

基于核酸等温扩增的侧流层析试纸条在病原微生物检测中的研究进展

陆璐^{1,2}, 邱万伟¹, 丁巧玲^{1,2}, 钱立生¹, 刘国东^{1*}

(1. 安徽科技学院生命与健康科学学院, 滁州 233100; 2. 安徽科技学院食品工程学院, 滁州 233100)

摘要: 传统的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增方法具有较高的灵敏度、特异性和技术成熟性, 但 PCR 仪成本高、操作复杂, 且易出现假阳性。因此更为简单、便捷、低成本的基于核酸等温扩增的试纸条快速检测技术逐渐发展起来。目前, 核酸等温扩增技术被应用于细菌、病毒等病原微生物的检测, 其在食品安全中食源性致病菌的监管等方面也有着广阔的应用前景, 因此受到广泛的关注。本文介绍了侧流层析技术的检测原理, 总结了目前常用的核酸等温扩增技术及其在食源性致病菌检测方面的应用, 并对其发展前景进行了展望, 以便于掌握该技术的发展趋势, 为相关学术研究提供研究思路。

关键词: 核酸; 等温扩增; 侧流层析技术; 试纸条; 快速检测; 食源性致病菌

Research progress of side flow chromatography strip based on isothermal amplification of nucleic acid in the detection of pathogenic microorganisms

LU Lu^{1,2}, QIU Wan-Wei¹, DING Qiao-Ling^{1,2}, QIAN Li-Sheng¹, LIU Guo-Dong^{1*}

(1. College of Life and Health Sciences, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, China; 2. College of Food Science and Engineering, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, China)

ABSTRACT: Traditional polymerase chain reaction (PCR) amplification method has high sensitivity, specificity and technical maturity, however, the PCR instrument is high in cost and complex in operation, it is prone to false positives. Therefore, a more simple, convenient and low-cost rapid detection technology based on nucleic acid isothermal amplification has gradually developed. At present, nucleic acid isothermal amplification technology has been applied to the detection of pathogenic microorganisms such as bacteria and viruses, and it also has broad application prospects in the supervision of foodborne pathogens in food safety, which has attracted extensive attention. This paper introduced the detection principle of side flow chromatography, summarized the nucleic acid isothermal amplification technology and its application in the detection of foodborne pathogens, and prospected its development prospect, so as to grasp the development trends of this technology and provide research ideas for related academic research.

KEY WORDS: nucleic acid; isothermal amplification; side flow chromatography; lateral flow strip; rapid detection; foodborne pathogens

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1908085MB54)、安徽省重点研究与开发计划项目(202004a07020018)、安徽省教育厅重大项目(KJ2019ZD58)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province (1908085MB54), the Key Research and Development Projects of Anhui Province (202004a07020018), and the Major Project of Anhui Provincial Department of Education (KJ2019ZD58)

***通信作者:** 刘国东, 博士, 教授, 主要研究方向为基于纳米材料构建的生物传感器、生物分析方法和现场检测装置, 应用于食品安全检测, 临床即时检测以及环境监测等。E-mail: liugd@ahstu.edu.cn

***Corresponding author:** LIU Guo-Dong, Ph.D, Professor, Anhui Science and Technology University, No.9, Donghua Road, Fengyang 233100, China. E-mail: liugd@ahstu.edu.cn

0 前言

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术,作为一项可放大扩增特定 DNA 片段的技术已经广泛应用于食品安全、分子生物学、医学等各个领域,但其依赖精密仪器进行温度控制,同时存在着反应时间过长的缺陷,使得该技术在现场检测和基层推广受到制约。20 世纪 90 年代初,部分学者们开始尝试核酸等温扩增技术,并将其与其他技术结合,使得核酸等温扩增技术在多个领域得到广泛应用。相较于 PCR,核酸等温扩增技术不需要过长时间的反应,对反应仪器也不再有过于苛刻的要求,可实现病原微生物的快速筛查与检测^[1]。

凭借在某一特定温度进行核酸扩增的特点,等温扩增技术广受关注,主要包括链置换恒温扩增(strand displacement amplification, SDA)、环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、依赖解旋酶 DNA 恒温扩增(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA)、重组酶聚合酶恒温扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)以及滚环恒温扩增(rolling circle amplification, RCA)技术等。相对于传统方法和 PCR 技术,等温扩增技术可在实验室设施相对不完善的条件下,实现准确且迅速的检测。以等温扩增技术为核心开发的致病菌及病毒等方面的检测方法也逐渐增多,结合试纸条的快速检测方法大大提高了对病原微生物检测的效率。本文基于等温扩增的试纸条在食源性致病菌及病毒检测中快速检测的使用,论述了几种核酸等温扩增的机制,解释了其结合试纸条在食品安全检测中的应用,并对其发展前景进行了展望,以便掌握已有的相关研究资料,为相关研究提供有力依据和坚实的基础。

