

GI 和 GII 诺如病毒 RAA 可视化快速检测方法的建立

林志伟¹, 杨艳歌², 吴占文^{2,3}, 王帅^{2,3}, 李涛², 李红娜², 袁飞^{2*}

¹ 黑龙江八一农垦大学农学院 黑龙江大庆 163000

² 中国检验检疫科学研究院 市场监管重点实验室(食品质量与安全) 北京 100176

³ 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 黑龙江大庆 163000

摘要 诺如病毒(NoV)是引起全球急性肠胃炎疾病的主要病原体之一,极易爆发传播,增加医疗与经济负担。目的:通过重组酶介导等温扩增技术(RAA)开发一种新型的 NoV 检测方法。方法:根据 ISO TS 15216-2-2013、GB 4789.42 规定的 GI 和 GII NoV 检测靶标所对应的 cDNA 序列,设计并筛选最佳 RAA 引物及探针,确定其对其它常见食源性腹泻病毒的特异性。通过优化确定最短检测时间、反应程序以及反应体系,分析该检测体系下对 NoV 参考质粒和真实样本检测的灵敏度,从而建立 GI 和 GII NoV RAA 可视化快速检测方法。结果:所建立的 RAA 检测方法特异性好,与其它食源性病毒无交叉反应。在保证扩增效率的前提下,优化后的反应程序可将检测时间缩短为 10 min 左右,反应成本可减少三分之二。对参考质粒和真实样本检测的灵敏度分别达 10^{-2} ng/ μ L 和 1 ng/ μ L。结论:本试验建立的两种 NoV 检测方法特异性强、灵敏度高,且简单、快速、可视,为今后 NoV 快速检测奠定良好的基础。

关键词 诺如病毒(NoV); 重组酶介导等温扩增(RAA); 可视化; 快速检测

文章编号 1009-7848(2023)12-0196-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.021

诺如病毒(Norovirus, NoV)是杯状病毒科,诺如病毒属成员,可以感染人体并引发病毒性肠胃炎,感染者会产生呕吐、腹泻等急性肠胃炎症状^[1-2],是造成全球非细菌性肠胃炎的重要病原体^[3]。NoV 可以感染所有年龄段的人群,具有变异快、环境抵抗力强、感染剂量低、感染途径多样、潜伏期短等特点^[4],在冬春季高发。目前,GI、GII 以及 GIV 型 NoV 是感染人类的主要基因型^[5]。GII NoV 更是被称为继轮状病毒与肠聚合性大肠杆菌后的第三大常见的病原体^[6]。近年来,国内多地报道出现 NoV 感染聚集疫情,而且还存在与其它病原合并感染、加重病情现象,占用医疗资源的同时,也给我国经济带来极大的损失,这可能与全国范围的 NoV 急性胃肠炎暴发监测工作起步较晚,大多数地区不具备完整的检测体系或缺乏相应的检测能力有关^[7-9]。因此,人们对 NoV 引发的食源性疾病的防治越来越重视^[10-13]。该病毒无法像其它病原微生物一样在体外进行增殖培养,且由于 NoV 自身

很容易发生突变的特征,因此目前尚未研制出特定的抗病毒药物及有效预防 NoV 感染的疫苗^[14],只能通过加强对食品的管控及早期风险筛查来避免 NoV 爆发^[15]。

为了从源头上避免 NoV 感染事件的发生,研究人员针对 NoV 开发出许多快速检测方法,例如免疫层析技术^[16-17]、生物传感器技术^[18]、环介导等温扩增技术^[19]等,然而这些方法在实际快速检测 NoV 的同时,或多或少存在一些限制,因此,开发新型的 NoV 检测方法是一个重要的科学问题。重组酶介导等温核酸扩增技术(Recombinase Aided Amplification, RAA)是一种利用重组酶、单链结合蛋白、DNA 聚合酶在等温条件下(最佳温度 37 °C)进行核酸扩增的技术^[20]。其原理是由重组酶、单链结合蛋白与引物形成复合体扫描双链 DNA,在与引物同源的序列处使双链 DNA 解旋,在能量和 dNTP 存在的情况下,由 DNA 聚合酶完成链的延伸^[21-22]。由于 RAA 技术具有可摆脱对传统 PCR 仪器的限制,且操作简单,能用于现场检测等优点,因成为目前病原体快速筛查的研究热点^[23]。目前被广泛应用于猫冠状病毒^[24]、鲤浮肿病毒^[25]、沙门氏菌^[26]、乙肝病毒^[27]、冠状病毒^[28]等众多病原微生物的检测中。

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100900, 2022YFF0607900)

第一作者: 林志伟,男,硕士,副教授

通信作者: 袁飞 E-mail: feyyuan@163.com

本试验以包含 GI 和 GII NoV 靶基因的病毒样颗粒重组质粒为参考样品, 针对 GI NoV 设计出 2 组 RAA 引物、3 种 RAA 荧光法引物探针组合; 针对 GII NoV 设计出 6 组 RAA 引物、9 种 RAA 荧光法引物探针组合, 分别筛选出 GI 和 GII NoV 检测的最佳引物及探针, 并依次进行特异性检测, 反应程序优化, 反应体系优化, 以及对真实样本检测的灵敏度分析等试验, 旨在建立特异灵敏、简单高效的 GI 和 GII NoV 显色法和荧光法两种 RAA 可视化快速检测方法, 为 NoV 的现场快速筛查提供方法支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

GI 和 GII NoV 真实粪便样本由中国检验检疫科学研究院卫生检验与检疫研究所提供, 轮状病毒与甲型肝炎病毒样品由中国海关科学技术研究中心惠赠。

RAA 核酸扩增试剂盒、RAA 核酸扩增试剂盒(荧光法), 江苏奇天基因生物科技有限公司; RNeasy Mini Kit 试剂盒, 凯杰企业管理(上海)有限公司; 通用反转录试剂盒(M-MLV, 不含 Taq 酶)、酚: 氯仿: 异戊醇(体积比 25:24:1) 试剂、SYBR Green I 核酸染料, 北京索莱宝科技有限公司; DL 5000 DNA Ladder、DL 2000 DNA Ladder, 北京百泰克生物技术有限公司; DEPC 水, 碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

PCR 仪 BIO-RAD T100 Thermal Cycler、离心机 Pico17 (离心力 $\geq 12\ 000\ g$), 美国 Thermo Scientific 公司; 电泳仪、全自动凝胶成像系统 PharosFX, 美国伯乐(BIO-RAD)公司; 涡旋仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 智能化超微量核酸检测仪, 日本岛津公司; 迷你 qPCR 仪, 上海翊辉生物科技有限公司; 移液器、混匀仪, 德国 Eppendorf 公司; 生物安全柜, 美国 NUAIRE 公司; 离心管、八连排 PCR 管, 美国 Axygen 公司。

1.3 方法

1.3.1 GI NoV 核酸参考样品构建 由于前期未收集到 GI NoV 真实样本, 因此选取国际标准 ISO TS 15216-2-2013 与国标 GB 4789.42-2016 中规

定的 GI NoV 检测靶标 (GenBank 登录号: M87661.2) 所对应的 496 bp 的 cDNA 序列, 委托北京六合华大基因科技有限公司进行人工合成, 并在合成序列的 5' 端和 3' 端分别加入了酶切位点 *Sal* I 及 *Xho* I, 然后克隆到 pMV 载体中, 以代替 GI NoV 真实样品进行试验。采用 *Sal* I 和 *Xho* I 对重组质粒进行双酶切鉴定, 酶切体系为: 10 μL 质粒样品, *Sal* I 和 *Xho* I 酶各 1 μL ; 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 40 min, 使用 1.5% 的胶对重组质粒以及 *Sal* I 和 *Xho* I 双切酶后的产物进行电泳鉴定, 电泳条件: 160 V 电压 20 min, 并对重组质粒和酶切产物进行测序验证。

