



专论与综述

食源性病毒核酸恒温检测技术研究进展

秦智伟^{1,2} 薛亮^{*1} 高琚珊¹ 胡永丹² 张菊梅¹ 吴清平^{*1}

1 广东省微生物研究所 广东省科学院 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070

2 昆明理工大学农业与食品学院 云南 昆明 650504

摘要: 食源性病毒已成为全球引发食品安全事件的重要病原,对新型检测技术的不断发展提出了严峻的挑战。早期 PCR 技术在病原检测领域中的应用,推动了对食源性病毒的全面认识。近年来核酸恒温检测技术发展迅速,包括环介导等温扩增技术、重组酶聚合酶扩增技术、核酸序列依赖性扩增技术、链置换扩增技术、滚环扩增技术等,在抗复杂基质干扰、装备要求低以及可现场实时检测等方面具有明显的技术优势,已成为食源性病毒检测领域的热点研究方向。因此,本文对近年来食源性病毒核酸恒温检测技术的原理、应用、优缺点等方面进行综述,并对未来发展方向进行了展望。

关键词: 食源性病毒, 核酸, 检测, 环介导等温扩增, 重组酶聚合酶扩增, 核酸序列依赖性扩增

Advances in nucleic acid isothermal detection technologies for foodborne viruses

QIN Zhiwei^{1,2} XUE Liang^{*1} GAO Junshan¹ HU Yongdan² ZHANG Jumei¹ WU Qingping^{*1}

1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academic of Science, State Key Laboratory of Applied Microbiology in Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China

2 Institute of Agriculture and Food, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650504, China

Abstract: Foodborne viruses have become an important pathogen causing food safety incidents worldwide, which poses a severe challenge to the continuous development of new detection technologies. The application of PCR in the pathogen detection has promoted the comprehensive understanding of foodborne viruses. In recent years, nucleic acid thermostatic detection technologies have been developed

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1601200); Natural Science Foundation of Guangdong Province for Distinguished Young Scholars (2019B151502065); Key Research and Development Program of Guangdong Province (2019B020209001); Science and Technology Development Project of Guangdong Academic of Science (2020GDASYL-20200104008)

***Corresponding authors:** XUE Liang: Tel: 86-20-87680942; E-mail: xueliang@gdim.cn
WU Qingping: Tel: 86-20-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

Received: 16-01-2020; **Accepted:** 07-04-2020; **Published online:** 04-06-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1601200); 广东省自然科学基金杰出青年基金(2019B151502065); 广东省重点领域研发计划(2019B020209001); 广东省科学院发展专项(2020GDASYL-20200104008)

***通信作者:** 薛亮: Tel: 020-87680942; E-mail: xueliang@gdim.cn
吴清平: Tel: 020-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

收稿日期: 2020-01-16; **接受日期:** 2020-04-07; **网络首发日期:** 2020-06-04

rapidly, including loop-mediated isothermal amplification, recombinase polymerase amplification (RPA), nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), strand displacement amplification, rolling circle amplification, etc. They showed obvious technical advantages in resisting complex matrix interference, low equipment requirements and on-site real-time detection, which become a hot direction in the foodborne virus detection. Therefore, this paper reviews the principles, applications, advantages and disadvantages of nucleic acid thermostatic detection technologies for foodborne viruses in recent years, and prospects the development direction in future.

Keywords: Foodborne virus, Nucleic acid, Detection, Loop-mediated isothermal amplification, Recombinase polymerase amplification, Nucleic acid sequence-based amplification

食源性病毒已成为造成全球食品安全事件的重要病原。常见的食源性病毒包括诺如病毒、轮状病毒、星状病毒、冠状病毒、札幌病毒、腺病毒、肠病毒、脊髓灰质炎病毒、甲/戊型肝炎病毒、口蹄疫病毒以及流感病毒等。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)最新统计,发达国家每年约 30%的人口患食源性疾病,发展中国家情况更加严重;全球每年约有 6 亿食源性疾病病例,死亡人数高达 42 万,其中 12.5 万为 5 岁以下儿童^[1]。食源性病毒是导致食源性疾病的重要病原之一。我们团队对我国华南地区的食源性病毒流行和污染的长期监测结果表明,诺如病毒、轮状病毒、札幌病毒等已成为引发当地急性胃肠炎的重要病原^[2-4],同时食源性、水源性病毒的污染普遍存在。因此,食源性病毒防控工作的开展尤为重要。

检测技术是开展食源性病毒监测与防控工作的基础,早期的食源性病毒检测方法主要有酶联免疫、电镜观察、细胞培养^[5],但由于检出率不高以及存在不可培养的病毒,使得这些检测方法有较大的局限性。之后发展了以 PCR 为基础的各类核酸检测技术,此类技术灵敏度高、特异性强,可达到较好的检测限水平,但其存在变温过程,对设备要求高且检测时间较长,尤其在现场检测应用方面受到了限制。近年来,核酸恒温检测技术发展迅速,其凭借灵敏、快速、设备要求低等优势,已成为食源性病毒检测的一大研究热点(表 1, 图 1)。因此,本文对近年来针

对食源性病毒核酸恒温检测技术的原理、应用、优缺点等方面进行综述,并展望该领域的未来发展方向。

1 环介导等温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)

LAMP 相较于其他核酸等温扩增技术发展较为成熟,通过识别靶序列上 6 个位点的 4-6 条特殊设计的引物和一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶(*Bst*),能够在恒温条件下快速、特异、高效地进行核酸体外扩增。LAMP 在微生物检测中可以采用浊度法、琼脂糖凝胶电泳法、显色法及横向流动试纸条法(Lateral Flow Dipstick, LFD)、探针分析等终点判读方法,这种技术早在 2003 年被应用于检测日本山药花叶病毒^[6]。