1 试纸条检测方法

近年来,随着核酸检测技术的发展,侧流层析技术(lateral flow chromatographic assay, LFCA)凭借其制备简单、检测简便、成本低廉,检测耗时短、灵敏度高等优势已经被普遍用于核酸检测^[2]。LFCA 以抗原抗体的特异性结合或者核酸杂交反应为基础,从而检测样品中的目标物。通过在支撑底板上组装样品垫、结合垫、层析膜和吸水垫 4 个部分即可制成一个简版试纸条(如图 1)。以特别处理过的纤维膜或玻璃棉作为样品垫,而被标记的生物活性材料依附在结合垫上,用以结合待测液中的检测靶标,生成可肉眼观察到的免疫复合物。层析膜多数是硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜,喷有 2 条或多条抗原或抗体的“检测(test, T)线”和“控制(control, C)线”,可阻断带标记的免疫复合物,直观显示检测结果。吸水垫可吸收流过层析膜的待测液,利于更多待测液作侧向流动^[3]。近年来,学者们研发出基于不同纳米材料标记的层析试纸条快速检测靶核酸,其原理为抗原抗体特异性结合或者核酸杂交,该试纸条极易

被化学修饰并与多种类型的生物分子结合,因而与大多数生物监测兼容^[4]。

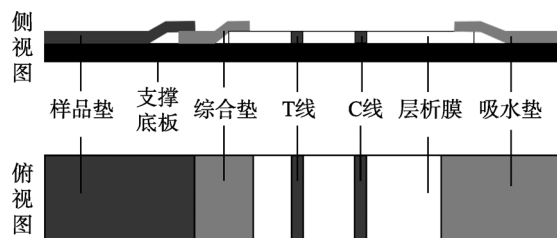


图1 LFCA 试纸条结构示意图

Fig.1 Structural diagram of LFCA test strip

1.1 抗原抗体相互作用

依据抗原与抗体结合的方式,侧流层析试纸条原理主要分为双抗体夹心免疫层析法与竞争免疫层析法两大类^[5]。

双抗体夹心法因目标物含有大量抗原位点,可以检测大分子物质。该法可使用 3 种抗体:一种是单克隆抗体 1(monoclonal antibody 1, mAb1),被标记材料标记在结合垫上,并会和样品中抗原特异性结合;一种是捕获单克隆抗体 2(monoclonal antibody 2, mAb2)或多克隆抗体(polyclonal antibody, pAb),被喷印在检测线上;还有一种是抗种属特异性免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)的“抗抗体”,即二抗,被喷印在控制线上^[6]。

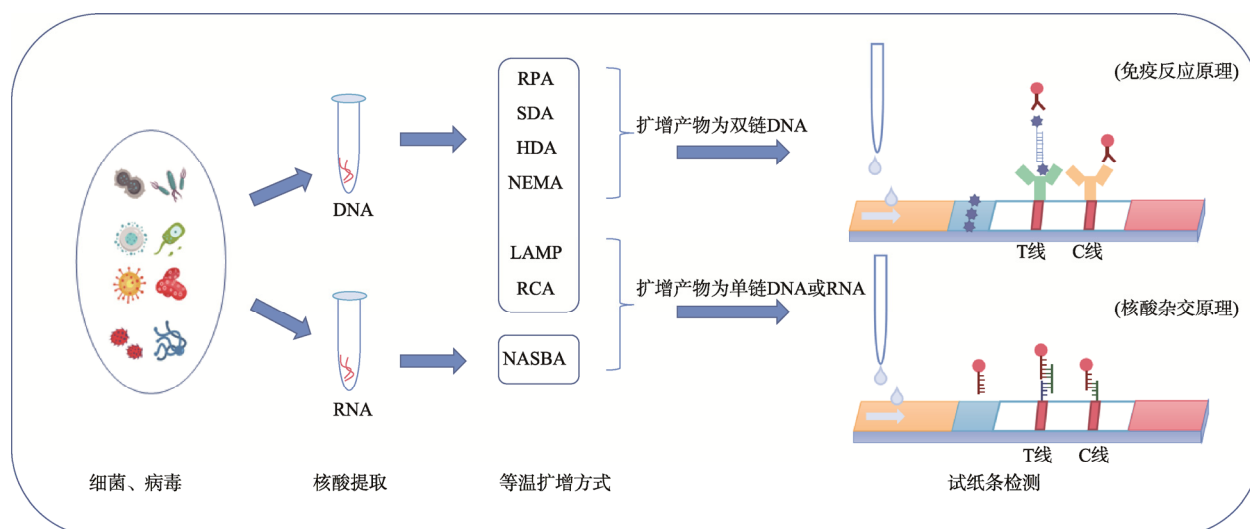
竞争法是信号递减型的竞争抑制性的免疫学结合反应,应用于检测仅有单个抗原位点或抗原位点较少的小分子化合物,且一般不用来检测蛋白质、核酸等生物大分子^[5]。该法使用了可与样品中的抗原特异性结合的抗体,以及喷在控制线上的二抗这 2 种抗体。当待测样中不存在靶标抗原时,则检测线和控制线处均有条带出现;而待测样中存在靶标抗原时,靶标抗原含量越高则检测线条带颜色越浅^[6]。

