾吸虫基因组 DNA 时未见明显阳性检测线, 检测曼氏血吸虫和埃及血吸虫时均出现明显阳性检测线。(图 2B)。

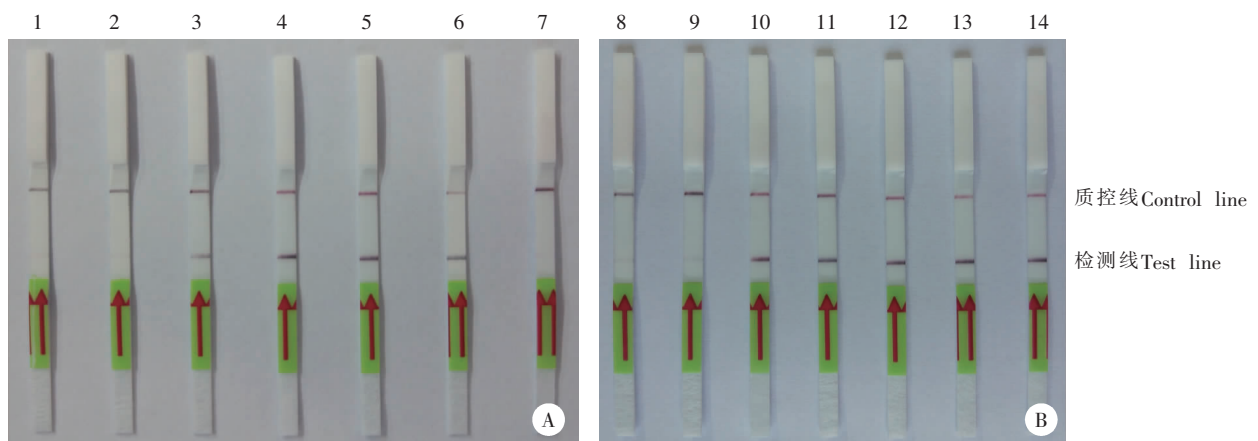
### 2.3 RPA-LFD 检测模拟阳性血清和日本血吸虫感

染鼠血清中循环 DNA 的效果评价

RPA-LFD 检测含 0.01、0.1、1、10 及 100 ng 日本血吸虫基因组 DNA 模拟阳性血清, 试纸条上均出现阳性检测线, 且条带颜色深度随 DNA 含量的增加而增强 (图 3A), 正常血清组未出现阳性检测线。RPA-LFD 检测日本血吸虫感染后 7、21 和 35 d 的小鼠血清 DNA 时, 均出现阳性检测线, 其中感染后 7 和 21 d 的检测线较淡, 35 d 的检测线条带颜色最深, 感染前血清 DNA 组未出现阳性检测线 (图 3B)。

## 3 讨 论

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, 对血吸虫病的诊断及监测技术提出了更高的要求<sup>[29-30]</sup>。新形势下, 急需发展更加敏感、快速的血吸虫病检测及监测技术<sup>[7]</sup>。核酸检测因具有灵敏度高、特异性强等优点, 在血吸虫早期感染、低度感染检测中具备较高的应用价值<sup>[31]</sup>。目前核酸检测方法主要有基于 PCR 的变温扩增技术及等温扩增技术两类。近期, 王盛琳等<sup>[32]</sup>关于日本血吸虫核酸检测技术的诊断应用价值 Meta 分析结果显示, 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; 等温扩增技术中, RPA 又具有明显的诊断优势。近年已有应用 RPA 检测日本血吸虫、曼氏血吸虫<sup>[33]</sup>、埃及血吸虫<sup>[34]</sup>核酸的相关报道。Sun 等<sup>[21]</sup>利用 RPA 技术结合 LFD 检测日本血吸虫基因组 DNA 中 *SjR2* 片段的检测限可达 5 fg。Xing 等<sup>[22]</sup>建立的实时 RPA 技术在 15 min 内检测日本血吸虫基