1.3.2 引物及探针的设计筛选 提取 ISO TS 15216-2-2013、国标 GB 4789.42-2016 规定的参考毒株 GI (GenBank: M87661.2) 和 GII (GenBank: X86557.1) NoV, 以及轮状病毒、甲型肝炎病毒等常见腹泻病毒的全基因组序列, 选取目前主要用于 NoV 分群分型的开放阅读框 1 (Open Reading Frame 1, ORF1) 与开放阅读框 2 (Open Reading Frame 2, ORF2) 的保守区域的依赖性 RNA 聚合酶和结构蛋白 VP1 序列, 利用 Clustal X 软件进行序列比对, 根据 RAA 引物设计原理, 利用 Primer Premier 5.0 软件在种间差异区域分别设计 GI 和 GII NoV 的特异性 RAA 引物和探针, 序列信息如表 1 所示, 并委托北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.3.3 RAA 显色法检测 RAA 检测体系参照 RAA 核酸扩增试剂盒说明书制备每份样本的预混液: 缓冲液 25 μL , 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , dd H₂O 15.5 μL 。取 44.5 μL 上述预混液转移至带有冻干粉 PCR 管中, 轻柔手弹使冻干粉充分重溶均匀, 并短暂离心将液体收集至管底。随后在管盖中加入 2.5 μL 的乙酸镁溶液, 在管内反应体系中加入 3 μL 的模板, 轻轻盖好管盖, 通过短暂离心使乙酸镁进入反应单元中, 短暂振荡混匀并再次快速离心, 放入 PCR 仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 40 min。反应结束后取 25 μL 扩增产物加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 试剂, 振荡混匀后离心, 使用 2% 琼脂糖凝胶对上层溶液进行电泳鉴定。余下扩增产物加入 1 μL 1 000 \times SYBR Green I 核酸染料混匀后直接观

表1 GI和GII NoV RAA检测引物及探针序列

Table 1 RAA primer and probe sequence

基因群	引物探针	序列(5'→3')
GI	GIF1	GTATGTCCCAGGATGGCAGGCCATGTTC
	GIR1	CCACGCTTGATGTAGCGTCCTTAGACGC
	GIF2	ATGTATGTCCCAGGATGGCAGGCCATGT
	GIR2	TCCGGTACCAACTGACCAGCGCCACTAG
	GIP1/2	GACCTCGGATTGTGGACAGGAGATCGCGA [FAM-dT][THF][BHQ1-dT]TCTGCCCGAATTCGT[c3-spacer]
	GIP2	TCCGCTGGATGCGCTTCCATGACCTCGGAT[FAM-dT][THF][BHQ1-dT]GGACAG[c3-spacer]
GII	GIIF1	TGAGATTCTCAGATCTGAGCACGTGGGA
	GIIR1	ATTATTGACCTCTGGGACGAGGTTGGCT
	GIIF2	CAGAACTGAAGGAAGGTGGCATGGATT
	GIIR2	TTATTGACCTCTGGGACGAGGTTGGCTG
	GIIF3	GTTTCAGATGGATGAGATTCTCAGATCTG
	GIIR3	TATTGACCTCTGGGACGAGGTTGGCTGC
	GIIF4	GCAGAACTGAAGGAAGGTGGCATGGATT
	GIIR4	ATTATTGACCTCTGGGACGAGGTTGGCT
	GIIF5	TTACGTGCCCAGACAAGAGCCAATGTTTCAG
	GIIR5	GTCATTGACGCCATCTTCATTACAAAAGC
	GIIF6	TACTTAGGCAAATGTACTGGACTAGAGGC
	GIIR6	TTCCTTCAGTTCTGCAATGACTAGCTTG
	GIIP2/4	CGTGCCAGACAAGAGCCAATGTTTCAGA [FAM-dT]G [THF]A [BHQ1-dT]GAGATTCTCAGATC [c3-spacer]
	GIIP2/3/4	GGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGCTT[FAM-dT][THF][BHQ1-dT]GAATGAAGATGGCGT[c3-spacer]
	GIIP1/2/3/4	GGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGCTTTG[FAM-dT]G[THF]A[BHQ1-dT]GAAGATGGCGTCAAT[c3-spacer]

测检测结果,扩增效果良好溶液呈绿色,无扩增时溶液呈橙色,绿色越深则表示扩增效果越好。

1.3.4 RAA 荧光法检测 RAA 荧光法检测反应体系参照 RAA 核酸扩增试剂盒(荧光法)使用说明制备每份样本的预混液:缓冲液 25 μL ,正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)2.1 μL ,反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)2.1 μL ,探针(10 $\mu\text{mol/L}$)0.6 μL ,ddH₂O 14.7 μL 。将上述预混液转移至带有冻干粉的 PCR 管中,轻柔手弹使冻干粉充分重溶均匀后进行短暂离心。在管盖中加入 2.5 μL 的乙酸镁溶液,在管内反应体系中加入 3 μL 的模板,轻轻盖好管盖,短暂离心使乙酸镁进入预混液中,通过短暂振荡混匀所有反应体系并再次快速离心,放入迷你 qPCR 仪中反应,反应程序为:37 $^{\circ}\text{C}$ 1 s;37 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,50 个循环;在第二反应阶段收集 FAM 荧光信号。扩增结果出现荧光法曲线判定为阳性,未出现荧光曲线判断

为阴性。

1.3.5 RAA 检测特异性分析 使用无 RNA 酶 ddH₂O 分别对 GII 诺如病毒、轮状病毒和甲型肝炎病毒粪便样本进行重悬混匀,用移液枪吸取少量样品至离心管中。使用 RNeasy Mini Kit 试剂盒,对 3 种食源性病毒进行 RNA 提取,使用智能化超微量核酸检测仪对提取出的 RNA 浓度进行测定。按照通用反转录试剂盒(M-MLV,不含 *Taq* 酶)说明书,将 3 种病毒的 RNA 反转录成 cDNA。以 GI NoV 全基因组合成质粒和 GII NoV 的 cDNA 为真实样品模板,甲型肝炎病毒和轮状病毒的 cDNA 作为试验对照,ddH₂O 为空白对照,分别进行与 RAA 荧光法快速检测,每个反应设置两个平行,并进行 3 次重复试验。

1.3.6 检测程序优化

1.3.6.1 RAA 显色法快速检测程序的优化 为探

究建立的 RAA 显色法对 NoV 检测的最短扩增时间,试验对 1.3.3 节 RAA 反应程序进行优化,以达到最快检测的目的。采用筛选的最佳引物进行 RAA 检测,分别进行 37 °C 扩增 40,30,20,10 min,以 ddH₂O 为空白对照。反应结束后,用 2% 琼脂糖凝胶电泳和 SYBR Green I 核酸染料显色结果综合判断,确定最短检测时间,并进行 3 次重复试验。