1.2 核酸杂交

当目标产物是单链 DNA 或 RNA 时,层析试纸条可以通过核酸杂交原理来实现扩增产物的检测。由于核酸依赖性扩增检测技术可以产生单链 RNA,该扩增产物可以与探针直接杂交。靶 RNA 与胶体金标记的探针结合,以形成复合物,再与检测线中的单链探针结合,以产生可观察到的信号^[7]。当核酸作为侧流层析的生物识别元件进行样品检测时,检测线和控制线均有条带出现为阳性;只有控制线有条带出现为阴性。

2 核酸等温扩增方法

等温扩增技术是对靶序列在单一温度下进行扩增,可以摆脱价格昂贵、不易携带的热循环仪,尤其是在微生物检测领域中得以快速发展,而基于核酸等温扩增的试纸条即为快速检测的方法之一(如图 2)。



注: 重组酶聚合酶恒温扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)、链置换恒温扩增技术(strand displacement amplification, SDA)、依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA)、切刻内切酶介导等温核酸扩增技术(nicking enzyme mediated amplification, NEMA)、环介导恒温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、滚环恒温扩增技术(rolling circle amplification, RCA)、依赖核酸序列扩增技术(nucleic acid sequencebased amplification, NASBA)。

图 2 试纸条检测病原微生物示意图

Fig.2 Schematic diagram of test strip for the detection of pathogenic microorganisms

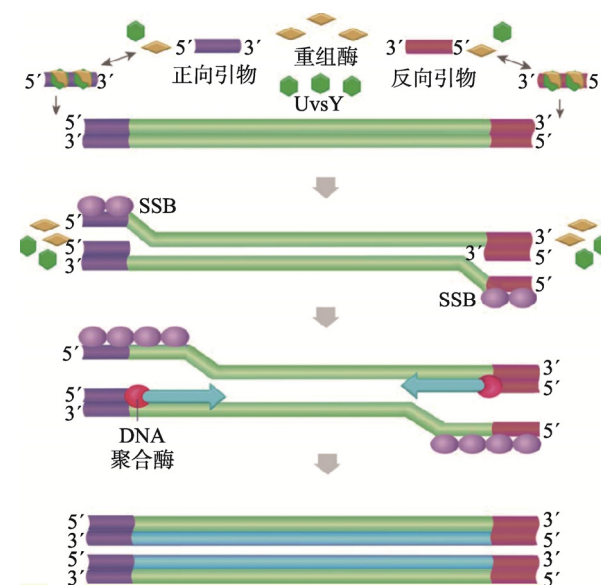
2.1 重组酶聚合酶扩增

重组酶聚合酶扩增反应(recombinase polymerase amplification, RPA)可以在 37~42 °C 的单一恒定温度下快速扩增 DNA, 相对 PCR 而言, 短时间即可完成^[8-9]。2006 年, PIEPENBURG 等^[10]初次提出这项由 2 条特异性的上下游引物和重组酶(T4 uvsX)、聚合酶(Bsu)以及单链结合蛋白(gp32)参与的扩增技术。RPA 反应的主要原理如图 3 所示^[10], 通常以荧光探针实时检测、琼脂糖凝胶电泳及侧流层析试纸条检测等多种方法检测 RPA 的扩增产物^[11]。

将重组酶聚合酶等温扩增与侧流层析试纸条相结合, RPA 的扩增产物与相应探针结合, 可以在试纸条上显色, 作为一种崭新的结合 RPA 与试纸条(lateral flow dipstick, LFD)的检测方法(LF-RPA)。陈纯阳等^[12]研究发现 LF-RPA 检测阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)更为快速灵敏, 且与其他菌属无交叉反应, 比 PCR 更加适合于现场检测。JIANG 等^[13]首次尝试优化 LF-RPA 结合免疫磁性分离(immunomagnetic separation, IMS)检测生蚝中的副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 此 IMS-RPA-LF 方法可在人工污染的生蚝样品中检测到低至 2 CFU/g 的副溶血性弧菌, 且特异性强。高建欣等^[14]结合 RPA 和乳胶微球试纸条(latex microsphere test strips, LMTS), 使金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的检测灵敏度大大提高, 且与其他菌无交叉反应, 检测限为 500 fg DNA。彭遥等^[15]建立的 LF-RPA 特异性良好, 与 7 种非土拉菌并未发生交叉反应, 最低检测浓度为 20 fg/μL 的土拉菌(*Francisella tularensis*)基

因组核酸, 可与实时荧光定量 PCR 的灵敏度媲美。

与其他方法相比, RPA 的优势在于反应全程为等温进行, 无需热变性; 引物设计简单; 灵敏度较高, 仅含一个拷贝的样品也能被检测出; 特异性强, 可进行多重 RPA。但 RPA 也存在不足, 较短靶序列不适宜用 RPA 检测^[16]; 并且, RPA 对反应要求较高, 不可用于直接扩增粗样品^[17]。



