



生物实验室

重组酶聚合酶扩增结合 CRISPR-Cas12a 快速检测十足目虹彩病毒 1 方法的建立

张徐俞^{1,2} 黄俊¹ 杨稳² 付媛媛² 陈正伟¹ 郑晓叶³ 朱凝瑜³ 李业^{*1} 俞晓平^{*4}¹ 浙江科技学院 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室 浙江 杭州 310023² 杭州奥盛仪器有限公司 浙江 杭州 310030³ 浙江省水产技术推广总站 浙江 杭州 310023⁴ 中国计量大学生命科学学院 浙江 杭州 310018

摘要:【背景】十足目虹彩病毒 1 (Decapod Iridescent Virus 1, DIV1) 可感染南美白对虾、中国对虾和日本对虾等, 是危害对虾养殖业的主要病毒之一。当前高效、快速、简便地检测对虾是否感染 DIV1 是减少其发生和危害的重要途径。【目的】将成簇的规律间隔短回文重复序列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 12a (CRISPR Associated Protein 12a, Cas12a), 即 CRISPR-Cas12a 系统, 与重组酶聚合酶扩增 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 技术相结合, 建立快速检测 DIV1 的方法 (RPA-Cas12a), 并探讨该方法在实际样本检验中的应用价值。【方法】通过提取 DIV1 DNA, 设计其 RPA 引物、crRNA 及报告探针, 优化并建立 RPA 结合 CRISPR-Cas12a 的快速检测方法, 进一步分析该方法检测 DIV1 的灵敏度与特异性, 并比较建立的方法与 qPCR 法的一致性。【结果】建立的 RPA-Cas12a 快速检测方法可在 40 min 内实现对虾样本 DNA 中 DIV1 的检测, 检测限为 10 copies/reaction。用该方法分别对对虾白斑综合征病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒 (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)、虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon Hepatopenaei*, EHP) 及 DIV1 进行检测, 结果仅 DIV1 发生特异性反应, 而 WSSV、IHNV 和 EHP 的检测结果均为阴性。采用 RPA-Cas12a 检测 61 份实际样本, 结果均与 qPCR 检测法的阳性检出率一致。【结论】建立的 RPA-Cas12a 方法检测十足目虹彩病毒 1 具有快速、简便、灵敏度高且特异性强的特点, 为十足目虹彩病毒 1 的快速检测提供了新的工具。

关键词: CRISPR-Cas12a, 重组酶聚合酶扩增, 十足目虹彩病毒 1, 快速检测

Foundation item: Basic Public Welfare Research Project of Zhejiang Province (LGN19C90003)

***Corresponding authors:** LI Ye: Tel: 86-571-85070396; E-mail: liye20@zust.edu.cn

YU Xiaoping: Tel: 86-571-86836006; E-mail: yxp@cjlu.edu.cn

Received: 08-04-2021; **Accepted:** 07-06-2021; **Published online:** 24-06-2021

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGN19C90003)

***通信作者:** 李业: Tel: 0571-85070396; E-mail: liye20@zust.edu.cn

俞晓平: Tel: 0571-86836006; E-mail: yxp@cjlu.edu.cn

收稿日期: 2021-04-08; **接受日期:** 2021-06-07; **网络首发日期:** 2021-06-24

Rapid detection of decapod iridescent virus 1 by recombinase polymerase amplification combined with CRISPR-Cas12a

ZHANG Xuyu^{1,2} HUANG Jun¹ YANG Wen² FU Yuanyuan² CHEN Zhengwei¹
ZHENG Xiaoye³ ZHU Ningyu³ LI Ye^{*1} YU Xiaoping^{*4}

1 Key Laboratory of Chemical and Biological Processing Technology for Farm Products of Zhejiang Province, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou, Zhejiang 310023, China