在食品安全领域,Yoda 等^[7]建立了诺如病毒的 RT-LAMP 检测技术,其灵敏度可达到 10^1 - 10^2 copies/tube,与 RT-PCR 方法的灵敏度相近,并在实际样本的检测应用中表现出更高的灵敏度。此外,RT-LAMP 被报道也成功应用于检测肠道病毒 71,其灵敏度约为 10 copies,在实际样本检测中,此方法也表现出与 RT-PCR 检测结果的一致性^[8]。Imai 等^[9]开发了一种 RT-LAMP 方法,用于检测 H5N1 流感病毒,其灵敏度为 0.01 PFU (Plaque Forming Unit),约为 RT-PCR 的 100 倍。戊型肝炎病毒作为食源性病毒之一,Gao 等^[10]建立了一种 RT-LAMP 方法用于检测贝类中的戊型肝炎病毒,其灵敏度可达 10 copies,在实际贝类样本检测中,此方法也表现出和 RT-PCR 同样的检出

率。Hu 等^[28]建立了一种基于智能手机成像的微滴式数字 LAMP 检测芯片,其同时具有快速提取检测核酸功能,核酸回收率可达 75%,全部检测时间不超过 60 min,而检测结果与传统数字 PCR 无明显差异。Chander 等^[29]介绍了一种 LAMP 反应中可替代 DNA 聚合酶(*Bst*)的 OmniAmp DNA 聚合酶,这种聚合酶的优势在于不仅具有逆转录酶活性,可实现 RT-LAMP 的单酶检测,并且具有较强

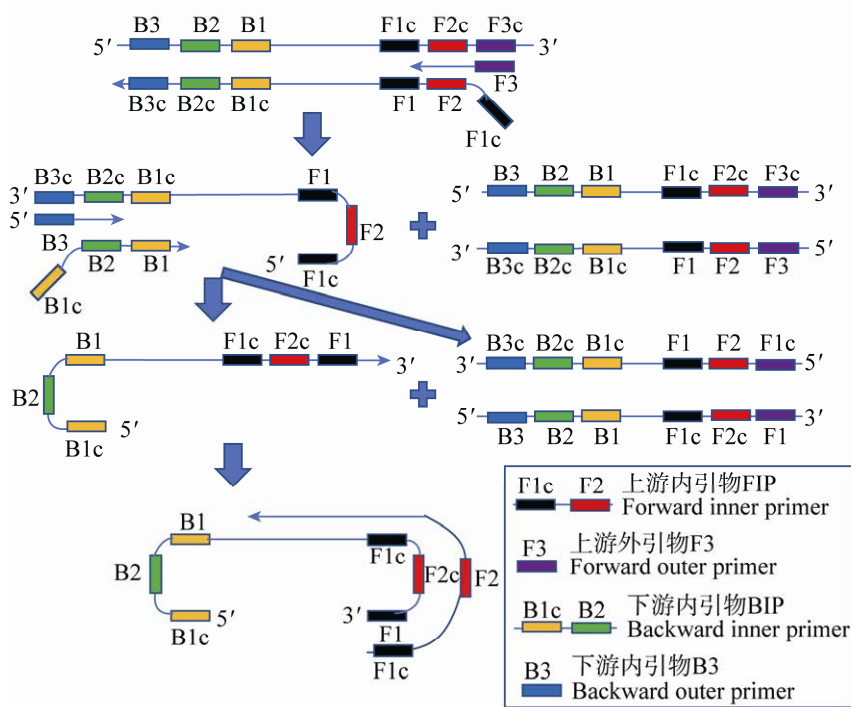
的热稳定性,可在环境温度下长期储存;除此之外,与传统的 *Bst* 相比,OmniAmp DNA 聚合酶表现出更高的效率,尤其是在模板浓度较低的情况下。近年来,随着检测要求的不断提升与即时检验(Point of Care Testing, POCT)等现实需求,微流控技术与 LAMP 的结合已成为一大研究热点,再通过与 OmniAmp DNA 聚合酶等结合,使得 RT-LAMP 在食源性病毒检测的前景变得更加广阔。

表 1 常见食源性病毒核酸等温检测技术

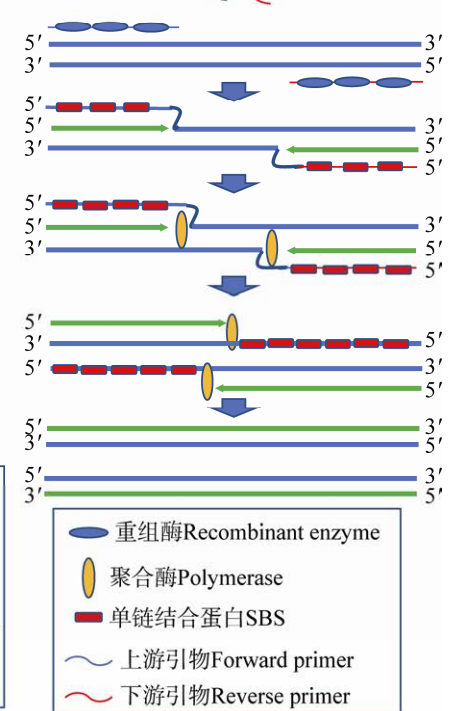
Table 1 Nucleic acid isothermal detection technologies for foodborne viruses

方法 Methods	反应温度 Temperature (°C)	灵敏度 Sensitivity	时间 Time (min)	引物数量 Primer number	仪器 Instrument	其他优点 Advantages	其他不足 Disadvantages	参考文献 References
环介导等温扩增技术 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	60–65	10 ¹ –10 ² copies	60	4–6	浊度仪 Loopampreal-time turbidimeter	扩增效率高 High amplification efficiency	引物设计复杂, [6-10] 假阳性高 Difficult to design primer, high false positive	
重组酶聚合酶 扩增技术 Recombinase polymerase amplification (RPA)	37–41	10 ² –10 ³ copies	15–20	2	热循环仪 Bio-Rad CFX LightCycler®96	原理简单、 性价比高 Simple and cost-effective	模板不宜太长 [11-12] (200–500 bp) Appropriate length of DNA	
核酸序列依赖性 扩增技术 Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)	41	10 copies	90–120	2	水浴锅 Water bath	适合 RNA 扩增 Fit for RNA amplification	原理复杂, [13-14] 成本较高 Complex and cost	
滚环扩增技术 Rolling circle amplification (RCA)	37	9 fmol/L	60	1–2	热循环仪 Thermal cycler	特异性高 High specificity	锁式探针合成 [15-16] 困难 Difficult to design probe	
单引物等温扩增 技术 Single primer isothermal amplification (SPIA)	55–60	8.2 fg	30–60	1	ABI7500 Real-time PCR system	忠实性高 High fidelity of replication	混合引物的 [17-22] 设计难度高 Difficult to design primer	
链置换扩增技术 Strand displacement amplification (SDA)	37	0.4 pmol/L	30–40	4	水浴锅 Water bath	快速、简便 Fast and convenient	产物在基因工 [23-24] 程上应用受限 Limited application	
依赖解旋酶等温 扩增技术 Helicase-dependent amplification (HDA)	65	20 copies	60–120	2	水浴锅 Water bath	原理简单、引物 设计的难度较小 Simple and easy to design primer	扩增效率较低 [25-27] Low amplification efficiency	