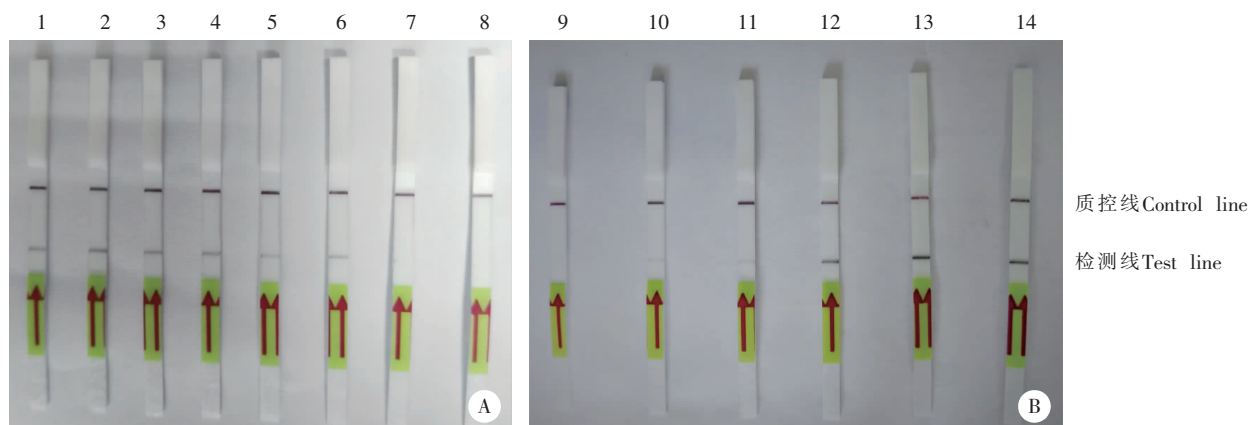


A: 不同反应温度的检测结果; B: 不同反应时间的检测结果。1~7: 反应温度分别为 20、25、30、35、40、45 和 50 °C; 8~14: 反应时间分别为 0、5、10、15、20、25 和 30 min

A: The detection results at different reaction temperatures; B: The detection results after different reaction times. 1~7: Reaction temperature of 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 °C, respectively; 8~14: Reaction time of 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min, respectively

图1 RPA-LFD检测日本血吸虫基因组DNA的反应条件优化

Fig. 1 Optimization of the reaction conditions of RPA-LFD assay for *S. japonicum* genomic DNA

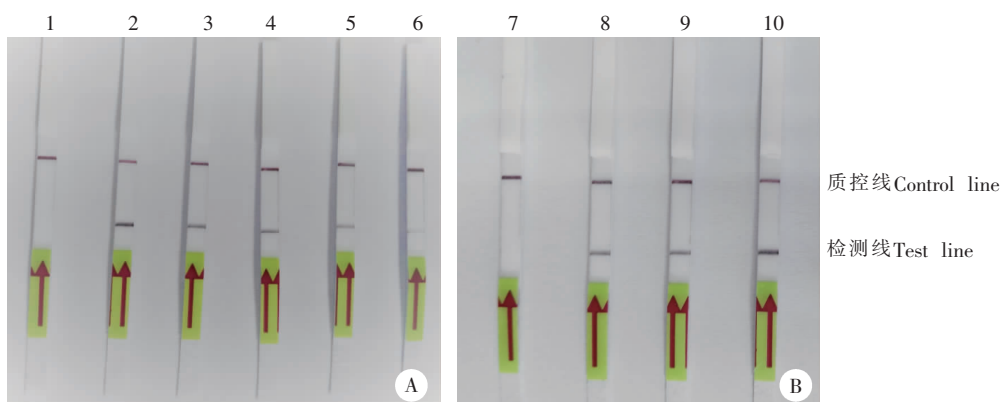


A: RPA-LFD检测梯度浓度日本血吸虫基因组DNA结果; B: RPA-LFD检测多种吸虫基因组DNA结果。1~7: 分别为 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 和 $10^{-7}$  ng日本血吸虫基因组DNA; 8、9: 双蒸水; 10~14: 分别为1 ng的华支睾吸虫、卫氏并殖吸虫、埃及血吸虫、曼氏血吸虫和日本血吸虫基因组DNA

A: Results of RPA-LFD assay for detecting gradient concentrations of *S. japonicum* genomic DNA; B: Results of RPA-LFD assay for detecting genomic DNA from different trematodes. 1~7: The amount of *S. japonicum* genomic DNA was  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  ng, respectively; 8, 9: ddH<sub>2</sub>O; 10~14: Genomic DNA (1 ng) from *C. sinensis*, *P. westermani*, *S. haematobium*, *S. mansoni*, and *S. japonicum*, respectively

图2 RPA-LFA检测日本血吸虫基因组DNA的敏感性及其特异性评价

Fig. 2 Evaluation of the sensitivity and specificity of RPA-LFD assay for detecting *S. japonicum* genomic DNA



A: RPA-LFD检测模拟阳性鼠血清中循环DNA结果; B: RPA-LFD检测日本血吸虫感染鼠血清中循环DNA结果。1: 双蒸水; 2~6: 分别为含100、10、1、0.1和0.01 ng日本血吸虫基因组DNA的模拟阳性血清DNA; 7~10: 分别为血吸虫感染前及感染后7、21和35 d小鼠血清DNA