2 Hangzhou Allsheng Instruments Company Limited, Hangzhou, Zhejiang 310030, China

3 Fisheries Technology Extension Center of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310023, China

4 College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China

Abstract: [Background] Decapod iridescent virus 1 (DIV1), which can infect *Penaeus vannamei*, *Penaeus chinensis*, *Penaeus japonicus*, etc., is one of the main viruses harmful to the prawn aquaculture. Currently, the efficient, rapid, and simple detection of whether the prawn is infected with DIV1 is an effective way to reduce the occurrence and damage of the virus. [Objective] Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas12a), termed CRISPR-Cas12a system, was combined with recombinase polymerase amplification (RPA) to establish a method RPA-Cas12a for the rapid detection of DIV1, and then the application value of this method in detecting actual samples was assessed. [Methods] We extracted the DNA of DIV1, and designed the RPA primers of DIV1, crRNA, and reporting probes to establish the rapid detection method. Subsequently, we analyzed the sensitivity and specificity of this method in detecting DIV1 and compared the consistency of the established method with qPCR. [Results] RPA-Cas12a can detect the DIV1 DNA samples within 40 min and had the sensitivity of 10 copies/reaction. This method only detected DIV1 while showed negative results for white spot syndrome virus, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, and *Enterocytozoon hepatopenaei*. Moreover, the RPA-Cas12a method revealed consistent positive rate with qPCR in detecting 61 actual samples. [Conclusion] The RPA-Cas12a method established in this study is rapid, simple, sensitive, and specific, and can serve as a new tool for the rapid detection of DIV1.

Keywords: CRISPR-Cas12a, recombinase polymerase amplification, Decapod iridescent virus 1, rapid detection

南美白对虾(*Penaeus vannamei*)自 1988 年引入我国后在全国范围内迅速推广, 市场对其需求也不断增加^[1-2]。据 2020 年中国渔业统计年鉴统计, 2019 年我国海水养殖和淡水养殖中南美白对虾养殖产量达 1.14×10^6 t, 占对虾养殖总产量的 91.27%, 居我国对虾养殖产量的首位^[3]。但近年来南美白对虾养殖过程中病害频发, 致使其产量下降, 对对虾养殖及相关产业造成了严重损失^[4]。目前, 危害对虾养殖业的病原主要有十足目虹彩病毒 1 (Decapod Iridescent Virus 1, DIV1)、对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious Hypodermal

and Hematopoietic Necrosis Virus, IHHNV)、急性肝胰腺坏死综合征(Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome, AHPNS)及虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)等, 病毒病是对虾养殖业中的主要病害, 对相关产业造成了巨大的经济损失, 已成为影响对虾养殖业发展的主要限制因素之一^[5-9]。

DIV1 属于虹彩病毒科, 是一种二十面体对称的胞浆型、双链 DNA 病毒, 研究发现该病毒的宿主包括南美白对虾、中国对虾(*Penaeus chinensis*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)等^[10-11]。对虾感染该病毒会导致造血组织、鳃丝、肝胰腺、附肢和肌肉的血细胞中出现嗜碱性包涵体和核固缩现象,引起对虾出现游水、趴边、身体微红、肝胰腺萎缩及空肠空胃的症状,引发对虾的大量死亡^[12]。对于该病毒的防治,国内外学者普遍认为综合预防是相对有效的方法,即尽早发现疾病并采取诸多措施阻止病毒传播;因此,建立灵敏、准确、快捷、方便的 DIV1 检测方法是控制该病毒发生和扩散的重要途径^[12]。

目前,对于对虾是否感染虹彩病毒的检验通常采用病理学显微镜观察、生化测定、免疫学试验、细胞培养和 PCR 检测等,这些方法耗时、耗力、操作复杂,很难适应现场快速、准确检测的需要^[13]。成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR Associated Protein, Cas)系统,即 CRISPR-Cas 系统,是原核生物用来抵御外来遗传物质入侵的免疫防御系统,该系统已被改造成为一种高效的基因编辑工具^[14]。最近,科学家们发现部分 II 类 Cas 蛋白(如 Cas12a)具有附属切割活性,并将 CRISPR-Cas 系统应用于核酸检测领域^[15]。Cas12a 蛋白最初被称为 Cpf1,最早由 Zetsche 等于 2015 年发现^[16]。该蛋白不同于 Cas9 酶,当其在 gRNA 的引导下与目标序列结合并切割目标双链 DNA 的同时,出现了对所有的单链 DNA 产生任意切割的活性;这个现象使 Chen 等开发出一种被称为 DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter (DETECTR)的诊断系统,该系统可用于对临床样本中的少量 DNA 进行快速、简便的即时检测;具体而言,DETECTR 系统是将重组酶聚合酶扩增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)技术、CRISPR-Cas12a 及向导 RNA、荧光报告分子相结合的一种等温扩增系统^[15]。RPA 技术包含