1.3.6.2 RAA 荧光法快速检测程序的优化 为探究建立的 RAA 荧光法对 NoV 检测的最短扩增时间,本试验对筛选出的 RAA 荧光法最佳引物探针组合进行扩增程序的优化,在 1.3.4 节 RAA 荧光法反应程序的基础上,将第二阶段的反应程序的时间和循环数分别调整为:15 s、50 循环,15 s、40 循环,10 s、40 循环,5 s、40 循环,根据荧光扩增曲线确定最快反应程序。试验过程中均以 ddH₂O 为空白对照,每个反应设置 2 个平行,并进行 3 次重复试验。

1.3.7 检测体系优化 本试验将筛选的最佳引物和探针分别对和 RAA 荧光法不同反应体系进行测试,以确定 RAA 检测最小反应体系,达到优化检测成本的目的。分别按照 48,24,16,12 μL 配置和 RAA 荧光法反应体系,采用上述试验建立的快速反应体系程序进行扩增,同时以 ddH₂O 为空白对照,每个反应设置 2 个平行,并进行 3 次重复试验。

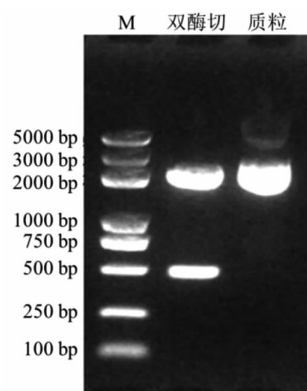
1.3.8 建立的 NoV RAA 可视化快速检测方法灵敏度分析 为分析上述确立的 RAA 显色法与荧光法快速检测程序和检测体系对 NoV 检测的灵敏度,将 GI NoV 全因组合成质粒参考样品浓度分别调整为 1,10⁻¹,10⁻² ng/μL,GII 真实样本模板浓度分别调整为 20,10,1 ng/μL,采用上述建立的 RAA 可视化快速检测方法进行试验,分析两种方法对 NoV 参考样品和真实样本的检出限,每个反应设置两个平行,ddH₂O 为空白对照,并进行 3 次重复试验。

2 结果与分析

2.1 NoV GI 核酸参考样品鉴定

提取包含 GI NoV 目的片段的重组质粒,并进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示在 3 277 bp

附近有条带,长度符合预期,如图 1 所示。同时采用 *Sal* I 和 *Xho* I 对重组质粒进行双酶切鉴定,可分别获取 2 769 bp 的载体和长度为 508 bp 的目的片段,条带清晰,长度符合预期,结果如图 1 所示。且重组质粒和酶切产物的测序结果正确,证实重组质粒构建成功,命名为 pMV-NoV GI。



注:M 为 DL5000 DNA ladder。

图 1 GI NoV 重组质粒酶切鉴定电泳图

Fig.1 Enzyme digestion of NoV GI recombinant plasmid

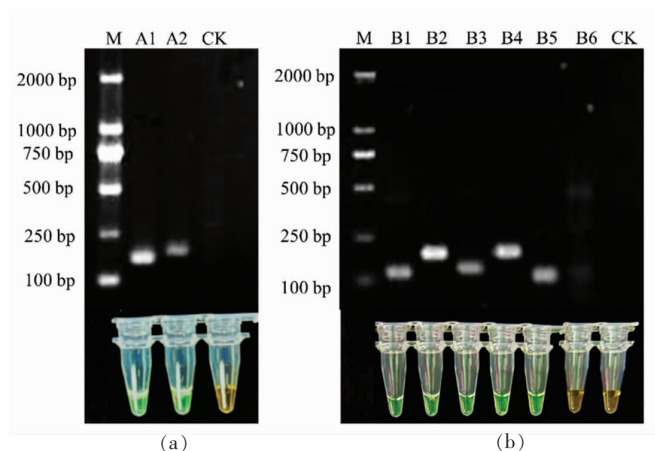
2.2 NoV RAA 检测引物及探针的筛选

2.2.1 RAA 显色法检测引物的筛选 分别对设计的 2 组 GI NoV 引物与 6 组 GII NoV 引物进行 RAA 检测,通过琼脂糖凝胶电泳与显色结果筛选最佳引物,GI 和 GII NoV 的引物筛选结果分别如图 2a 和 2b 所示。结果表明:GI NoV 的 2 组引物中,GIF1 / GIR1 的扩增效果优于 GIF2 / GIR2;GII NoV 的 6 组引物中,GIIF2 / GIIR2 引物扩展效果最强。因此后续 RAA 显色法分别以筛选的 GIF1 / GIR1 和 GIIF2 / GIIR2 作为 GI 和 GII NoV 检测的最佳引物进行试验。

2.2.2 RAA 荧光法检测引物及探针的筛选 将 GI NoV 的 3 种引物探针组合(GIF1 / GIR1 / GIP1/2、GIF2 / GIR2 / GIP1/2、GIF2 / GIR2 / GIP2) 与 GII NoV 的 9 种引物探针组合(GIIF1 / GIIR1 / GIIP1/2/3/4、GIIF2 / GIIR2 / GIIP1/2/3/4、GIIF2 / GIIR2 / GIIP2/4、GIIF2 / GIIR2 / GIIP2/3/4、GIIF3 / GIIR3 / GIIP1/2/3/4、GIIF3 / GIIR3 / GIIP2/3/4、GIIF4 / GIIR4 / GIIP1/2/3/4、GIIF4 / GIIR4 / GIIP2/4、GIIF4 / GIIR4 / GIIP2/3/4) 分别使用 RAA 荧光法进行检测,通过比较荧光扩增曲线结果发现 GI NoV 的 3 种引物探针组合中,

GIF2/GIR2/GIP1/2 的扩增效果最好;GII NoV 的 9 种引物探针组合中,GIIF2/GIIR2/GIIP2/4 的扩展效果最好,结果如图 3a 与 3b 所示。因此后续

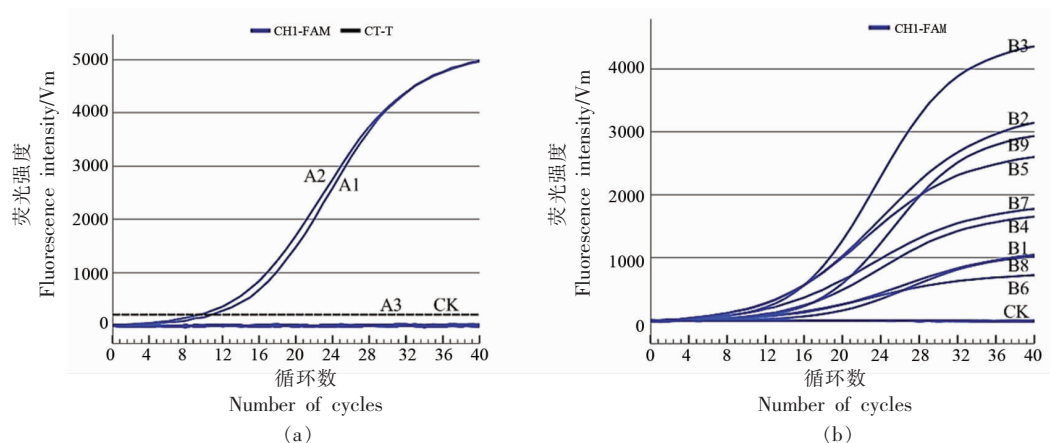
RAA 荧光法以筛选出的 GI NoV 最佳引物探针组合 GIF2/GIR2/GIP1/2;GII NoV 最佳引物探针组合 GIIF2/GIIR2/GIIP2/4 进行试验。