注: SSB 为单链 DNA 结合蛋白。

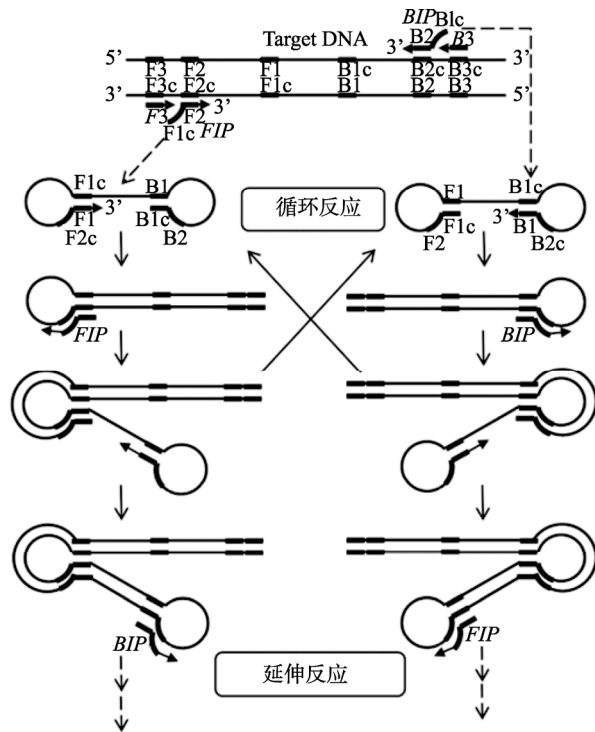
图 3 重组酶聚合酶扩增反应原理

Fig.3 Recombinase polymerase amplification reaction mechanism

2.2 环介导等温扩增

NOTOMI 等^[18]在 2000 年研究出的环-媒恒温扩增法,又称为环介导等温扩增技术(loop mediated isothermal amplification, LAMP)。LAMP 能够根据靶基因中的 6 个区域,设计出 4 种具有特异性的引物,再借助于某种链置换 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase),在 65 °C 左右的恒定条件下,数 10 min 可完成扩增。这项创新不仅省略了模板热变性的条件、保持持久温度循环等步骤,还具备了高特异性、高效性、耗时短、廉价、操作简便等特征。

LAMP 方法的引物设计较 PCR 更为烦琐。DNA 和 RNA 都可以成为 LAMP 检测方法扩增的对象。只要其满足底物(dNTP)、Bst DNA 聚合酶、反应缓冲液和 FIP、F3、BIP、B3 这 4 种引物的条件,即可对 DNA 进行扩增;而对 RNA 进行扩增时,只需要在包含 DNA 扩增满足的要素以外,增加逆转录酶,便可顺利完成。LAMP 反应主要原理如图 4 所示^[19]。



注: FIP、F3、BIP、B3 为 4 种引物, F3c、F2c、F1c、B1c、B2c、B3 为 6 个区域。

图 4 环介导等温扩增反应原理

Fig.4 Loop mediated isothermal amplification reaction mechanism

陈欢等^[20]建立 LAMP 与横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)相结合的等温扩增快速检测技术,最佳反应温度为 60 °C,针对金黄色葡萄球菌的检测方法特异性强,灵敏度高。MEI 等^[21]通过 LAMP-LFD 检测沙门氏菌(*Salmonella*) *hlyA* 基因,与 PCR 和 RT-PCR 方法相比,此方法具有相同的特

异性和更高的灵敏度。LENA 等^[22]以 LAMP-LFD 法,通过识别 HPV 16 特有的 FAM 谱带并结合试纸条检测结果排除假阴性,且在临床检测中灵敏度极高。李尚阳等^[23]以志贺氏菌(*Shigella castellani*)的 *ipaH* 基因为检测靶标建立了 LAMP-LFD 方法,可特异性地检出志贺氏菌。李伟哲等^[24]针对存在于虾类中的桃拉综合征病毒(*Taura syndrome virus*, TSV)建立了可以快速检测 TSV 的 LAMP-LFD 方法,虽然该检测体系的灵敏度不及定量 PCR (quantitative PCR, qPCR),但检测时间减少近 1 h,此外,该 LAMP-LFD 特异性强、操作更为简易便捷。彭钟琴^[25]结合 LAMP 与钙黄绿素和核酸试纸条,在水产中检测类志贺单细胞菌(*Plesiomons shigelloides*)与肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*),该检测技术特异性较强,其针对靶基因的检测灵敏度均为 20 拷贝/反应,较传统 PCR 敏感 100 倍。