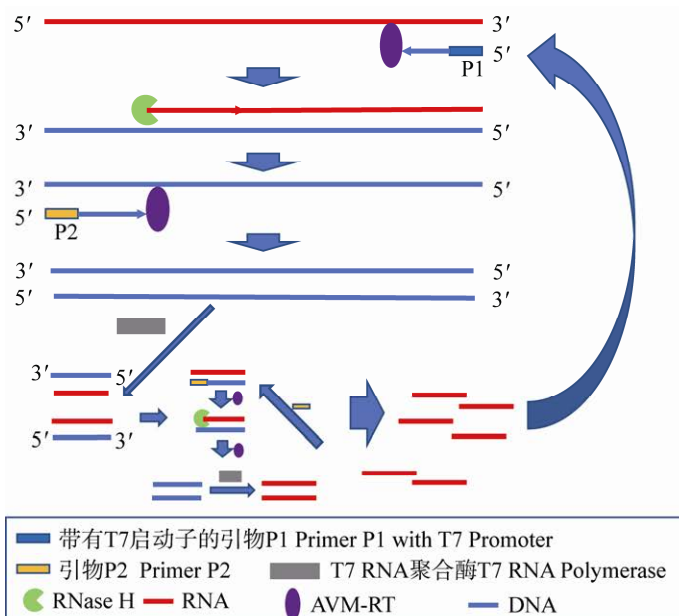
A: LAMP



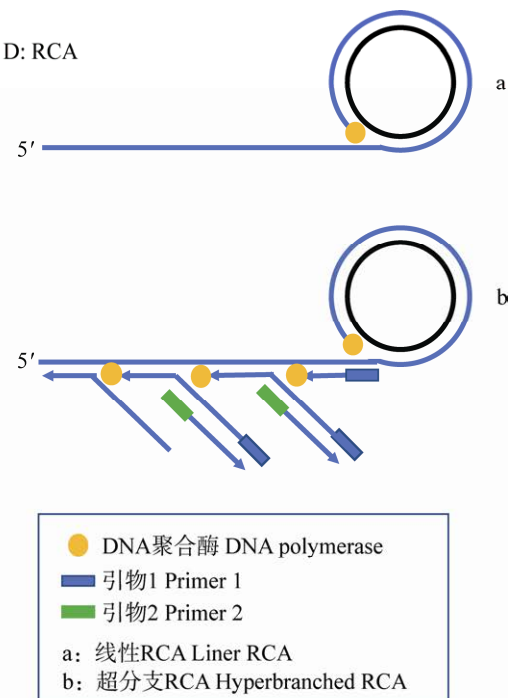
B: RPA



C: NASBA



D: RCA



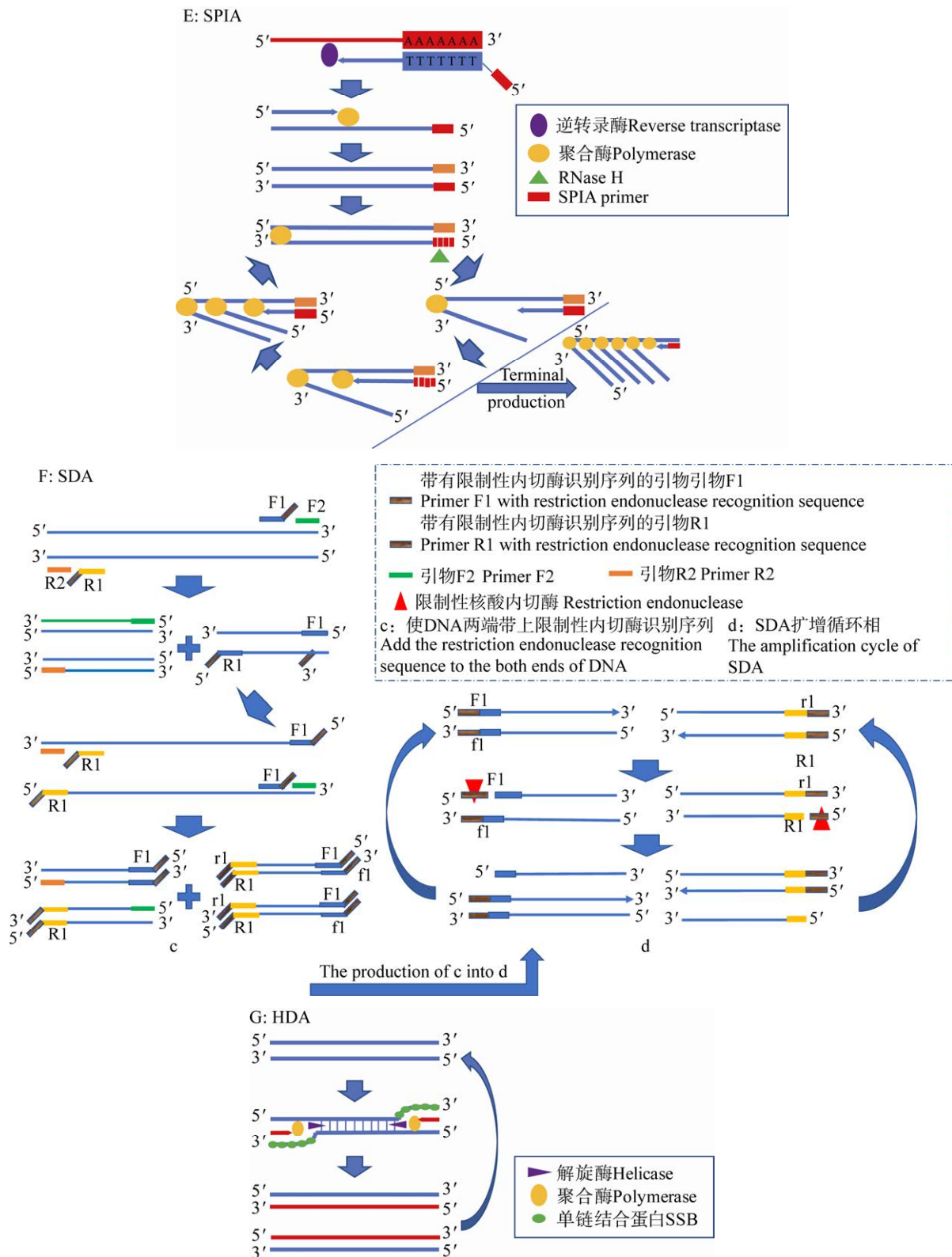


图 1 常见食源性病毒核酸恒温扩增技术原理图

Figure 1 The principle of common nucleic acid isothermal amplification technologies for foodborne viruses

LAMP技术在使用中也存在问题: 反应需要引物数目较多, 引物的设计复杂, 尤其在易变异的食源性病毒中难以找到相应的扩增区域; 扩增产物通常只能用于判断目的基因是否存在, 而不能直接用于克隆和测序等后续研究; 此外, LAMP还未能实现闭管检测, 容易产生污染, 出现假阳性。

2 重组酶聚合酶扩增技术(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)

RPA 技术是一种可应用于低温(37 °C 左右)的等温扩增技术, 反应体系包括能结合单链核酸(寡核苷酸引物)的重组酶、具有链置换活性的 DNA 聚合酶、DNA 单链结合蛋白(Single Strand DNA-Binding Protein, SSB)和 Mg^{2+} 等, 利用引物-重组酶复合物扫描 DNA 链, 进而促进 DNA 链上对应同源位点的识别、结合、互换^[30], 通过 DNA 聚合酶和 SSB 共同作用合成互补新链, 随着反应的进行, 扩增产物以指数状态增长。RPA 可作为一种便携、快速、性价比高的检测工具, 实现实验室外的现场精确检测。

目前已发展了一系列以 RPA 为基础的核酸检测技术, 如直接重组酶聚合酶扩增技术(Direct-RPA)、重组酶聚合酶扩增酶联免疫吸附技术(RPA-ELISA)、重组酶聚合酶扩增侧流层析技术(RPA-LFD)、实时重组酶聚合酶扩增技术(Real-Time RPA)以及 RPA 微流控技术等^[31]。Wang 等^[32]建立实时荧光 RT-RPA 方法检测猪小肠样品中的传染性胃肠炎病毒, 其检测耗时明显低于常规 RT-PCR, 灵敏度与实时 qPCR 相当, 在 100 copies/reaction 左右。Zhang 等^[33]开发了用于快速检测小反刍兽疫病毒的重组酶聚合酶扩增试验。近几年, RPA 技术在食源性病毒检测中也有一定的运用。Yin 等^[11]开发并评估了 RT-RPA 检测肠道病毒 71 的方法, 其检测灵敏度略低于 RT-qPCR, 可达到 3.767 Log₁₀ genomic copies (LGC)。Moore 等^[12]建立了检测诺如病毒 GII.4 型的 RT-RPA 方