注:M 为 DL2000 DNA ladder;A1~A2 分别表示 GIF1 / GIR1、GIF2 / GIR2 引物对的扩增效果;B1~B6 分别表示 GIIF1 / GIIR1、GIIF2 / GIIR2、GIIF3 / GIIR3、GIIF4 / GIIR4、GIIF5 / GIIR5、GIIF6 / GIIR6 引物对的扩增效果,CK 为空白对照。

图 2 RAA 引物筛选

Fig.2 Screening of RAA primers



注:A1~A3 分别表示 GIF1/GIR1/GIP1/2、GIF2/GIR2/GIP1/2、GIF2/GIR2/GIP2 引物探针组合的扩增效果;B1~B9 分别表示 GIIF1/GIIR1/GIIP1/2/3/4、GIIF2/GIIR2/GIIP1/2/3/4、GIIF2/GIIR2/GIIP2/4、GIIF2/GIIR2/GIIP2/3/4、GIIF3/GIIR3/GIIP1/2/3/4、GIIF3/GIIR3/GIIP2/3/4、GIIF4/GIIR4/GIIP1/2/3/4、GIIF4/GIIR4/GIIP2/4、GIIF4/GIIR4/GIIP2/3/4 引物探针组合的扩增效果;CK 为空白对照。

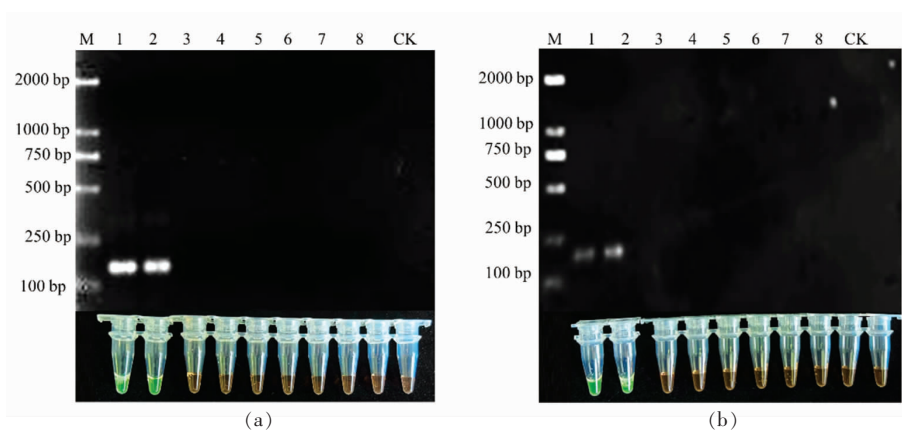
图 3 RAA 荧光法引物探针筛选

Fig.3 Screening of RAA fluorescent primers and probes

2.3 RAA 引物和探针特异性检测

为分析上述筛选出的最佳引物和探针组合对 NoV 检测的特异性,分别对 GI 核酸参考样品以及 GII NoV、轮状病毒、甲型肝炎病毒真实样本的 cDNA 进行 RAA 检测。RAA 显色法检测结果如图 4 所示,可以看出仅目标样品的电泳结果有明显的条带,显色结果呈现绿色,其它病毒对照均为橙

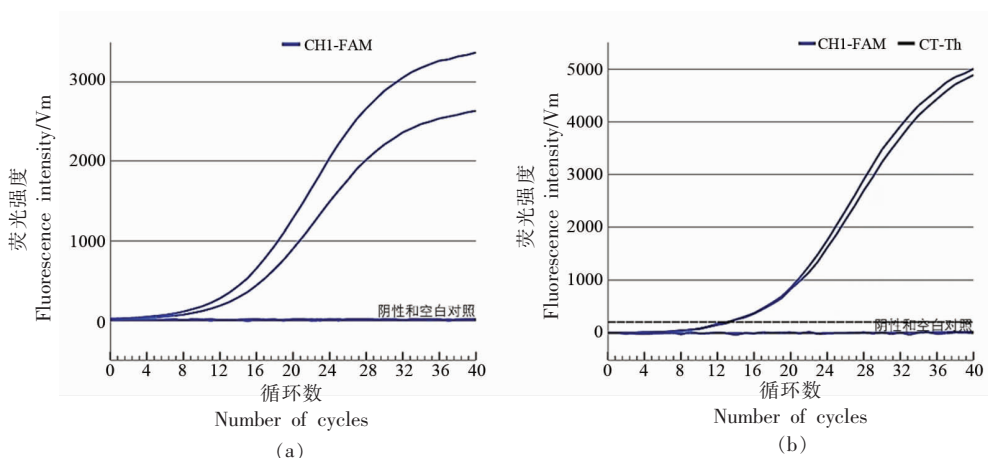
色。RAA 荧光法的检测结果如图 5 所示,可以看出筛选出的最佳引物和探针组合仅分别对 GI 或 GII NoV 有扩增,GI 与 GII NoV 之间无交叉反应,其它病毒均无扩增。以上结果表明本试验筛选的 GI 和 GII NoV 最佳引物和探针组合的特异性良好。



注: M 为 DL2000 DNA ladder; 图 a 为 GI NoV 显色法 RAA 引物特异性检测结果, 1~8 分别表示 GI NoV、GII NoV、轮状病毒、甲肝病毒; 图 b 为 GII NoV 显色法 RAA 引物特异性检测结果, 1~8 分别表示 GII NoV、GI NoV、轮状病毒、甲肝病毒。

图 4 ERA 显色法对 NoV 检测的特异性

Fig.4 Specificity of RAA chromogenic method for NoV detection



注: 图 a 为 GI NoV 荧光型 RAA 引物探针特异性检测结果, 图 b 为 GII NoV 荧光型 RAA 引物探针特异性检测结果。

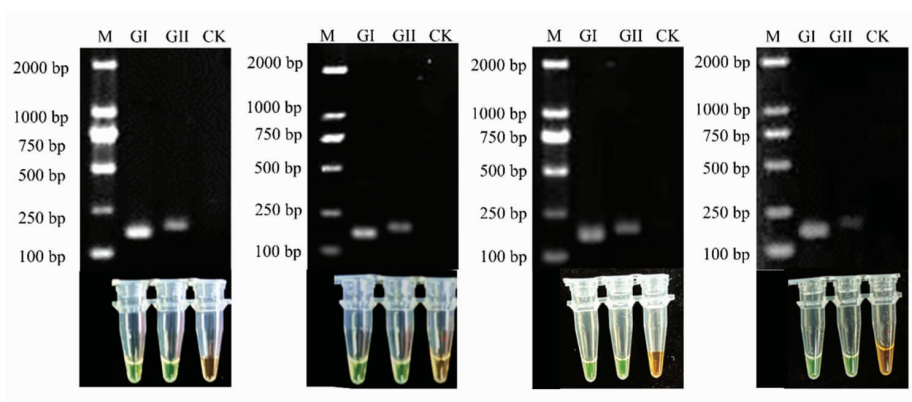
图 5 ERA 荧光法对 NoV 检测的特异性

Fig.5 Specificity of RAA fluorescence method for NoV detection

2.4 RAA 快速检测程序的优化

2.4.1 RAA 显色法快速检测程序的确定 为尽可能缩短 RAA 显色法的检测时间, 本试验采用 GI 和 GII NoV RAA 显色法最佳引物进行不同程序的扩增。结果表明: 目前筛选出的 RAA 最佳引物在 4 种扩增时间下均有良好的扩增效果, 当扩增时间减少为 10 min 时仍能检出, 但阳性样品的显色结果略带橙色, 电泳条带也开始变浅, 结果如图 6 所示。综合电泳结果与可视化显色结果, 确定本试验建立的 NoV RAA 显色法最短的检测程序为 37 °C 10 min。