逆转录环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)的反应机制类似于常规 LAMP,不同点在于扩增模板使用的是 RNA,且需在反应开始前在体系内加入逆转录酶。RT-LAMP 具有与 LAMP 相似的灵敏度和特异性。徐昌平^[26]结合了 RT-LAMP 与含防污染功能的侧流层析试纸条,研究了可以快速检测麻疹病毒核酸的新方式,该方法灵敏度与 RT-PCR 基本一致,并且具有良好的特异性。此外, XU 等^[27]开发了一种可以进行埃博拉病毒(*Ebola virus*, EBOV)相关核酸的视觉检测方法。将逆转录环介导等温扩增和核酸试纸条检测结合为逆转录-环介导等温扩增技术(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nucleic acid strip detection, RT-LAMP- NAD)。该扩增可在 58 °C、35 min 条件下一步完成,方法简单,灵敏度和特异性高,特别适用于非洲地区的 EBOV 快速检测。CHEN 等^[28]建立了一种可快速检测肠道病毒的 RT-LAMP-LFD 检测方法,对临床样本进行检测后,结果与荧光定量 PCR 法检测结果基本一致。

作为一项快速、高效的核酸扩增技术, LAMP 虽然原理复杂,但与 PCR 相比,它不需要复杂仪器,实际操作更简单,因此,由于其反应成本低、扩增时效高,在实验室研究和现场检测可以快速得到准确的结果,该技术已经在食源性致病菌、农产转基因作物及病毒的检测中成功运用。

2.3 链置换等温扩增

1992 年, WALKER 等^[29]发现了一种崭新的 DNA 扩增技术,即链置换反应(strand displacement amplification, SDA)。SDA 技术以酶促反应为基础,进行 DNA 体外等温扩增, SDA 整个反应基本依靠限制性内切酶切割半硫代磷酸化碱基对应互补链,及聚合酶 *exo-klenow* 延伸切口、置换下游 DNA 片段,其反应原理如图 5 所示^[29], SDA 反应是“切口-扩增-置换”的循环过程,以实现靶序列高效扩增。

赵锦等^[30]基于纳米金将 SDA 和横向流动试纸条(lateral flow dipstick, SDA-LFD)的结合,探讨针对于登革热病毒(dengue fever virus, DENV)的快速检测,其检测结果直观并且敏感度高。ZHAO 等^[31]开发了一种基于等温链置换扩增的侧流失生物传感器,可简单而灵敏地检测 4 种出血热病毒: 汉坦病毒、基孔肯雅热病毒、登革病毒和 EBOV, 检出限可达 10 fmol/L。

SDA 无须热变性、特异高效、操作简便,拥有等温核酸扩增的通用优势。但是由于其反应原理与体系的复杂性,也存在了一系列问题: 非标准核苷酸的使用,与普通的单核苷酸相比,经硫基修饰的单核苷酸价格极高,反应成本大大增加^[32]; 经硫基修饰的单核苷酸不是 DNA 聚合酶的天然底物,其与标准核苷酸之间的竞争作用使得聚合酶极易从 DNA 模板上剥离,扩增效率相对降低很多,因此 SDA 难以合成超过 200 bp 产物;此外,由于 SDA 的产物起始端与末端存在限制性核酸内切酶的识别序列或其残端,导致产物不宜直接进行克隆;SDA 的等温扩增是两步法,需先通过变温使双链打开、引物退火,酶体系只能在变温后加入,这无疑提高了外源污染的几率。

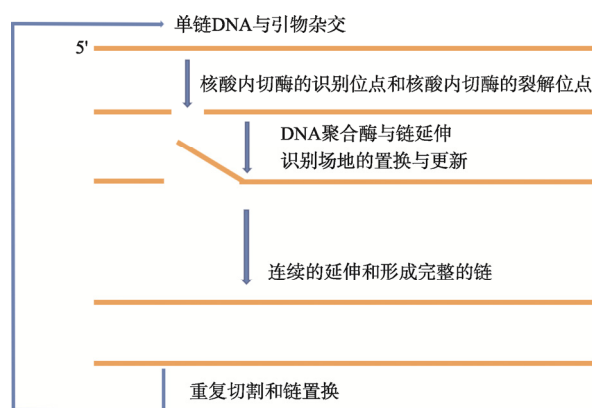


图 5 链置换等温扩增反应原理

Fig.5 Strand displacement amplification reaction mechanism

2.4 依赖解旋酶 DNA 等温扩增

2004 年,美国 NEB 公司发明了依赖解旋酶 DNA 等温扩增技术(helicase-dependent amplification, HDA)^[33],其反应原理如图 6 所示^[33]。其仿效了体内 DNA 在等温条件下的复制, DNA 双链在恒温下依赖解旋酶进行解旋,特异性引物以被 DNA 单链结合蛋白稳定的已解开的单链为模板,依靠 DNA 聚合酶合成互补双链,再循环扩增。HDA 的反应步骤相比于 PCR, 极其相似,但 HDA 是采用酶维持单链作用,而 PCR 是升温解开双链。

KLOM 等^[34]开发了一种新的分子方法,将 HDA 与条带测试相结合,用于检测反刍动物粪便污染源。与 qPCR 不同,所开发的 HDA-试纸条检测方法只需要加热块来扩增反