A: The results of RPA-LFD for detecting circulating DNA in mice dummy positive sera; B: The results of RPA-LFD for detecting circulating DNA in mouse serum with *S. japonicum* infection; 1: ddH<sub>2</sub>O; 2~6: The amount of *S. japonicum* genomic DNA in mice dummy positive sera was 100, 10, 1, 0.1, 0.01 ng, respectively; 7~10: DNA from mouse serum before infection and on days 7, 21 and 35 d after infection, respectively

图3 RPA-LFD检测感染小鼠血清中日本血吸虫循环DNA的效果评价

Fig. 3 The performance of RPA-LFD in detecting *S. japonicum* circulating DNA fragment in serum of infection mouse

基因组中 *SjR2* 片段的敏感性可达 0.9 fg, 但需借助荧光检测仪设备。赵松等<sup>[24,26]</sup>、李婷等<sup>[25]</sup>建立的 RAA 结合电泳法检测基因组中 *SjR2* 的敏感性为 0.5 ng, 随后结合荧光法检测使敏感性虽提高了 2 个数量级, 但敏感性仍不够理想。本课题组前期以 *SjR2* 序列为靶标, 建立了基于 RPA 技术的电化学 DNA 传感器检测方法, 其敏感性虽高, 但仍需借助一定的检测设备, 限制了其在现场的推广应用<sup>[35]</sup>。

为实现日本血吸虫核酸的敏感、快速及简便检测, 本研究选取 *SjCHGCS19* 序列, 结合 RPA 技术及 LFD 建立了日本血吸虫核酸可视化快速敏感检

测方法。该方法通过引入荧光标记的探针及生物素标记的引物, 在 RPA 反应过程中, 产生大量一端为 FAM 标记、另一端为生物素标记的双链 DNA。RPA 反应液滴加于金标试纸条并随试纸条层析移动时, 标记有 FAM 和生物素的扩增产物与纳米金偶联抗体及检测线上的配体形成复合物, 使纳米金聚集显色, 出现检测线。试纸条上的质控线包被有二抗, 可与游离的 FAM 探针及 FAM 抗体标记的纳米金粒结合而显色, 出现质控线, 以指示结果的有效性。

本研究所建立的 RPA-LFD 方法在 30~45 ℃反

应 10 min 即可肉眼观察检测结果。在 39 ℃、20 min 的最佳反应条件下,其最低可检出  $10^{-6}$  ng (1 fg) 日本血吸虫成虫基因组 DNA,比 Sun 等<sup>[21]</sup>建立的以 *SjR2* 为靶标的 LFD-RPA 检测方法 & Guo 等<sup>[27]</sup>建立的基于 *SjCHGCS19* 靶标的巢式 PCR 方法敏感性更高。且该方法检测与华支睾吸虫和卫氏并殖吸虫基因组 DNA 未见明显交叉反应,与曼氏血吸虫和埃及血吸虫具有较强交叉反应,提示该方法所采用的 *SjCHGCS19* 序列和引物具有血吸虫属特异性,有望用于日本血吸虫、曼氏血吸虫和埃及血吸虫的通用检测。

血吸虫感染宿主后进入血液循环,移行过程中死亡的虫体、发育过程中表皮脱落和虫卵崩解等将不断释放核酸片段,这些核酸片段最终将出现在宿主的血液、尿液及粪便中,通过检测此类样品中的特异性循环核酸有望实现血吸虫感染宿主的早期检测<sup>[14,18,36-38]</sup>。本研究建立的 RPA-LFD 方法最低可成功检出含  $10^{-2}$  ng (10 pg) 日本血吸虫基因组 DNA 的模拟阳性血清,提示本研究采用的循环核酸抽提方法有效,检测方法敏感。以每条成虫含 3 μg 基因组 DNA 及每个虫卵含 50 pg 基因组 DNA 计算<sup>[38]</sup>,该方法的检出限足以检出含 1:300 000 成虫总 DNA 或 1:5 虫卵总 DNA 的血清中的目标核酸片段,具备检出感染血吸虫宿主血清中循环核酸的优良性能。本研究建立的 RPA-LFD 方法可成功检出来自 40 条日本血吸虫尾蚴感染后 7、21 和 35 d 小鼠血清样品中的 *SjCHGCS19* 片段,表明其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,同时提示该方法具有用于血吸虫早期(童虫期)、中期(未产卵成虫期)及晚期(产卵期)感染宿主血清 DNA 检测的潜在应用价值。