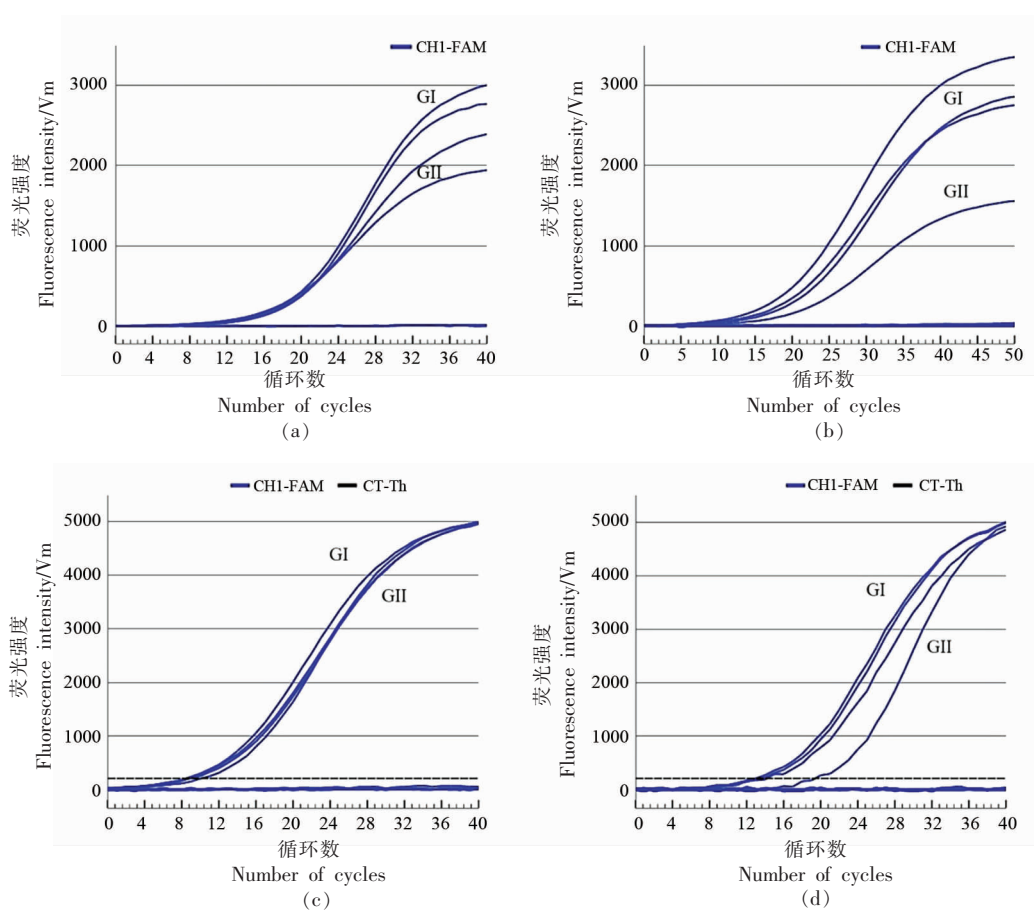
2.4.2 RAA 荧光法快速检测时间的确定 为尽可能缩短 RAA 荧光法的检测时间, 使用上述筛选出的最佳引物探针组合进行 RAA 荧光法扩增程序优化结果如图 7 所示。显示当反应程序缩短为 37 °C 1 s; 37 °C 5 s, 40 个循环时, 荧光曲线出现了明显的波动(图 7d), 说明其扩增效果开始下降, 此时扩增时间为 10 min 21 s。因此确定本试验建立的 RAA 荧光法最快检测程序为 37 °C 1 s; 37 °C 5 s, 40 个循环, 最短可在 10 min 21 s 完成对 NoV 的可视化检测。



注:M为DL2000 DNA ladder,图a~d时间分别表示扩增时间为40,30,20,10 min的检测结果,CK为空白对照。

图6 RAA显色法扩增程序优化

Fig.6 Optimization of amplification procedure for RAA chromogenic method



注:图a~d分别表示RAA荧光法第二阶段的反应程序分别设为15 s、50循环,15 s、40循环,10 s、40循环,5 s、40循环的扩增结果。

图7 RAA荧光法扩增程序优化结果

Fig.7 Optimization results of fluorescent RAA amplification program

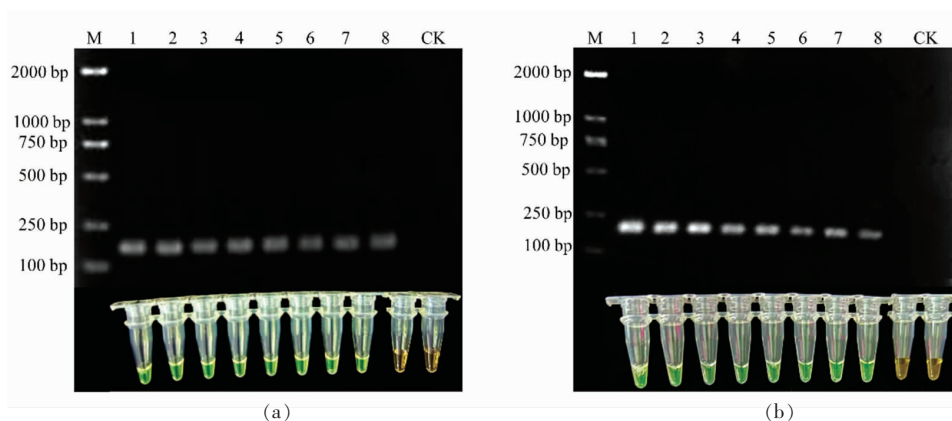
2.5 RAA可视化快速检测方法扩增体系优化

为尽可能降低试验成本,对RAA检测的反应体系进行优化,反应体系依次降为48,24,16 μL

和12 μL 。RAA显色法检测结果如图8所示,RAA荧光法的检测结果如图9所示。结果表明;两种方法在4种优化体系中均具有扩增效果,但当降到

12 μL 时, NoV G II 真实样本扩增的荧光值较低, 因此在保证试验结果的前提下, 最低可以将反应

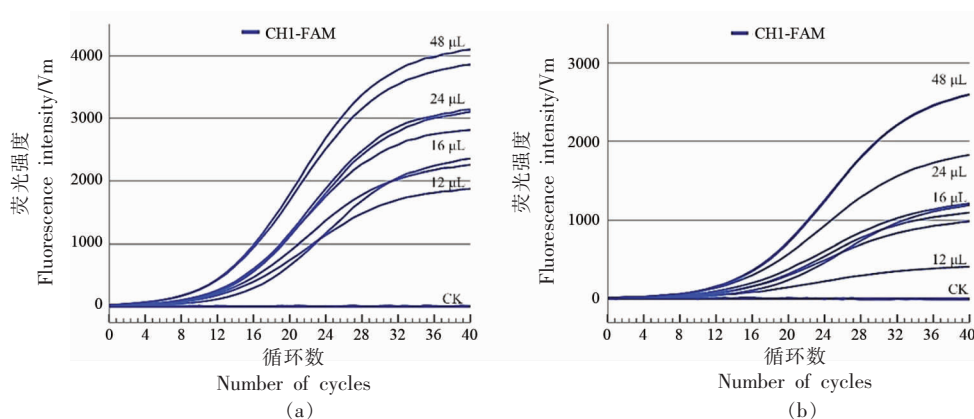
体系降到说明书推荐反应体系的 1/3, 从而达到节约试验成本的目的。



注: M 为 DL2000 DNA ladder, 图 a 为 GI NoV RAA 引物反应体系优化结果; 图 b 为 GII NoV RAA 引物反应体系优化结果。