刍动物相关拟杆菌 16S rRNA 标记物。扩增后,反应混合物可直接应用于试纸条上。此检测方法在与 qPCR 对照的性能测试中取得了类似的结果。DU 等^[35]将嗜热解旋酶依赖性扩增与侧流分析相结合,可快速检测食品样品中的沙门氏菌,该方法对 DNA 和纯培养细菌的检测限分别为 73.4~80.7 fg 及 35~40 CFU,尤其适用于设备有限的地区。

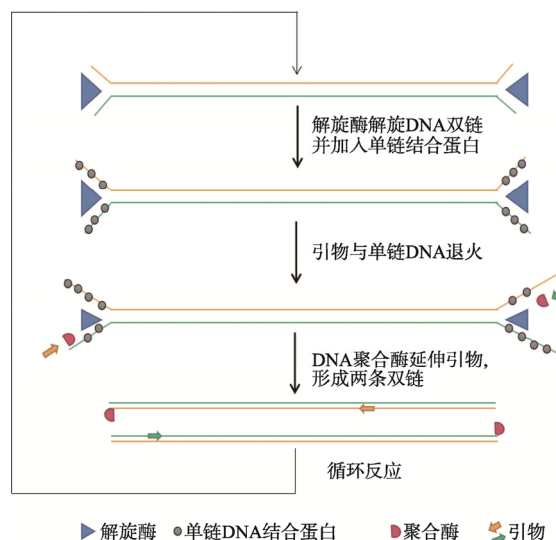


图 6 依赖解旋酶 DNA 等温扩增反应原理

Fig.6 Helicase-dependent amplification reaction mechanism

作为新型等温核酸扩增技术, HDA 不需要调节温度,反应全程温度恒定;同时,反应原理简易,只需要 2 条简单引物;此外,1~1.5 h 即可达到扩增的目的。然而 HDA 也存在其缺陷,其反应体系需要多种最适条件不同的酶参与,而不同酶之间的相互作用会影响其扩增效率。

2.5 滚环扩增技术

1995 年 FIRE 等^[36]首次提出滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA),它是模拟自然界中的环状分子滚环式复制模式,一条与靶序列互补的引物沿着环形 DNA 模板,依赖具备链置换活性的 DNA 聚合酶的链置换作用进行扩增,扩增出的单链 DNA 长度增长可达近千倍。RCA 被普遍用于基因芯片、核酸测序等,特异性地生成环状 DNA 是此技术的关键部分。RCA 的反应原理如图 7 所示^[36]。

目前在食品检测中, RCA 已有不少应用。例如利用锁式探针与从进出口食品中提取的转基因模板进行特异性杂交,连接成环后再进行滚环扩增反应,即可快速检测其中的转基因成分,特异性与灵敏度也能够达到相关要求^[37-38]。RCA 技术不但能直接进行 DNA 扩增,还能够放大靶基因的信号^[39-41],但其在试纸条上的应用研究还很少。基于 RCA,引入与延伸产物退火杂交的另一条或多条引物,便能够产生超分支 RCA,此操作可达到超指数式扩增的目的^[42-44]。徐鹏飞^[45]通过超分支滚环扩增试纸条进行虫媒病毒检测,

试验表明, 该方法具有胶体金试纸条快速、简便的优点, 且其灵敏准确度相当, 可同时检测多种病原体。

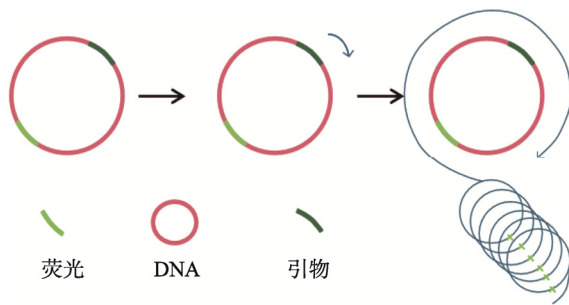


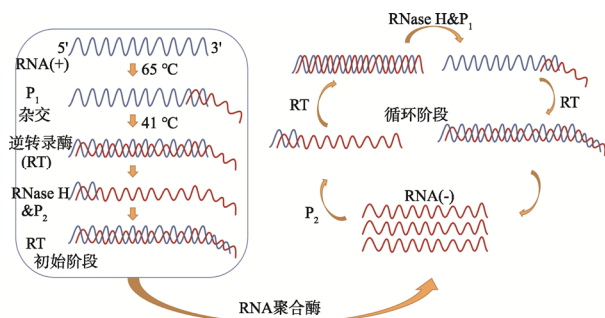
图 7 滚环扩增反应原理

Fig.7 Rolling circle amplification reaction mechanism

3 其他等温扩增技术

3.1 依赖核酸序列扩增技术

1991 年, COMPTON 等首次提出依赖核酸序列扩增技术(nucleic acid sequencebased amplification, NASBA), 反应过程类似于逆转录病毒 RNA 的复制过程^[46], 以转录机制为基础, 灵敏度极高, 当有反转录酶辅助扩增时, 单链的 RNA 产物即为最适宜的扩增模板, 因此, NASBA 广泛应用于细菌和病毒 RNA 的检测^[47]。其反应分为 2 个过程: 65 °C 条件下的核酸变性与引物结合以及 41 °C 条件下的目标序列的扩增(原理如图 8)^[46]。