3 种酶,即能结合寡核苷酸引物的重组酶、单链 DNA 结合蛋白和链置换 DNA 聚合酶,而且在 37–42 °C 下均有活性,可以在短时间内常规温度环境下实现对模板 DNA 的指数级扩增,因此可以摆脱对 PCR 仪的依赖;但是与 PCR 类似,也会出现非特异扩增的问题^[17-18]。Cas12a 蛋白在 crRNA 的引导下与目标序列结合后,便会切换为激活状态,不仅可以特异性地切割靶 ssDNA 或 dsDNA,还能够高效地切割体系内其他单链 DNA,即具有附属活性;当体系内加入的单链 DNA 含有报告基团时,一旦 Cas12a 识别到靶 DNA 序列的存在,就会切割单链探针底物从而释放荧光报告基团,通过捕获荧光信号即可检测靶标 DNA;该方法具有灵敏度高、特异性强等特点,为食源性疾病的早期快速诊断提供了新的手段^[19]。

因此本研究参照 DETECTR 系统的原理,将 RPA 技术与 CRISPR-Cas12a 系统相结合,拟建立 DIV1 快速检测方法(RPA-Cas12a),为 DIV1 的快速诊断及防控提供新工具。

1 材料与方法

1.1 样品

十足目虹彩病毒 1 (DIV1)、对虾白斑综合征病毒(WSSV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)、虾肝肠胞虫(EHP)感染的南美白对虾苗均由浙江省水产技术推广总站提供。阳性质控品 pET28a-MCP (Major Capsid Protein)质粒(含有靶序列片段的 T 载体)为本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

水生动物病原体核酸提取试剂盒(离心柱法) V2.0,广州华峰生物科技有限公司;RPA 扩增试剂盒, Twist DX 公司; Cas12a 蛋白,广州博徕斯生物科技股份有限公司;转录试剂盒,南京诺唯赞医疗科技有限公司;RNA 纯化试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。

生物样品前处理仪器、超微量核酸分析仪,

杭州奥盛仪器有限公司; ABI Step One 型荧光定量 PCR 仪, Thermo Fisher 公司。

1.3 RPA 引物设计

登录 GenBank, 根据已发表的 DIV1 的 MCP 基因(KY681039.1)保守序列, 参照 RPA 引物设计要求设计上下游引物^[17]。RPA 上游引物(DIV1-F): 5'-CAGATCAGAGCGCATTCGATCCC ATAGGCACCGC-3'; RPA 下游引物(DIV1-R): 5'-CGTAAGAGAACATGTGGTATCCGGTGAGTT CGGG-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 crRNA 的制备

根据 Cas12a 蛋白 crRNA 识别靶序列的特性, 即 crRNA 识别 5'端富含 T 的 PAM 位点, 在 DIV1 的 MCP 基因序列上设计 4 对特异性的 DIV1-crRNA 引物(DIV1-crRNA-1-4), 引物序列如表 1 所示。

以上述 DIV1-crRNA 的上、下游引物为互补序列, 进行双链 DNA 的合成, 体系为上、下游引物(10 μmol/L)各 5 μL, 无 RNA 酶水 40 μL。通过已报道的方法进行退火(退火程序为 99 °C 10 min, 85 °C 5 min, 80 °C 5 min, 75 °C 5 min, 70 °C 5 min)即可形成双链 DNA^[20]。反应结束

后, 采用转录试剂盒将双链 DNA 片段进行转录, 然后利用 RNA 纯化试剂盒对转录产物进行纯化, 即可获得 crRNA。

1.5 RPA-Cas12a 检测反应

报告探针(DIV1-Probe)序列参考 Chen 等的方法设计^[15], 其序列为 FAM-TTATT-BHQ1, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。RPA-Cas12a 检测反应体系(25 μL): 引物 DIV1-F 和 DIV1-R (10 μmol/L)各 1 μL, 20×Core Reaction 1.25 μL, 10×E-Mix 2.5 μL, MgOAc (280 mmol/L) 1.25 μL, 10×FnCas12a Buffer 2.5 μL, FnCas12a (500 pmol) 1 μL, crRNA (10 μmol/L) 2 μL, DIV1-Probe (10 μmol/L) 1 μL, 待检虾苗 DNA 1-100 ng, 用无 RNA 酶水补足 25 μL; 将配制好的反应管混匀后 500 r/min 离心 10 s, 置于荧光定量 PCR 仪上, 37 °C 反应 40 min。