法, 其灵敏度为 3.4 LGC。近年来, RPA 技术与微流控芯片结合紧密, 已开发出系列检测技术, 如基于纸芯片的 RPA 技术用于检测脑膜炎奈瑟菌^[34]、基于毛细管微流控芯片与 RPA 结合检测禽病毒^[35]、基于流式化学发光的 DNA 芯片与非均相不对称重组聚合酶反应(Heterogeneous Asymmetric Recombinase Polymerase Amplification, haRPA)相结合检测军团菌^[36]等新型核酸恒温检测技术, 但在食源性病毒检测中的应用还较为缺乏。

综上所述, 基于 RPA 反应要求简单、结果可视化、能较好地与微流控技术相结合等优势, RPA 将成为未来食源性病毒现场可视化快速检测的重要手段, 但该技术也存在一定的局限, 即扩增模板链不宜过长, 当扩增超过 500 bp 的片段时会较大程度地影响扩增效率。

3 核酸序列依赖性扩增技术(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA)

NASBA 是以 RNA 为模板并由一对引物介导的体外核酸等温扩增的酶促反应过程, 由具有 DNA 聚合酶活性的 AVM 逆转录酶、T7 RNA 聚合酶、核糖核酸酶 H 和两种特异性引物共同协作而完成扩增。首先以 RNA 为模板, 由含有 T7 启动子的特殊引物在 AVM 逆转录酶作用下合成与 RNA 模板互补的 DNA 序列, 生成的 RNA 与 DNA 杂链中的 RNA 部分被 RNase H 消解, 再由第 2 条引物结合至所生成的 DNA, 在 AVM 酶作用下生成 DNA 双链, 最后在 T7 RNA 聚合酶作用下大量生成目的片段。

NASBA 作为一项较为成熟的检测技术, 在病毒检测方面早有应用, 如 HIV 病毒^[37-39]、乙型肝炎病毒^[40]、食源性病毒。Lamhoujeb 等^[41]将 NASBA 与分子信标结合起来, 用于 GII 型诺如病毒的检测, 其灵敏度达到了 0.01 Particle Detectable Units (PDU), 略低于实时 RT-PCR, 但比普通 RT-PCR 高 100 倍。Heim 等^[13]利用 NASBA 技术检测脑脊液样品中的肠道病毒, 其灵敏度约为

10 copies。近两年,关于 NASBA 的研究相对较少,偏向于建立 NASBA 与其他技术相结合的新型检测方法。Lu 等^[14]建立了 NASBA-DNAzyme 系统鉴别经典猪瘟病毒,其灵敏度比普通 RT-PCR 高 100 倍,小于 10 copies/mL。

NASBA 技术的优势在于核酸扩增过程不需要特殊仪器,相较于传统的 PCR 技术更加灵敏、准确和稳定。然而,NASBA 技术自身也存在一些不足之处,例如反应原理较为复杂、所需酶类较多等,因而限制了其实际应用。