图 8 RAA 显色法反应体系优化结果

Fig.8 Optimization results of the reaction system of RAA chromogenic method



注: 图 a 为 GI NoV RAA 引物探针反应体系优化结果; 图 b 为 GII NoV RAA 引物探针反应体系优化结果。

图 9 RAA 荧光法反应体系优化结果

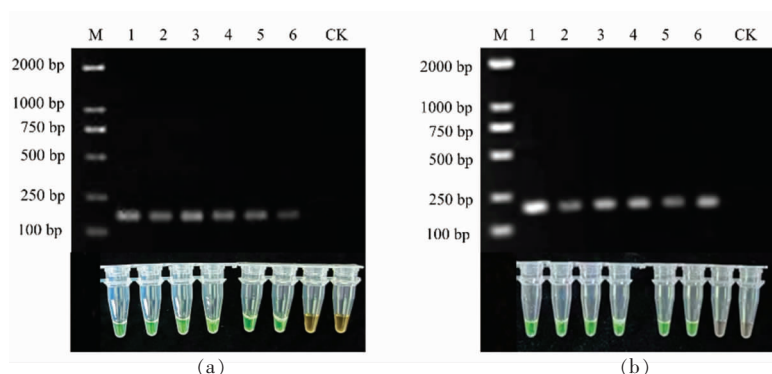
Fig.9 Optimization results of reaction system for fluorescent RAA method

2.6 RAA 可视化快速检测方法灵敏度分析

为探究本试验建立的 RAA 显色法和荧光法两种可视化快速检测方法对 GI 和 GII NoV 检测的灵敏度, 分别对质量浓度为 1, 10^{-1} , 10^{-2} $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 GI NoV 核酸参考样品, 模板质量浓度为 20, 10, 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 GII NoV 真实样本进行检测, 结果分别如图 10 与图 11 所示。结果表明: 两种可视化方法对 NoV 检测的灵敏度较好, 最低可检出 10^{-2} $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 GI NoV 核酸参考样品以及 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 GII NoV 真实样本。

3 讨论

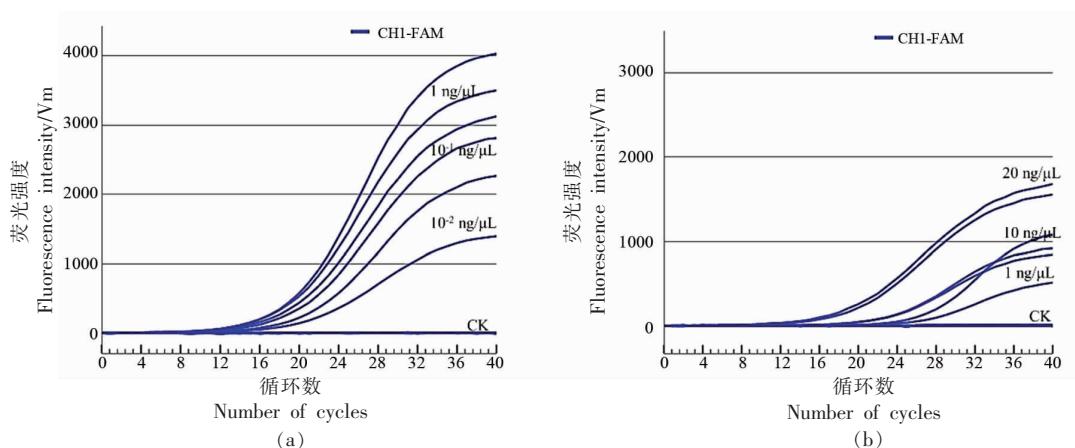
RAA 被称为是一种可以替代 PCR 的核酸扩增新技术, 不仅简单快速高效, 还可以摆脱对传统仪器的束缚, 从而实现现场快速检测。本试验基于 RAA 技术建立了显色法和荧光法两种 NoV 可视化快速检测方法, 特异性强, 灵敏度高, 对真实样本检测的灵敏度可达 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 为今后 NoV 的快速现场检测提供了新思路。同时在对检测程序进行优化的过程中发现: 当扩增时间降低至 10 min 左右时, 所建立的检测方法也具备良好的扩增效率; 当按照比例将两种试剂盒的反应体系减少为原来



注:M为 DL2000 DNA ladder;图 a 为 GI NoV 显色法引物对其核酸参考样品检测的灵敏度结果,1~6 分别表示 1, 10^{-1} , 10^{-2} ng/ μ L 的 GI NoV 核酸参考样品;图 b 为 GII NoV 显色法引物对其真实样本检测的灵敏度结果,1~6 分别表示 20, 10, 1 ng/ μ L 的 GII NoV 真实样本。

图 10 RAA 显色法对 NoV 检测的灵敏度

Fig.10 Sensitivity of NoV by RAA chromogenic method



注:图 a 为 GI NoV 荧光型引物探针对其核酸参考样品检测的灵敏度结果;图 b 为 GII NoV 荧光型引物探针对其真实样本检测的灵敏度结果。

图 11 RAA 荧光法对 NoV 检测的灵敏度

Fig.11 Sensitivity of NoV by RAA fluorescence method

的三分之二时,扩增反应依旧可以照常运行。

本试验方法的建立为 NoV 的现场检测提供了参考,但想要实际应用于现场执行还有很大的研究空间,因此后续的研究重点主要集中在:

1) 由于 NoV 目前没有合适的体外培养体系,无法进行增殖培养,所以 NoV 的真实样本十分珍贵,在本试验中同样因为缺乏 GI NoV 真实样本,所以只能人工合成核酸参考样品以代替真实样品进行 GI NoV 可视化方法试验,因此亟待研制可以适配多项检测标准的、稳定安全用的诺如病毒标准样品。传统的病毒标准样品主要是采用冻干病毒颗粒或裸露 DNA 或 RNA 作为质控

品。调研发现已经有报道研制了 GII NoV 的核酸参考标准样品,本实验室后续研究将构建 GI NoV 标准样品,从而为本研究领域人员提供便利。但由于诺如病毒无法进行体外培养的特性,因此无法大量研制冻干的阳性颗粒;而裸露的 DNA/RNA 作为质控品无法监测核酸提取过程,没有蛋白保护也容易降解,因此研究组后续计划采用装甲 RNA 技术研制 GI NoV 标准样品。装甲 RNA 技术^[29]是将 RNA 片段包裹到噬菌体衣壳蛋白中制成病毒样颗粒,这种标准样品既无生物危险性,还能和阳性病毒样本一样监控整个检测过程,并且能耐受 RNase 的降解从而易于保存和运输。