1.6 crRNA 的筛选

以 pET28a-MCP 质粒为模板, 采用 1.5 中 RPA-Cas12a 检测方法, 分别对 4 组 DIV1-crRNA (DIV1-crRNA-1-4)进行筛选, 通过扩增曲线的荧光值及起峰时间, 选择最优的 DIV1-crRNA 引物组。

表 1 DIV1-crRNA 引物序列
Table 1 DIV1-crRNA primer sequences

类别	引物名称	引物序列
Category	Primers name	Primers sequence (5'→3')
DIV1-crRNA-1	DIV1-crRNA-F1	TAATACGACTCACTATAGGGTAATTTCTACTAAGTGTAGATAATCTCGAGATCG TTTACGTTGA
	DIV1-crRNA-R1	TCAACGTAAACGATCTCGAGATTATCTACACTTAGTAGAAATTACCCTATAGTG AGTCGTATTA
DIV1-crRNA-2	DIV1-crRNA-F2	TAATACGACTCACTATAGGGTAATTTCTACTAAGTGTAGATATTCAACGTAAAC GATCTCGAGA
	DIV1-crRNA-R2	TCTCGAGATCGTTTACGTTGAATATCTACACTTAGTAGAAATTACCCTATAGTG AGTCGTATTA
DIV1-crRNA-3	DIV1-crRNA-F3	TAATACGACTCACTATAGGGTAATTTCTACTAAGTGTAGATGATCGTGAATGGT CTGTAGAACC
	DIV1-crRNA-R3	GGTTCTACAGACCATTACGATCATCTACACTTAGTAGAAATTACCCTATAGTG AGTCGTATTA
DIV1-crRNA-4	DIV1-crRNA-F4	TAATACGACTCACTATAGGGTAATTTCTACTAAGTGTAGATCGGTGCCTATGGG ATCGAAT
	DIV1-crRNA-R4	ATTCGATCCCATAGGCACCGATCTACACTTAGTAGAAATTACCCTATAGTGAGT CGTATTA

1.7 RPA-Cas12a 分析灵敏度试验

提取 pET28a-MCP 阳性质粒, 通过 NanoDrop One 对阳性质粒进行定量, 然后将其稀释为 10^7 – 10^0 copies/reaction 8 个浓度。采用 1.5 中 RPA-Cas12a 检测方法, 以稀释后的各浓度阳性质粒及无 RNA 酶水为模板, 通过扩增曲线确定该方法的检测灵敏度。每个质粒浓度进行 5 次重复。

1.8 RPA-Cas12a 分析特异性试验

采用生物样品前处理仪器将病虾及健康虾苗进行均质研磨, 然后使用水生动物病原体核酸提取试剂盒提取 DIV1、对虾白斑综合征病毒(WSSV)、传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)及虾肝肠胞虫(EHP)的 DNA, 实验步骤参照说明书进行。采用 RPA-Cas12a 方法进行检测, 同时以无 RNA 酶水为模板作为空白对照, 分析本研究方法的检测特异性。

1.9 RPA-Cas12a 方法对实际样本的检测

2 批南美白对虾虾苗(2019 年 10 月及 2021 年 2 月)样本, 均由浙江省水产技术推广总站提供。采用 1.8 中的方法提取样本基因组 DNA, 然后采用 1.5 中的 RPA-Cas12a 体系及 Qiu 等建立的 qPCR

检测方法^[21], 同时进行实际样本的检测, 比较 2 种方法的检测一致性。参照终点荧光值法进行 RPA-Cas12a 结果的判定^[22], 即待测样本的终点荧光值 ≥ 3 倍阴性对照的终点荧光值, 则待测样本含有 DIV1, 否则不含 DIV1。

2 结果与分析

2.1 crRNA 的筛选

RPA-Cas12a 检测十足目虹彩病毒 1 (DIV1) 的流程如图 1 所示。首先采用 RPA-Cas12a 方法比较和筛选已制备的 4 组 DIV1-crRNA (DIV1-crRNA-1–4), 实验结果(图 2)表明, DIV1-crRNA-4 与其他 3 组 (DIV1-crRNA-1、DIV1-crRNA-2 和 DIV1-crRNA-3) 相比, 其荧光值及起峰时间最优。因此, 后续实验均选用 DIV1-crRNA-4 进行, 其转录的序列为 5'-UAAUUUCUACUAAGUGUGAGAU CGGUGCCUAUGGGAUCGAAU-3'。