4 滚环扩增技术 (Rolling Circle Amplification, RCA)

滚环扩增技术是源于自然界噬菌体环状 DNA 的滚环复制过程原理而发展起来的一种新型核酸扩增方法。在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下,由一条与靶序列互补的引物与环状 DNA 模板链发生置换,进而扩增出与模板链互补的超长链 ssDNA,再经酶切形成单位长度 ssDNA,实现环状 DNA 模板的体外等温线性扩增,若加入与环状模板 DNA 一致的引物,可实现指数级扩增。

近年来,研究者们也建立了适用于病毒检测的一系列方法。Murakami 等^[42-44]发明了三向连接构造(Three-Way Junction, 3WJ)组合介导的滚环扩增(Primer Generation-Rolling Circle Amplification, PG-RCA)技术,将 RNA 信号放大,可以检测到 amol (10^{-18} mol)级水平的 RNA。通过与新型信号检测、信号放大技术相结合,是目前 RCA 的研究重点之一。例如:Carinelli 等^[45]将 RCA 与电化学检测技术相结合并进行信号放大,对埃博拉病毒进行检测,其检测限约为 33 copies; Na 等^[46]介绍了一种将 RCA 与微流体相结合检测各类感染性病毒(埃博拉、中东呼吸综合征冠状病毒等)的检测方法,各种病原体检测限已达到 0.1 pmol/L,而且通过注入染色液后,可肉眼判定样品流体中目标病原体是否存在;在食源性病原方面,Hao 等^[47]

将 RCA 与化学传感器和纳米片相结合检测金黄色葡萄球菌,此方法检测限为 15 CFU/mL; Hamidi 等^[15]运用超支化滚环扩增(Hyperbranched Rolling Circle Amplification, HRCa)和生物传感器实时检测流感病毒 H5N1,在信噪比为 3 时,其检测灵敏度为 9 fmol/L。

锁式探针^[16]与 RCA 的完美结合,使得 RCA 的高特异性、高灵敏度成为此技术最大的亮点。但 RCA 也有其自身的局限性,对模板纯度要求高,以及锁式探针由于其自身长度在 100 bp 左右,合成难度大、成本高。目前,RCA 技术在食源性病毒检测方面的研究较为匮乏,针对食源性病毒检测,通过与电化学、微流控芯片、新型纳米复合材料等技术相结合,开发基于 RCA 的可视化快速检测技术存在广阔的发展前景。

5 单引物等温扩增技术(Single Primer Isothermal Amplification, SPIA)

SPIA 的核心是一条混合引物及可以切割 DNA/RNA 杂合链中 RNA 部分的 RNA 酶,引物由 5'端 RNA 部分和 3'端 DNA 部分组成。在反应过程中,RNase H 不断降解引物区 DNA/RNA 双链中的 RNA 部分,暴露出模板上与引物 RNA 部分结合的位点,然后新引物结合上去进行链置换合成,经过 RNA 降解、新引物结合、链置换的循环过程,实现模板互补序列的快速扩增^[48-49]。

王建昌等^[17-21]结合实时荧光检测,实现了对单增李斯特菌、大肠杆菌 O157、阪崎克罗诺杆菌、志贺氏菌等食源性致病菌的检测。在病毒方面,Perlejewski 等^[22]利用 SPIA 技术对脑脊液中的 RNA 进行扩增,再经过特异性 PCR 检测出人类疱疹病毒 1 型。Myrmel 等^[50]以冠状病毒为研究对象,对比了 SPIA、SISPA 这 2 种方法分别与二代高通量测序相结合的效率。邹晓辉等^[51]研究比较了 SPIA 与多重置换等温扩增(Multiple Displacement Amplification, MDA)两种核酸扩增方法在二代高通量测序上的应用,结果显示 SPIA 在病毒检测能

力上优于MDA。伴随着SPIA的发展,将逐渐扩大其扩增效率和应用范围。

该技术具有操作设备简单、效率高、忠实性高等优点,但使用的引物为DNA和RNA的混合引物。目前, SPIA 主要应用于单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)检测和数量有限的珍贵临床样品的核酸扩增,未来可在食源性病毒检测领域中开展相关工作。

6 链置换扩增技术(Strand Displacement Amplification, SDA)

链置换扩增技术由 Walker 等^[52]于 1992 年提出,是一种基于酶促反应的 DNA 体外等温扩增技术,利用限制性内切酶、具有链置换活性的 DNA 聚合酶和 2 对引物在等温条件下进行扩增。首先由第 1 对引物识别并与靶 DNA 结合,使靶 DNA 两端带上限制性内切酶识别序列,限制性核酸内切酶识别 DNA 靶序列上被标记的酶切位点并打开双链 DNA,然后在 DNA 聚合酶的作用下向 3'端方向延伸并置换出 DNA 链,最后在第 2 对引物和 DNA 聚合酶的作用下进行扩增。

近两年,关于 SDA 应用研究的主要方向为将 SDA 与其他技术结合起来,以开发新型检测技术。例如: Dai 等^[53]开发了一种近红外激光触发的靶链置换扩增方法,实现了单个活细胞中的 MicroRNA 定量检测; Li 等^[23]提出了基于氧化石墨烯的链置换扩增平台,用于蓖麻毒素检测。除此之外, SDA 还能与电化学传感器、分子信标等结合,形成新的核酸检测技术。SDA 在病毒检测方面也有一定应用: 赵锦等^[24]采用 SDA 结合纳米金侧流层析试纸条检测登革热病毒; Li 等^[54]提出了 Triplex DNA-Assisted SDA,用于高灵敏度特异性定量检测猴病毒 40 (SV40)。

SDA 技术的优点是扩增效率高、等温、快速简便,但也存在不足之处: SDA 需使用修饰过的 dNTP,而且产物两端仍然存在限制性内切酶的识别序列,不能用于克隆,这一点与 LAMP 产物一

样,在基因工程方面缺乏优越性。目前, SDA 技术在疾病和基因诊断等医学领域应用较为广泛,在食源性致病菌、病毒的检测应用上几乎未见报道,但由于其简便、扩增效率高等优点,在食源性病毒的检测应用上也将会有较大的发展空间。