综上,本研究建立的 RPA-LFD 检测方法操作简便,无需特殊仪器设备,反应温度范围宽,常用温度与室温接近,反应快速,可肉眼观察结果,具有较强的现场应用潜力。该方法能在小鼠感染后短时间内检出血清中血吸虫循环核酸,具有早期诊断价值,并有望用于以非诊断为目的实验室早期鉴定及筛查。后期拟从以下几方面进行深入探讨:通过引物及探针序列的筛选,提高 *SjCHGCS19* 靶标检测的特异性,尝试联合 *SjCHGCS19* 及其他血吸虫特异靶标建立 RPA-LFD 的二元检测体系,实现对血吸虫种属的同时检测;基于染料颜色变化的 RPA 可视化检测方法,研制核酸抽提、RPA 扩增及检测一体化的装置,进一步提高血吸虫核酸检测的实用性;系统评价其用于血吸虫低度感染的现场检测应

用价值,以满足现场对血吸虫感染简便精准检测的需求,为血吸虫病检测及传播风险监测提供敏感有效的现场适用性工具。

**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** 邓王平负责实验设计和实施、数据分析及论文撰写,洪清华协助完成实验及数据收集,徐斌协助动物实验及样品采集,王盛琳、王丽萍协助实验数据收集及分析,许静提供专业指导及论文修改建议,周晓农、胡薇指导实验设计、项目协调及论文修改。

## 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: 13.
- [3] 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.)
- [4] 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.)
- [5] Zhou XN, Li SZ. Strategy for the South-South cooperation on schistosomiasis control under the Belt and Road Initiative[J]. Chin J Schisto Control, 2020, 32(1): 1-6. (in Chinese) (周晓农, 李石柱. "一带一路"倡议下血吸虫病防控南南合作的战略思考[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2020, 32(1): 1-6.)
- [6] Zhou XN, Li SZ, Xu J, et al. Surveillance and control strategy of imported schistosomiasis mansoni: an expert consensus [J]. Chin J Schisto Control, 2019, 31(6): 591-595. (in Chinese) (周晓农, 李石柱, 许静, 等. 输入性曼氏血吸虫病监测与防控对策专家共识 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(6): 591-595.)
- [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: 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] 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.)
- [11] 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.
- [12] 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: 8
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Weerakoon KG, Gordon CA, McManus DP. DNA diagnostics for schistosomiasis control [J]. Trop Med Infect Dis, 2018, 3(3): E81
- [17] 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.
- [18] Weerakoon KG, McManus DP. Cell-free DNA as a diagnostic tool for human parasitic infections [J]. Trends Parasitol, 2016, 32(5): 378-391.
- [19] 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.)
- [20] 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.)
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Daher RK, Stewart G, Boissinot M, *et al.* Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clin Chem, 2016, 62(7): 947-958.
- [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 recombinase aided isothermal amplification assay [J]. Chin J Schisto Control, 2019, 31(2): 109-114. (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.)
- [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. (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.)
- [27] Guo JJ, Zheng HJ, Xu J, *et al.* Sensitive and specific target sequences selected from retrotransposons of *Schistosoma japonicum* for the diagnosis of schistosomiasis [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(3): e1579.
- [28] Xu J, Duan ZL, Guan ZX, *et al.* Early detection of circulating DNA of *Schistosoma japonicum* in sentinel mice models [J]. Exp Parasitol, 2017, 176: 82-88.
- [29] 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.)
- [30] Zhu YC. Immunodiagnosis and its role in schistosomiasis control in China: a review [J]. Acta Trop, 2005, 96(2/3): 130-136.
- [31] 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.
- [32] 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.)
- [33] Poulton K, Webster B. Development of a lateral flow recombinase polymerase assay for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections [J]. Anal Biochem, 2018, 546: 65-71.
- [34] Rostron P, Pennance T, Bakar F, *et al.* Development of a recombinase polymerase amplification (RPA) fluorescence assay for the detection of *Schistosoma haematobium* [J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 514.
- [35] Deng WP, Xu B, Hong QH, *et al.* Establishment of the detection method for *Schistosoma japonicum* by recombinase polymerase amplification combined with electrochemical DNA biosensor [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2020, 38(2): 168-174. (in Chinese)  
(邓王平, 徐斌, 洪清华, 等. 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 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38(2): 168-174.)
- [36] Xu J, Liu AP, Guo JJ, *et al.* The sources and metabolic dynamics of *Schistosoma japonicum* DNA in serum of the host [J]. Parasitol Res, 2013, 112(1): 129-133.
- [37] Weerakoon KG, Gordon CA, Cai PF, *et al.* A novel duplex ddPCR assay for the diagnosis of schistosomiasis japonica: proof of concept in an experimental mouse model [J]. Parasitology, 2017, 144(8): 1005-1015.
- [38] Weerakoon KG, Gordon CA, Gobert GN, *et al.* Optimisation of a droplet digital PCR assay for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection: a duplex approach with DNA binding dye chemistry [J]. J Microbiol Methods, 2016, 125: 19-27.

(收稿日期: 2020-03-13 编辑: 陈勤)