2.2 RPA-Cas12a 分析灵敏度试验结果

以 8 个梯度稀释(10^7 – 10^0 copies/reaction) 的阳性质控品及无 RNA 酶水为模板进行 RPA-Cas12a 检测。结果如图 3 所示, 10^7 – 10^1 copies/reaction 7 个质粒浓度为模板的检测反应荧光值之间均无差异, 而且荧光强度均显著高于 10^0 copy/reaction 为模

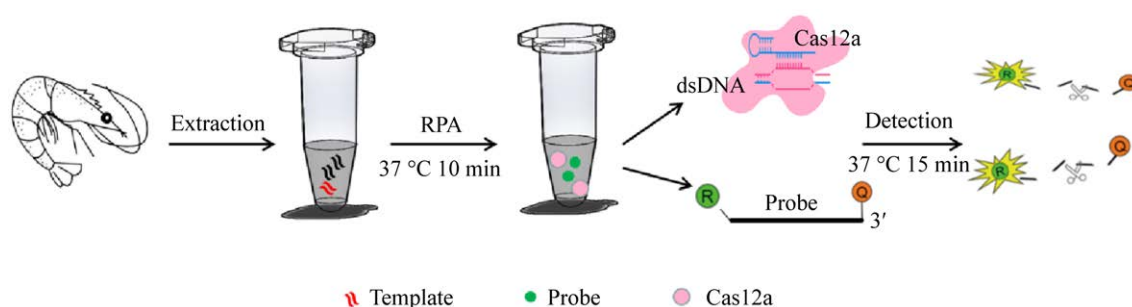


图 1 RPA-Cas12a 检测十足目虹彩病毒 1 (DIV1) 的原理

Figure 1 Schematic diagram of the detection of DIV1 by RPA-Cas12a method

注: RPA-Cas12a 检测方法的原理: 首先从对虾中提取十足目虹彩病毒 1 (DIV1) DNA, 然后进行重组酶聚合酶扩增(RPA), 反应结束后, 在体系中添加 Cas12a 蛋白及探针, Cas12a 切割探针后的荧光值反映 DIV1 的含量

Note: RPA-Cas12a method starts with the extraction of Decapod iridescent virus 1 (DIV1) DNA from *Litopenaeus vannamei*. After the extracted targets are converted to RPA reaction, Cas12a and reporting probes are added to the system. Cas12a cleaves targets and probes, releasing fluorescence, allowing direct detection of DIV1 DNA

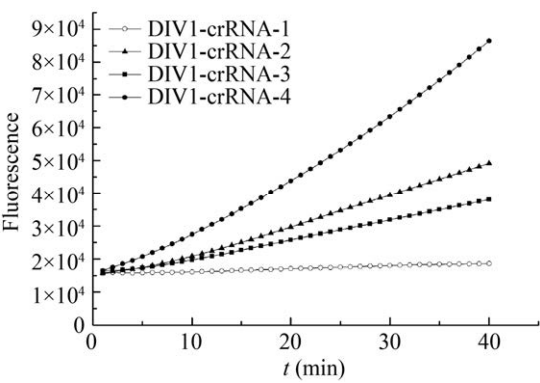


图 2 DIV1-crRNA 的筛选结果
Figure 2 Screening results of DIV1-crRNA

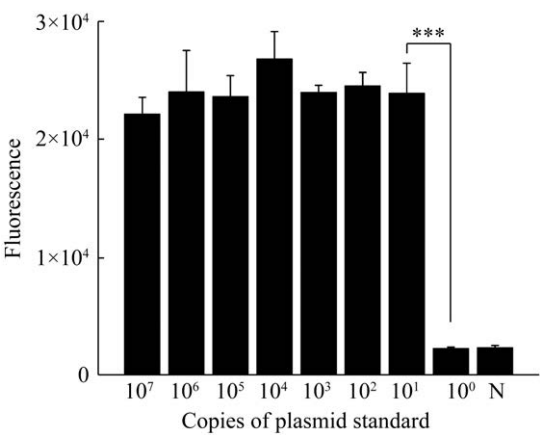


图 3 RPA-Cas12a 灵敏度试验结果
Figure 3 Sensitivity detection results of RPA-Cas12a
Note: N: No template; ***, $P<0.01$