7 依赖解旋酶等温扩增技术(Helicase-Dependent Amplification, HAD)

依赖解旋酶等温扩增技术(HDA)是 2004 年由 Vincent 等^[55]提出的一种新型等温扩增技术,扩增原理与生物体内 DNA 扩增原理相似。在扩增过程中,首先解旋酶将双链打开,然后单链结合蛋白(SSB)与被打开后形成的 DNA 单链结合进行保护,再通过引物和 DNA 聚合酶的作用合成新链,合成的新链再进入下一轮扩增,以达到指数级扩增的效果。

Tang 等^[56]建立了 RT-tHDA 的方法对 HIV 病毒进行了检测,其灵敏度约为 50 copies。除此之外, HAD 技术在花椰菜花叶病毒、番茄斑萎病毒、麻疹病毒的检测中也有应用^[25-27]。在食源性病毒检测上,金静维等^[57]利用 RT-HAD 技术建立了口蹄疫病毒的快速检测方法,具有较好的特异性,其灵敏度比普通 RT-PCR 高 10 倍。方斌等^[58]建立了一种 RT-HAD 的核酸扩增方法,用于 H7N9 禽流感病毒的检测,并辅以胶体金免疫层析试纸检测扩增产物,其检测限可达 20 copies/ μ L,与常规 PCR 相比较无明显差异。

HDA 的优势在于其是一种恒温核酸扩增技术,对设备要求低,而且引物长度相对较短,引物设计的难度较小,成本相对较低。该方法存在的问题是较为依赖解旋酶,解旋速率会直接影响扩增效率。目前,关于 HAD 技术在食源性病毒检测方面的研究还十分有限,但 HAD 作为一个极具潜力的核酸扩增技术,相信在克服解旋酶解旋速率后, HAD 将会有更广阔的发展前景。

8 展望

食源性病毒作为引发食品安全事件的主要病原受到广泛关注。近些年,核酸等温扩增技术凭借其简便、快速、低成本等优势发展迅速,新型核酸检测方法应运而生。在众多的核酸等温扩增方法中,除了 LAMP 发展相对成熟外, RPA、SPIA、SDA、HAD 等方法均具有广阔的前景与发展空间,尤其是针对食源性病毒的快速便携式检测。目前,多数食源性病毒检测方法还是以传统的 PCR 方式为主,存在耗时长、对操作人员要求高、仪器设备不易携带等问题,达不到便携快速检测的目的,给一些食源性疾病暴发区域或是一些偏远地区的病毒防控检测带来巨大阻力。针对这一问题,开发食源性病毒的便携式快速检测方法具有重大的实际意义,具体可通过适当融入学科交叉,将恒温检测方法结合新型纳米材料、试纸条、电化学传感器、微流控芯片等方式,以实现更快捷、更通用、更便携的食源性病毒核酸检测,在此领域将具有巨大的发展潜力。除此之外,绝大多数核酸等温扩增方法与经典荧光定量 PCR 相比,其检测灵敏度还有一定差距,可通过不同方法实现信号放大,例如 CRISPR/Cas13a 等^[59],以提升其灵敏度,因此也具有广阔的发展前景。由于病毒复杂的遗传进化机制以及其不可培养性,食源性病毒核酸检测技术的发展也存在一定的挑战,对其进行深入的遗传进化机制研究,突破食源性病毒增殖系统技术难关也将成为开发食源性病毒核酸检测方法的重点和难点。总之,基于经济、便携、快速、灵敏、可视化等要求,核酸等温扩增技术将会不断发展完善,从而为食源性病毒的检测提供新的技术平台,为食源性病毒的防控打下坚实的基础。

REFERENCES

- [1] World Health Organization. Fact sheet. Food-safety[EB/OL]. WHO. 2020-04-30. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- [2] Xue L, Cai WC, Gao JS, Zhang L, Dong RM, Li YL, Wu HM, Chen MT, Zhang JM, Wang J, et al. The resurgence of the norovirus GII.4 variant associated with sporadic gastroenteritis in the post-GII.17 period in South China, 2015 to 2017[J]. BMC Infectious Diseases, 2019, 19(1): 696
- [3] Xue L, Cai WC, Zhang L, Gao JS, Dong RM, Li YL, Wu HM, Zhang JM, Zeng HY, Ye QH, et al. Prevalence and genetic diversity of human sapovirus associated with sporadic acute gastroenteritis in South China from 2013 to 2017[J]. Journal of Medical Virology, 2019, 91(10): 1759-1764
- [4] Xue L, Wu QP, Dong RM, Kou XX, Li YH, Zhang JM, Guo WP. Genetic analysis of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis during winter in Guangzhou, China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(10): 888-895
- [5] Zhang J, Zhang P, Huang Z. Prevention and control of foodborne virus[J]. Agricultural Engineering, 2017, 7(5): 79-82 (in Chinese)
张吉, 张鹏, 黄振. 食源性病毒及其防控[J]. 农业工程, 2017, 7(5): 79-82
- [6] Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP[J]. Archives of Virology, 2003, 148(9): 1713-1720
- [7] Yoda T, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Kanki M, Aoyama I, Tsukamoto T. Evaluation and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of noroviruses[J]. Journal of Medical Virology, 2007, 79(3): 326-334
- [8] Wang X, Zhu JP, Zhang Q, Xu ZG, Zhang F, Zhao ZH, Zheng WZ, Zheng LS. Detection of enterovirus 71 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 179(2): 330-334
- [9] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Tashiro M, Odagiri T. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection[J]. Vaccine, 2006, 24(44/46): 6679-6682
- [10] Gao SY, Li DD, Liu Y, Zha EH, Wang S, Li YG, Zhou TZ, Yue XQ. Development and evaluation of a RT-LAMP assay for rapid detection of hepatitis E virus from shellfish[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 220: 1-5
- [11] Yin D, Zhu YN, Wang KF, Wang J, Zhang XR, Han M, He YQ, Chen Q, Hu GF. Development and evaluation of a rapid recombinase polymerase amplification assay for the detection of human enterovirus 71[J]. Archives of Virology, 2018, 163(9): 2459-2463
- [12] Moore MD, Jaykus LA. Development of a recombinase polymerase amplification assay for detection of epidemic human noroviruses[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40244
- [13] Heim A, Schumann J. Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) protocol for the detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples[J]. Journal of Virological Methods, 2002, 103(1): 101-107