2) NoV 现场检测的另一个关键瓶颈问题在于病毒的富集纯化, 由于食品中的 NoV 载量较低, 且各类食品的基质也较为复杂, 含有各种 PCR 抑制物等, 这为本方法的现场应用推广带来了很大困难。所以后续试验会着重于食品中 NoV 的富集分离纯化技术, 计划采用 MOFs 或 COFs 等技术功能化纳米磁珠, 合成对 NoV 具有特异性吸附功能的核酸适配体, 并将其修饰在纳米磁珠表面, 对复杂食品中的 NoV 进行特异性捕获, 从而实现食品中痕量或超痕量 NoV 的富集提取。

3) NoV 变异迅速, 目前已有报道根据 NoV 基因型分型保守区域 ORF1 上编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶区域和 ORF2 上编码主要结构蛋白 VP1 区域将 G I NoV 分为 9 个基因亚型, G II NoV 分为 29 个基因亚型^[30]。本研究建立方法的过程中仅针对 ISO TS 15216-2-2013、国标 GB 4789.42-2016 中所规定的常见 NoV 亚型, 所设计的引物探针不能完全覆盖所有的 NoV 基因型。因此后续研究组一方面准备对所有的 G I 和 G II NoV 亚型进行多重序列比对, 在对本试验筛选出的最佳引物探针组合的基础上, 设计出可以尽可能同时检测多种 NoV 亚型的简并引物; 同时对于差异性较大的 NoV 亚型设计引物探针, 进行多重检测, 或建立一锅式检测体系, 从而建立覆盖 G I 和 G II NoV 所有基因型的 RAA 可视化快速检测方法, 以避免在实际检测的过程中出现漏检或假阴性。

4) RAA 技术还具有可以与其它检测技术联合使用的优势, 如将即 RAA 技术与基因编辑技术 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 双剑合璧, 从而为核酸等温扩增检测技术的发展创建了一个新的平台。即通过 RAA 或 RT-RAA 技术实现目标核酸的指数扩增, 反转录成 RNA, Cas 蛋白在 crRNA 引导下定位目标 RNA, 切割核酸同时激活 Cas 蛋白的附属效应, 切割带有荧光和猝灭基团标记的二核苷酸, 使反应体系发出荧光, 荧光信号被捕捉, 实现目标基因的检测。如王瑛^[31]建立了 RAA-Cas12a 快速检测金黄色葡萄球菌的技术, 并证明在临床标本检测中, 与药敏试验和 PCR 方法相比, RAA-Cas12a 方法的检测灵敏度均为 100%, 特异度分别为 100%

和 95.5%, 该法检测临床标本中金黄色葡萄球菌具有较高的灵敏度和特异度, 可以用作临床现场快速检测。苏璇等^[32]采用 RAA-CRISPR/Cas13a 技术结合建立了金黄色葡萄球菌快速分子检测技术, 检测的灵敏度为 10^1 CFU/mL, 高于 real-time PCR, 检测时间仅需 30 min, 具有简便、快速、灵敏、特异等优点, 为金黄色葡萄球菌的检测提供了新的技术手段。因此研究组后期将采用 RAA 技术与 CRISPR/Cas 系统、试纸条等联用, 开发出可以实现 NoV 现场可视化快速检测并分型的 RAA 试纸条, 通过肉眼可直接观测结果, 真正用于 NoV 的现场快速筛查, 为 NoV 的监测监管和行政执法提供强有力的技术支撑。

参 考 文 献

- [1] 李梅, 冯丹丹, 党双锁. 诺如病毒感染致病机制的研究进展[J]. 世界临床药物, 2022, 43(1): 91-95.
LI M, FENG D D, DANG S S, et al. Advances in the study of pathogenic mechanisms of norovirus infection [J]. World Clinical Drugs, 2022, 43 (1): 91-95.
- [2] 杨家乐, 薛亮, 蔡伟程, 等. 贝类中人源诺如病毒污染净化技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2860-2869.
YANG J L, XUE L, CAI W C, et al. Advances in decontamination techniques for human-derived norovirus contamination in shellfish [J]. Microbiology Bulletin, 2021, 48(8): 2860-2869.
- [3] 陈人, 唐仁宇, 李欢龙, 等. 1 起介水传播诺如病毒感染性腹泻暴发疫情的调查[J]. 江苏预防医学, 2022, 33(1): 84-85.
CHEN R, TANG R Y, LI H L, et al. Investigation of an outbreak of water-borne norovirus infectious diarrhea [J]. Jiangsu Preventive Medicine, 2022, 33 (1): 84-85.
- [4] 廖小艳, 陈丽丽, 白亚龙. 食品中诺如病毒检测技术研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(4): 200-206, 232.
LIAO X Y, CHEN L L, BAI Y L, et al. Advances in norovirus detection technology in food [J]. Food and Machinery, 2021, 37(4): 200-206, 232.
- [5] CHHABRA P, DE GRAAF M, PARRA G I, et al. Updated classification of norovirus genogroups and

- genotypes [J]. *The Journal of General Virology*, 2019, 100(10): 1393.
- [6] 周弘璐, 谭明, 汪莹怡. 诺如病毒的致病机制及诊断[J]. *微生物与感染*, 2019, 14(5): 303-309.
ZHOU H L, TAN M, WANG X Y, et al. Pathogenic mechanism and diagnosis of norovirus[J]. *Microbiology and Infection*, 2019, 14(5): 303-309.
- [7] 于晓楠, 忻郦菁, 张静, 等. 2017-2019年上海市虹口区诺如病毒感染性腹泻疫情流行特征[J]. *环境与职业医学*, 2021, 38(5): 511-516.
YU X N, XIN L J, ZHANG J, et al. Epidemiological characteristics of norovirus-infected diarrhea epidemic in Hongkou District, Shanghai, 2017-2019 [J]. *Environmental and Occupational Medicine*, 2021, 38(5): 511-516.
- [8] 练莲. 我国诺如病毒感染暴发疫情流行特征及防控策略研究[J]. *应用预防医学*, 2021, 27(4): 378-381.
LIAN L. Study on the epidemiological characteristics and prevention and control strategies of norovirus infection outbreaks in China [J]. *Applied Preventive Medicine*, 2021, 27(4): 378-381.
- [9] 宋晓佳, 张静, 施国庆. 2000-2013年我国诺如病毒感染性胃肠炎暴发流行病学特征分析[J]. *疾病监测*, 2017, 32(2): 127-131.
SONG X J, ZHANG J, SHI G Q, et al. Epidemiological characteristics of outbreaks of norovirus-infected gastroenteritis in China from 2000 to 2013 [J]. *Disease Surveillance*, 2017, 32(2): 127-131.
- [10] STALS A, UYTENDAELE M, COILLIE E V. The need for harmonization in detection of human noroviruses in food [J]. *Journal of AOAC International*, 2013, 96(5): 998-1005.
- [11] 陈燕锋, 杜鹃, 尤瑞雯, 等. 厦门国际邮轮中心一起邮轮消化道疾病聚集性事件的流行病学调查[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2022, 45(2): 116-120.
CHEN Y F, DU J, YOU R L, et al. Epidemiological investigation of a cruise ship gastrointestinal disease gathering at Xiamen International Cruise Center [J]. *Chinese Journal of Border Health and Quarantine*, 2022, 45(2): 116-120.
- [12] 谭爱, 刘鹏, 刘鹏, 等. 2020年内江市一起幼儿园诺如病毒感染暴发疫情调查[J]. *医学动物防制*, 2022, 38(2): 183-186.
TAN A, LIU J, LIU P, et al. Investigation of an outbreak of norovirus infection in a kindergarten in Neijiang City in 2020 [J]. *Medical Animal Control*, 2022, 38(2): 183-186.
- [13] 董瑞, 刘富强, 张斯钰, 等. 湖南省2017-2019年学校诺如病毒感染暴发疫情流行特征分析[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(21): 3847-3851.
DONG R, LIU F Q, ZHANG S Y, et al. Analysis of the epidemiological characteristics of outbreaks of norovirus infection in schools in Hunan Province from 2017-2019 [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2021, 48(21): 3847-3851.
- [14] 张玮珊, 胡新玲, 律娜, 等. 后基因组时代诺如病毒的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(17): 6727-6734.
ZHANG W S, HU X L, LV N, et al. Progress of norovirus research in the post-genomic era [J]. *Journal of Food Safety and Quality Testing*, 2021, 12(17): 6727-6734.
- [15] BELLIO G, LOPMAN B A, AMBERT-BALAY K, et al. The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare related infection [J]. *Clinical Microbiology & Infection*, 2014, 20(8): 724-730.
- [16] 高珺珊, 薛亮, 左月婷, 等. 诺如病毒常见流行株胶体金免疫层析快速检测方法[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2665-2672.
GAO J S, XUE L, ZUO Y T, et al. Rapid colloidal gold immunochromatographic assay for common endemic strains of norovirus [J]. *Microbiology Bulletin*, 2020, 47(8): 2665-2672.
- [17] 张捷, 王琳, 霍江莲, 等. 基于近红外免疫层析技术食源性诺如病毒快速检测方法研究[J]. *黑龙江医学*, 2017, 41(7): 691-694.
ZHANG J, WANG L, HUO J L, et al. Study on the rapid detection method of foodborne norovirus based on near-infrared immunochromatography [J]. *Heilongjiang Medicine*, 2017, 41(7): 691-694.
- [18] ZHAO Z, ZHANG J, XU M L, et al. A rapidly new-typed detection of norovirus based on F0F1-ATPase molecular motor biosensor [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2016, 21(1): 128-133.
- [19] 罗剑鸣, 吴希阳, 徐子乾, 等. 基于颜色判定的逆转录环介导等温扩增技术检测GII型诺如病毒基因[J]. *病毒学报*, 2012, 28(2): 165-171.
LUO J M, WU X Y, XU Z Q, et al. Detection of GII norovirus gene by color-determined reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