板的反应($P<0.01$); 10^0 copy/reaction 为模板的反应荧光信号值与空白对照之间无统计学意义。因此,本研究建立的 RPA-Cas12a 方法的检测限为 10^1 copies/reaction。

2.3 RPA-Cas12a 分析特异性试验结果

RPA-Cas12a 的分析特异性试验检测结果如图 4 所示,仅 DIV1 样品出现扩增曲线,空白对照(无 RNA 酶水)、WSSV、IHHNV 及 EHP 样品均未出现扩增,表明本 RPA-Cas12a 检测体系能特异性扩增检测出 DIV1 中的靶序列,而不与其他病原体的核酸发生交叉反应,说明本检测方法特异性好,未出现假阳性。

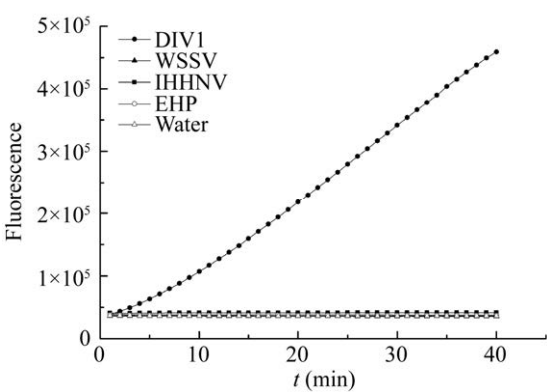


图 4 RPA-Cas12a 特异性试验结果
Figure 4 Specificity detection results of RPA-Cas12a

2.4 实际样本检测效果评价

对 2 批南美白对虾虾苗(2019 年 10 月及 2021 年 2 月)样本提取 DNA 后,同时采用本研究建立的 RPA-Cas12a 方法和已报道的 qPCR 法对样本中的 DIV1 进行检测。结果显示,2 种方法对 2 批南美白对虾虾苗中 DIV1 的检测结果均为 2019 年 10 月样本检出阳性 8 份,阴性 2 份;2021 年 2 月样本检出阳性 27 份,阴性 24 份;因此 2 种方法的检测效果一致(表 2)。

3 讨论

近年来,对虾养殖行业迅速发展,已成为我国海水养殖业的支柱性产业之一。然而,对虾病毒病原的感染和病毒性流行病的暴发,每年都给对虾养殖业带来巨大的经济损失,因此对对虾病毒病原的研究,一直是各国学者研究的热点之一。目前对于该病主要采取预防为主,因此采用

表 2 RPA-Cas12a 和 qPCR 方法对对虾样本中的 DIV1 检测结果

检测时间 Detection time	样本数量 Sample number	阳性样本数量 The number of positive samples		阴性样本数量 The number of negative samples	
		RPA-Cas12a	qPCR	RPA-Cas12a	qPCR
201910	10	8	8	2	2
202102	51	27	27	24	24

高效灵敏的检测手段,对对虾苗及其生长期进行实时检测,能够大大减少损失。目前诊断 DIV1 感染的方法主要有电子显微镜、巢式 PCR、qPCR、环介导等温扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)技术和 RPA 等方法。然而前 3 种方法需要昂贵的设备、复杂的程序和训练有素的人员,因此只能在专业实验室进行,不能满足养殖单位现场快速检测的需要。LAMP 和 RPA 可以在恒温条件下进行反应弥补上述方法的不足,实现不依赖于专业仪器和人员的核酸检测。但 LAMP 技术存在容易因非特异性扩增导致假阳性高的问题,在实际检测中存在一定的缺陷;RPA 技术引物设计简单,扩增效率高,但是其使用的探针设计复杂,费用昂贵。已有研究证实 Cas12a 附属剪切活性可用于核酸检测,而且具有高度特异性,通过侧流检测可以实现不依赖于仪器的诊断方法^[15]。因而 RPA 与 Cas12a 相结合,可以扬长避短,由 RPA 进行样品扩增可提高检测系统的灵敏度, Cas12a 对扩增产物进行检测可增加检测的特异性。