- [14] Lu XL, Shi XY, Wu GG, Wu TT, Qin R, Wang Y. Visual detection and differentiation of classic swine fever virus strains using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and G-quadruplex DNAzyme assay[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44211
- [15] Hamidi SV, Ghourchian H, Tavoosidana G. Real-time detection of H5N1 influenza virus through hyperbranched rolling circle amplification[J]. Analyst, 2015, 140(5): 1502-1509
- [16] Banér J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landegren U. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(22): 5073-5078
- [17] Wang JC, Hu LX, Sun XX, Li J. Establishment of real time fluorescence single primer isothermal amplification for *Listeria monocytogenes*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(16): 275-279,308 (in Chinese)
王建昌, 胡连霞, 孙晓霞, 李静. 单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光 SPIA 方法的建立[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 275-279,308
- [18] Li R, Wang JC, Li J, Hu LX, Zhang W. A method for the detection of *Escherichia coli* O157 based on real-time fluorescence single primer isothermal amplification (SPIA)[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(2): 317-322,316 (in Chinese)
李瑞, 王建昌, 李静, 胡连霞, 张伟. 实时荧光单引物等温扩增(SPIA)技术检测大肠杆菌 O157 的方法研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(2): 317-322,316
- [19] Li J, Duan YS, Wang JC, Sun XX, Hu LX. Establishment of the real-time fluorescence single primer isothermal amplification for the detection of *Cronobacter sakazakii*[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 27(5): 524-530 (in Chinese)
李静, 段永生, 王建昌, 孙晓霞, 胡连霞. 实时荧光单引物等温扩增检测阪崎克罗诺杆菌方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(5): 524-530
- [20] Wang JC, Hu LX, Duan YS, Li J, Wang JF. Real-time fluorescence single primer isothermal amplification established for the *Vibrio parahaemolyticus* detection[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(11): 1212-1218 (in Chinese)
王建昌, 胡连霞, 段永生, 李静, 王金凤. 副溶血性弧菌实时荧光单引物等温扩增方法的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(11): 1212-1218
- [21] Wang JC, Hu LX, Duan YS, Li J, Wang JF. Establishment and application of real-time fluorescence single primer isothermal amplification for *Shigella*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 33(6): 40-45 (in Chinese)
王建昌, 胡连霞, 段永生, 李静, 王金凤. 志贺氏菌实时荧光单引物等温扩增方法的建立及应用[J]. 食品科学技
- 术学报, 2015, 33(6): 40-45
- [22] Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Lipowski D, Pollak A, Lechowicz U, Cortés KC, et al. Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: Unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for RNA pathogens[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 226: 1-6
- [23] Li CH, Xiao X, Tao J, Wang DM, Huang CZ, Zhen SJ. A graphene oxide-based strand displacement amplification platform for ricin detection using aptamer as recognition element[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 91: 149-154
- [24] Zhao J, Xia HX, Liu YJ, Pal R, Fan AR, He ZX, Zeng LW. Application of gold nanoparticles-based lateral flow strip for Dengue virus detection based on strand-displacement amplification[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2018, 47(4): 405-412 (in Chinese)
赵锦, 夏海雄, 刘雨杰, Pal R, 范安然, 何志旭, 曾令文. 采用等温链置换扩增结合纳米金测流层析试纸条检测登革热病毒[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2018, 47(4): 405-412
- [25] Wu XH, Chen CF, Xiao XZ, Deng MJ. Development of reverse transcription thermostable helicase-dependent DNA amplification for the detection of tomato spotted wilt virus[J]. Journal of AOAC International, 2016, 99(6): 1596-1599
- [26] Moura-Melo S, Miranda-Castro R, De-Los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Dos Santos Junior JR, da Silva Fonseca RA, Lobo-Castañón MJ. Targeting helicase-dependent amplification products with an electrochemical genosensor for reliable and sensitive screening of genetically modified organisms[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(16): 8547-8554
- [27] Ma LM, Lu YY, Xu CP, Feng Y. Quick detection of measles virus by helicase-dependent isothermal deoxyribonucleic acid amplification assay[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2012, 18(6): 493-495,540 (in Chinese)
马丽敏, 卢亦愚, 徐昌平, 冯燕. 依赖解旋酶恒温扩增技术快速检测麻疹病毒核酸[J]. 中国疫苗和免疫, 2012, 18(6): 493-495,540
- [28] Hu F, Li J, Zhang ZM, Li M, Zhao SH, Li ZP, Peng NC. Smartphone-based droplet digital LAMP device with rapid nucleic acid isolation for highly sensitive point-of-care detection[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(2): 2258-2265
- [29] Chander Y, Koelbl J, Puckett J, Moser MJ, Klingele AJ, Liles MR, Carrias A, Mead DA, Schoenfeld TW. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 395
- [30] Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes[J].