- [J]. *Journal of Virology*, 2012, 28(2): 165–171.
- [20] 郭晨瑶, 梁莹, 胡同静, 等. 霍乱弧菌荧光 RAA 快速检测方法的建立和应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021(23): 68–72.
- GUO C Y, LIANG Y, HU T J, et al. Establishment and application of a fluorescent RAA rapid detection method for *Vibrio cholerae*[J]. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021 (23): 68–72.
- [21] 马巧妮, 王萌, 朱兴全. 重组酶介导扩增技术及其在病原微生物快速检测中的应用进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(6): 45–49.
- MA Q N, WANG M, ZHU X Q, et al. Advances in recombinant enzyme-mediated amplification technology and its application in rapid detection of pathogenic microorganisms[J]. *Chinese Journal of Biological Engineering*, 2021, 41(6): 45–49.
- [22] 王姝, 吕晓楠, 徐立蒲, 等. 鲤疱疹病毒 II 型 RAA-LFD 检测方法的建立[J]. *检验检疫学刊*, 2020, 30(3): 1–4.
- WANG S, LV X N, XU L P, et al. Establishment of a detection method for herpesvirus type II RAA-LFD in carp[J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2020, 30(3): 1–4.
- [23] 吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增核酸[J]. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40(10): 983–988.
- LV B, CHENG H R, YAN Q F, et al. Rapid amplification of nucleic acids by recombinase-mediated amplification [J]. *Chinese Science: Life Sciences*, 2010, 40(10): 983–988.
- [24] 张安洁, 张慧, 殷文婷, 等. 猫冠状病毒荧光 RT-RAA 检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(6): 36–39.
- ZHANG A J, ZHANG H, YIN W T, et al. Establishment of a fluorescent RT-RAA assay for feline coronavirus[J]. *Advances in Animal Medicine*, 2021, 42(6): 36–39.
- [25] 吕晓楠, 徐立蒲, 张文, 等. 鲤浮腫病毒 RAA-LFD 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(3): 263–267.
- LV X N, XU L P, ZHANG W, et al. Establishment of a method for the detection of carp floating virus RAA-LFD[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(3): 263–267.
- [26] ZHANG X, GUO L, MA R, et al. Rapid detection of *Salmonella* with recombinase aided amplification [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 139: 202–204.
- [27] SHEN X, QIU F, SHEN L P, et al. A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay to detect hepatitis B virus without DNA extraction[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 1–5.
- [28] ZHENG Y Z, CHEN J T, LI J, et al. Reverse transcription recombinase-aided amplification assay with lateral flow dipstick assay for rapid detection of 2019 novel coronavirus[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 613304.
- [29] PASLOSKE B L, CINDY R, WALKERPEACH C R, et al. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(12): 3590–3594.
- [30] CHHABRA P, DE GRAAF M, PARRA G I, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *The Journal of General Virology*, 2019, 100(10): 1393.
- [31] 王瑛. 金黄色葡萄球菌耐药及基于 RAA-Cas12a 的快速检测[D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- WANG Y. Drug resistance of *Staphylococcus aureus* and rapid detection based on RAA-Cas12a [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2021.
- [32] 苏璇, 葛以跃, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a 辅助 RAA 快速检测金黄色葡萄球菌的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(3): 253–258.
- SU X, GE Y Y, ZHANG Q, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by CRISPR-Cas13a combined with recombinase aided amplification (RAA) [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2020, 15(3): 253–258.

Establishment of a Visual Recombinase Aided Amplification (RAA) Method for Rapid Detection of GI and GII Noroviruses

Lin Zhiwei¹, Yang Yange², Wu Zhanwen^{2,3}, Wang Shuai^{2,3}, Li Tao², Li Hongna², Yuan Fei^{2*}

(¹College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, Heilongjiang;

²Key Laboratory of Food Quality and Safety for State Market Regulation, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176

³College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, Heilongjiang)

Abstract Norovirus (NoV) is one of the major pathogens causing acute gastroenteritis diseases worldwide and is highly susceptible to outbreak transmission, increasing medical and economic burden. Objective: To develop a novel detection method for NoV by recombinase aided amplification (RAA). Methods Based on the cDNA sequences corresponding to the GI and GII NoV detection targets specified in ISO TS 15216-2-2013 and GB 4789.42, the optimal RAA primers and probes were designed and screened, and their specificity for other common food-borne diarrhea viruses was determined; the shortest detection time, reaction procedure, and reaction system were determined by optimization, and the analysis of this detection system was performed. The shortest detection time, reaction procedure and reaction system were optimized, and the sensitivity of the assay system for the detection of NoV reference plasmids and real samples was analyzed, thus establishing a rapid visualization method for the detection of GI and GII NoV RAA. The optimized reaction procedure can shorten the detection time to about 10 min and reduce the reaction cost by two-thirds, and the sensitivity of the method can reach 10^{-2} ng/ μ L for the reference plasmid and 1 ng/ μ L for the real sample. The two NoV assays established are specific, sensitive, simple, rapid and visualized, and provide a good basis for future rapid NoV detection.

Keywords Norovirus (Nov); recombinase mediated isothermal amplification (RAA); visualization; rapid detection