本研究采用了最新的 RPA 技术结合 CRISPR 检测系统,该技术由 Chen 等发明,这种 CRISPR-Cas 结合重组酶介导的快速检测系统具有快速、灵敏、特异、便携等许多优点^[15]。截至目前,水产病原检测方法的研究报道, LAMP 检测 DIV1 的灵敏度为 354 copies/reaction^[13],检测 WSSV 的灵敏度为 225–0.225 copies/ μ L^[23]; TaqMan qPCR 检测 DIV1 的灵敏度可低至 1.2 copies/reaction 或 4 copies/reaction^[20,24]; RPA 检测 DIV1 的灵敏度为 11 copies/reaction^[25],检测 IHNV 的灵敏度为 4 copies/reaction^[26]。但以上检测方法或依赖专业人员和设备(qPCR),或假阳性较高(LAMP),或特异性不强(RPA)。本研究建立的方法 CRISPR-Cas12a 检测和 RPA 反应均在同一恒温下进行,整个检测过程只需要一台便携的恒温荧光检测仪即可完

成,检测 DIV1 的灵敏度为 10¹ copies/reaction; 另外,本检测方法能特异性地检测 DIV1,而对 WSSV、IHNV、EHP 无交叉反应(图 4)。如若将 RPA-Cas12a 结合免核酸提取技术,该方法有望应用于基层单位和现场使用的快速检测。

4 结论

本研究将 RPA 技术与 CRISPR-Cas12a 系统相结合,建立一种新的对虾十足目虹彩病毒 1 检测技术(RPA-Cas12a),可在 40 min 左右检测该病毒 DNA,具有简单快速、灵敏度高、特异性强、操作方便等优点,为该病毒的早期快速诊断提供了新方法,也为其他病原体快速分子检测方法的建立提供了新思路。

REFERENCES

- [1] Li SK, Jiang M, Dai XL, Liu LP, Hu WG, JAMES S. Comparative analysis of water quality in *Litopenaeus vannamei* ponds and nutritional quality of shrimp muscle[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(6): 955-964 (in Chinese)
李世凯,江敏,戴习林,刘利平,胡伟国, JAMES S. DIANA. 凡纳滨对虾池塘水质及对虾肌肉品质的对比分析[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(6): 955-964
- [2] Yuan JB. Phylogenetic and adaptive evolution analysis of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2014 (in Chinese)
袁剑波. 凡纳滨对虾系统发生地位及适应性进化分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文, 2014
- [3] Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, Compiled by China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook-2020[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2020 (in Chinese)
农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编制. 中国渔业统计年鉴-2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020
- [4] Sun SY, Jiang M, Jin RC, Dai XL, Wu H, Zhou JF, Yu ZL, Zhang F. Correlation between water quality and shrimp hemocyte iridescent virus disease occurrence of *Litopenaeus*