- Biosensors and Bioelectronics, 2015, 64: 196-211
- [31] Hu JQ, Wei XK, Huang RN, Sun XC, Jing JZ, Gao H, Geng Y, Dong CW, Jiang CP. Advance in RPA detection technologies of foodborne pathogenic bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(7): 329-334 (in Chinese)
胡金强, 魏向珂, 黄润娜, 孙新城, 景建洲, 高辉, 耿尧, 董彩文, 姜春鹏. 食源性致病菌 RPA 检测技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 329-334
- [32] Wang JF, Wang JC, Zhang RX, Liu LB, Shi RH, Han QA, Yuan WZ. Rapid detection of transmissible gastroenteritis virus in swine small intestine samples using real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2018, 256: 85-88
- [33] Zhang YN, Wang JC, Zhang Z, Mei L, Wang JF, Wu SQ, Lin XM. Development of recombinase polymerase amplification assays for the rapid detection of peste des petits ruminants virus[J]. Journal of Virological Methods, 2018, 254: 35-39
- [34] Rivas L, Reuterswärd P, Rasti R, Herrmann B, Mårtensson A, Alfvén T, Gantelius J, Andersson-Svahn H. A vertical flow paper-microarray assay with isothermal DNA amplification for detection of *Neisseria meningitidis*[J]. Talanta, 2018, 183: 192-200
- [35] Li XP, Manz A. Precise definition of starting time by capillary-based chemical initiation of digital isothermal DNA amplification[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 288: 678-682
- [36] Kober C, Niessner R, Seidel M. Quantification of viable and non-viable *Legionella* spp. by heterogeneous asymmetric recombinase polymerase amplification (haRPA) on a flow-based chemiluminescence microarray[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 100: 49-55
- [37] McArthur JC, McClernon DR, Cronin MF, Nance-Sproson TE, Saah AJ, Clair MS, Lanier ER. Relationship between human immunodeficiency virus-associated dementia and viral load in cerebrospinal fluid and brain[J]. Annals of Neurology, 1997, 42(5): 689-698
- [38] Waléria-Aleixo A, Greco DB, Brindeiro R, Tanuri A. False I50V resistance readings of HIV isolates: co-amplification of NASBA HIV-1 RNA QT internal calibrators and HIV-1 patient isolates may lead to a false I50V mutation resistance reading in genotypic tests[J]. Archives of Virology, 2008, 153(8): 1489-1494
- [39] Revets H, Marissens D, de Wit S, Lacor P, Clumeck N, Lauwers S, Zissis G. Comparative evaluation of NASBA HIV-1 RNA QT, Amplicor-HIV monitor, and Quantiplex HIV RNA assay, three methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(5): 1058-1064
- [40] Deiman B, Jay C, Zintilini C, Vermeer S, van Strijp D, Venema F, van de Wiel P. Efficient amplification with NASBA[®] of hepatitis B virus, herpes simplex virus and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* DNA[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 151(2): 283-293
- [41] Lamhoujeb S, Charest H, Fliss I, Ngazoa S, Jean J. Real-time molecular beacon NASBA for rapid and sensitive detection of norovirus GII in clinical samples[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(12): 1375-1380
- [42] Murakami T, Sumaoka J, Komiya M. Sensitive RNA detection by combining three-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(3): e22
- [43] Du GM, Liu MJ, Wu YZ, Xiong QY, Bai FF, Feng ZX, Shao GQ. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma hyorhinis*[J]. Clinical Laboratory, 2013, 59(11/12): 1363-1371
- [44] Entenza JM, Betrisey B, Manuel O, Giddey M, Sakwinska O, Laurent F, Bizzini A. Rapid detection of *staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to vancomycin by isothermal microcalorimetry[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(1): 180-186
- [45] Carinelli S, Kühnemund M, Nilsson M, Pividori MI. Yoctomole electrochemical genosensing of Ebola virus cDNA by rolling circle and circle to circle amplification[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 93: 65-71
- [46] Na W, Nam D, Lee H, Shin S. Rapid molecular diagnosis of infectious viruses in microfluidics using DNA hydrogel formation[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 108: 9-13
- [47] Hao LL, Gu HJ, Duan N, Wu SJ, Ma XY, Xia Y, Tao Z, Wang ZP. An enhanced chemiluminescence resonance energy transfer aptasensor based on rolling circle amplification and WS₂ nanosheet for *Staphylococcus aureus* detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 959: 83-90
- [48] Kurn N, Chen PC, Heath JD, Kopf-Sill A, Stephens KM, Wang SL. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications[J]. Clinical Chemistry, 2005, 51(10): 1973-1981
- [49] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies—a review[J]. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2008, 27(3): 224-243
- [50] Myrmel M, Oma V, Khatri M, Hansen HH, Stokstad M, Berg M, Blomström AL. Single primer isothermal amplification (SPIA) combined with next generation sequencing provides complete bovine coronavirus genome coverage and higher sequence depth compared to sequence-independent single primer amplification (SISPA)[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0187780
- [51] Zou XH, Zhao X, Feng ZM, Wang DY, Shu YL. Application of two isothermal amplification methods in pathogen identification using the next generation sequencing[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2016, 30(2): 228-230 (in Chinese)
邹晓辉, 赵翔, 冯兆民, 王大燕, 舒跃龙. 两种等温扩增

- 技术在二代测序病毒鉴定中的应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2016, 30(2): 228-230
- [52] Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification-an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(7): 1691-1696
- [53] Dai WH, Dong HF, Guo KK, Zhang XJ. Near-infrared triggered strand displacement amplification for MicroRNA quantitative detection in single living cells[J]. Chemical Science, 2018, 9(7): 1753-1759
- [54] Li YB, Li RM, Zou L, Zhang MJ, Ling LS. Fluorometric determination of Simian virus 40 based on strand displacement amplification and triplex DNA using a molecular beacon probe with a guanine-rich fragment of the stem region[J]. Microchimica Acta, 2017, 184(2): 557-562
- [55] Vincent M, Xu Y, Kong HM. Helicase-dependent isothermal DNA amplification[J]. EMBO Reports, 2004, 5(8): 795-800
- [56] Tang W, Chow WHA, Li Y, Kong HM, Tang YW, Lemieux B. Nucleic acid assay system for tier II labs and moderately complex clinics to detect HIV in low-resource settings[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2010, 201(S1): S46-S51
- [57] Jin JW, Ma BH, Qiu SP, Ling BB, Li H, Hu XB, Cao YC, Xue CY. Establishment of reverse transcription helicase-dependent isothermal amplification for rapid detection of Foot-and-Mouth Disease Virus[J]. Guizhou Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014, 38(5): 1-5 (in Chinese)
金静维, 马保华, 邱索平, 凌彬冰, 李贺, 胡晓冰, 曹永长, 薛春宜. 口蹄疫病毒解旋酶恒温扩增检测方法的建立[J]. 贵州畜牧兽医, 2014, 38(5): 1-5
- [58] Fang B, Liu LL, Li X, Yu X, Ye GJ, Jiang YZ. Rapid detection of the H7N9 Avian Influenza virus by RT-HDA isothermal amplification[J]. Chinese Journal of Virology, 2018, 34(5): 646-652 (in Chinese)
方斌, 刘琳琳, 李翔, 余晓, 叶国军, 江永忠. 基于 RT-HDA 等温扩增技术快捷检测 H7N9 禽流感病毒的方法研究[J]. 病毒学报, 2018, 34(5): 646-652
- [59] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442