注: 核糖核酸酶 H (RNase H), 是一种核糖核酸内切酶。P1、P2 为一对引物。

图 8 依赖核酸序列扩增技术反应原理

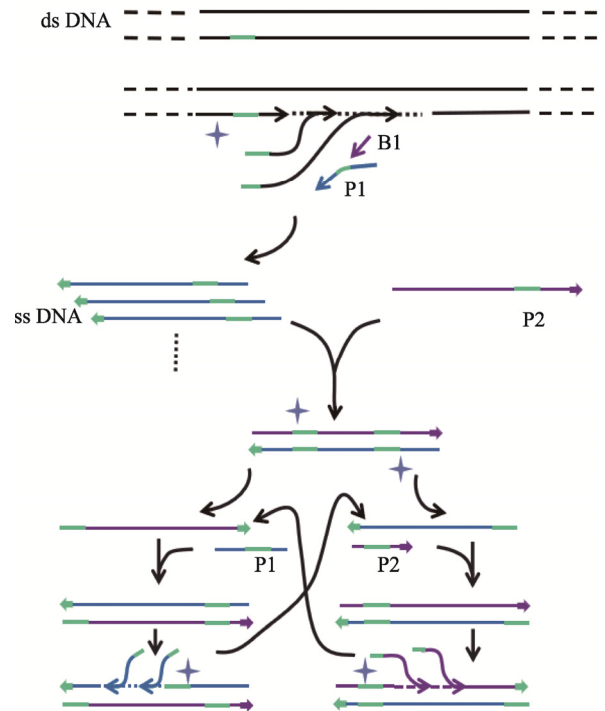
Fig.8 Nucleic acid sequencebased amplification reaction mechanism

NASBA 已被广泛应用, 但在试纸条快速检测方面的研究还相对较少。林锋^[48]针对罗氏沼虾野田村病毒的弱毒情况, 根据核酸依赖性扩增技术原理, 建立了 MrNV 的 NASBA 反应体系, 结果表明, MrNV-NASBA-LFD 方法虽在时效上低于 LAMP 方法, 但其灵敏度达 1.0 fg, 而且不易出现假阳性记过和二次污染, 但是成本相对较高。YRAD 等^[49]开发了一种基于 NASBA 的侧流生物传感器以检

测登革热病毒 1 型, 优化的生物传感器检测限为 0.01 mol/L, 且混合的人血清中可检测 1.2×10^4 pfu/mL。虽然 NASBA 存在很多优势, 但是它无法进行一步扩增, 并不属于完全意义上的等温扩增技术, 并且酶的热稳定性很差, 其有效扩增片段的长度也相对较短。

3.2 切刻内切酶介导等温核酸扩增技术

2006 年, 切刻内切酶介导等温核酸扩增技术(nicking enzyme mediated amplification, NEMA)诞生, 该技术基于 SDA 发展且不依赖于特殊化学修饰的等温扩增, 二者基本扩增原理相似(图 9)^[50]。NEMA 扩增有 2 个环节组成: “切割单链形成切口”和“链置换剥离旧链”, 待扩增的 DNA 双链模板存在一段切口酶特异识别的序列, 切口酶只以其中一条链为目标进行切割, 而 DNA 聚合酶则以该切口为出发点, 以未被切断的单链为引物, 延伸扩增成新链, 由此旧链被替换, 新的循环以新链为模板继续指数扩增。



注: P1、P2 为一对引物, B1 为切刻内切酶。

图 9 切刻内切酶介导等温核酸扩增技术反应原理

Fig.9 Nicking enzyme mediated amplification reaction mechanism

王纪东^[51]以未知污染菌为前提, 利用了 NEMA 原理, 设计了某种通用引物, 可将多种污染菌的 16S rDNA 进行扩增, 并对扩增条件进行了优化, 再进行试纸条检测, 结果表明检测完全可行。NEMA 的可取之处在于抑制因子的干扰被简单的酶和原材料体系有效减轻, 且扩增反应时间短, 成本低, 对操作仪器的要求不高也成为了亮点之一。但是 NEMA 仍不够成熟, 在微生物检测方面的应用相对较少。

4 不同核酸等温扩增技术比较

基于核酸等温扩增的技术有很多,也有着各自优缺点(表 1),因其可在单一温度下对靶序列进行扩增或信号放大,反应条件温和而在食源性致病菌检测中广泛应用。但是,PCR 仍是当前核酸体外扩增最成熟的技术,也是绝大多数细胞和分子实验室的首选方案。不过相比之下,核酸等温扩增更适合基层快速检测。目前,商品化扩增试剂盒价格相对较高,在一定程度上限制了它的应用。因此,仍需进一步研究以降低成本,日后很大程度上会成为首选方法之一。