- vannamei* in ponds[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 29(5): 641-649 (in Chinese)
- 孙世玉, 江敏, 金若晨, 戴习林, 吴昊, 周俊芳, 于忠利, 张峰. 凡纳滨对虾池塘养殖过程中水质与虾虹彩病毒病发生的相关性[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(5): 641-649
- [5] Lin N, Yuan LH, Wu B, Lin GQ, Wang QH, Chen HD, Zhang J, Xu ZH, Yan ZH, Yang ZW, et al. Development situation analysis of Fujian prawn industry[J]. China Fisheries, 2019(2): 46-50 (in Chinese)
- 林楠, 元丽花, 吴斌, 林国清, 王巧煌, 陈何东, 张健, 许智海, 严志洪, 杨章武, 等. 福建对虾产业发展形势分析[J]. 中国水产, 2019(2): 46-50
- [6] Wang GX, Peng D, Song ZQ, Yang Q, Du YE, Shen JJ. Preliminary investigation and prevention countermeasures of *Litopenaeus vannamei* SHIV in Zhejiang Pinghu[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2018, 45(3): 141-143 (in Chinese)
- 王甘翔, 彭颀, 宋之琦, 杨庆, 都月娥, 沈佳健. 浙江省平湖市南美白对虾虹彩病毒病初步调查及防控措施[J]. 水产科技情报, 2018, 45(3): 141-143
- [7] Yan DC, Chen BK. Pathogenicity of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV): a review[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 167-172 (in Chinese)
- 闫冬春, 陈博堃. 传染性皮下及造血组织坏死病毒致病性研究进展[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 167-172
- [8] Jiang G, Shen H, Wan XH, Qiao Y. Progress on acute hepatopancreas necrosis syndrome in *Litopenaeus vannamei*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 39(4): 87-91 (in Chinese)
- 蒋葛, 沈辉, 万夕和, 乔毅. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死综合征研究进展[J]. 动物医学进展, 2018, 39(4): 87-91
- [9] Tangprasittipap A, Srisala J, Chouwdee S, Somboon M, Chuchird N, Limsuwan C, Srisuvan T, Flegel TW, Sritunyalucksana K. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. BMC Veterinary Research, 2013, 9(1): 1-10
- [10] Qiu L, Chen MM, Wan XY, Li C, Zhang QL, Wang RY, Cheng DY, Dong X, Yang B, Wang XH, et al. Characterization of a new member of *Iridoviridae*, shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 11834-11846
- [11] Qiu L, Chen X, Zhao RH, Li C, Gao W, Zhang QL, Huang J. Description of a natural infection with decapod iridescent virus 1 in farmed giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Viruses, 2019, 11(4): 354-367
- [12] Gong HY, Li QY, Zhang H, Ye L, Shi L, Feng YH. Development and comparison of qPCR and qLAMP for rapid detection of the decapod iridescent virus 1 (DIV1)[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2021, 182(3): 107567-107573
- [13] Zou Y, Guo XM, Wan XY, Qiu L, Zhang QL. Establishment and application of the LAMP detection method for decapod iridescent virus 1 (DIV1)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 156-164 (in Chinese)
- 邹莹, 郭晓萌, 万晓媛, 邱亮, 张庆利. 十足目虹彩病毒 (DIV1) 环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法的建立及应用[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 156-164
- [14] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821
- [15] Chen JS, Ma EB, Harrington LB, Da Costa M, Tian XR, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439
- [16] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, Van Der Oost J, Regev A, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771
- [17] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204
- [18] Li J, MacDonald J, Von Stetten F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification[J]. The Analyst, 2018, 144(1): 31-67
- [19] Li XH, Feng J, Xie FX, Wang BR, He M, Zhang YG, Ma F, Chen Q. Feasibility of transfusion-related pathogen nucleic acid detection method by recombinase polymerase amplification combined with Cas12a[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2020, 33(5): 453-458 (in Chinese)
- 李晓红, 冯佳, 谢芳莘, 王蓓蕊, 何苗, 张勇刚, 马峰, 陈强. 重组酶聚合酶扩增结合 Cas12a 输血相关病原体核酸检测方法的可行性[J]. 中国输血杂志, 2020, 33(5): 453-458
- [20] Wang B, Wang R, Wang DQ, Wu J, Li JX, Wang J, Liu HH, Wang YM. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(19): 12156-12161
- [21] Qiu L, Chen MM, Wan XY, Zhang QL, Li C, Dong X, Yang B, Huang J. Detection and quantification of shrimp hemocyte iridescent virus by TaqMan probe based real-time PCR[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 154: 95-101

- [22] Li H, Sun YS, Dong X, Wang YH, Kou ZH, Zhou YS, Yang MJ. crRNA target point and CRISPR-Cas13a system for detecting Ebola virus: CN110628955A[P]. 2019-12-31 (in Chinese)
李浩, 孙岩松, 董雪, 王彦贺, 寇志华, 周育森, 杨明娟. 一种用于检测埃博拉病毒的crRNA靶点及CRISPR-Cas13a系统: CN110628955A[P]. 2019-12-31
- [23] Wu LY. Establishment of rapid detection for shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(6): 478-486 (in Chinese)
吴丽云. 对虾白斑综合征病毒可视化环介导等温扩增(LAMP)快速检测方法的建立[J]. 渔业研究, 2019, 41(6): 478-486
- [24] Qiu L, Chen X, Guo XM, Gao W, Zhao RH, Zhang QL, Yang B, Huang J. A TaqMan probe based real-time PCR for the detection of Decapod iridescent virus 1[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 173: 107367
- [25] Chen ZW, Huang J, Zhang F, Zhou Y, Huang HJ. Detection of shrimp hemocyte iridescent virus by recombinase polymerase amplification assay[J]. Molecular and Cellular Probes, 2020, 49: 101475
- [26] Xia XM, Yu YX, Hu LH, Weidmann M, Pan YJ, Yan SL, Wang YJ. Rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) by real-time, isothermal recombinase polymerase amplification assay[J]. Archives of Virology, 2015, 160(4): 987-994