5 总结与展望

本文介绍了侧流层析技术的检测原理,总结了目前常用的核酸等温扩增技术及其在食源性致病菌检测方面的应用。近年来,此类技术在病原微生物的检测中愈加成熟^[52]。

YANG 等^[53]开发了一种不依赖复杂设备的 RPA-LF 快速检测副溶血性弧菌的技术,检测过程仅需 25 分钟。WU 等^[54]基于 RPA-LFS 建立高灵敏度的沙门氏菌血清型鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)检测技术,且有效防止了假阳性结果。KUMAR^[55]对用于检测肉和肉制品中病原体 and 动物物种的各种等温核酸扩增方法进行了总结,并讨论了与这些等温技术相结合以进行快速现场检测的新兴工具。等温扩增技术的特点使其具备快速诊断病原体的能力,可在条件匮乏的偏远地区进行实时现场检测。对于以核酸为靶物质的便携快速即时检测设备的研发,等温扩增技术在扩增速率、稳定性等方面仍需要进一步优化,并且将等温扩增与其他检测操作结合也是一项需解决的难点^[56-57]。随着试纸条检测技术与等温扩增技术的不断成熟,未来快速、高通量、多重筛查的即时检测方法必将迎来更加广阔的市场前景。

表 1 不同核酸等温扩增技术比较
Table 1 Comparison of different nucleic acid isothermal amplification methods

扩增方式	酶组分	反应温度/℃	反应时间/min	引物条数	优点	缺点
RPA	T4 uvsX 重组酶、Bsu 聚合酶、单链结合蛋白	37~42	10~30	2	低温恒温、反应迅速、体系简单、检测方式多样、产物可直接肉眼检测	引物设计规则不明、体系复杂、成本高
LAMP	Bst DNA、聚合酶	65	30~60	4~6		非特异性扩增难以区分
SDA	限制性核酸内切酶、链置换活性 DNA 酶	37~40	60~120	2 或 4	无须热变性、特异高效、操作简便	产物不适合直接用于克隆、外源污染
HDA	单链结合蛋白、UvrD 解旋酶、Exo-Klenow 聚合酶	37	60~120	2	低温恒温、高灵敏度、可进行信号放大	反应时间较长
RCA	连接酶、φ29 DNA 聚合酶	37	30~240	1	放大不容易发生污染	操作步骤较多、反应时间较长
NASBA	AMV 逆转录酶、RNase H、T7 RNA 聚合酶	37~42	120~180	2	操作简便、设备要求低、扩增对象广	反应时间较长
NEMA	链置换活性 DNA 酶、切割内切酶	53~58	60	4	酶体系和原材料体系简单、成本低、反应快	技术尚未成熟、易出现假阳性结果

参考文献

[1] ZHAO YX, CHEN F, LI Q, *et al.* Isothermal amplification of nucleic acids [J]. *Chem Rev*, 2015, 115: 12491–12545.

[2] AKTAS GB, WICHES JH, SKOURIDOU V, *et al.* Nucleic acid lateral flow assays using a conjugate of a DNA binding protein and carbon nanoparticles [J]. *Microchim Acta*, 2019, 186(7): 186.

[3] 张改平, 杨汉春, 童光志, 等. 猪病轻简化实用快速诊断技术与应用 [J]. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(16): 43–48.

ZHANG GP, YANG HC, TONG GZ, *et al.* Simplified, practical and rapid diagnosis technology and application of pig disease [J]. *Chin J Anim Sci*, 2015, 51(16): 43–48.

[4] YETISEN AK, AKRAM MS, LOWE CR. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(12): 2210–2251.

[5] 马兰, 王淑娟, 曾海娟, 等. 侧流层析技术研究进展 [J]. *食品科学*, 2018, 39(15): 333–342.

MA L, WANG SJ, ZENG HJ, *et al.* Research progress of side flow chromatography [J]. *Food Sci*, 2018, 39(15): 333–342.

[6] WONG RC, TSE HY. Lateral flow immunoassay [M]. New York: Humana Press, 2009.

[7] KERSTING S, RAUSCH V, BIER FF, *et al.* Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis [J]. *Malaria J*, 2014, 13(1): 1–9.

[8] HU J, WANG L, LI F, *et al.* Oligonucleotide-linked gold nanoparticle aggregates for enhanced sensitivity in lateral flow assays [J]. *Lab Chip*, 2013, 13(22): 2285–2288.

[9] 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 HR, YAN QF, *et al.* Rapid amplification of nucleic acid by recombinant enzyme mediated amplification [J]. *Sci Sin (Vita)*, 2010, 40(10): 983–988.
- [10] PIEPENBURG O, WILLIAMS CH, STEMPLE DL, *et al.* DNA detection using recombination proteins [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(7): e204.
- [11] JAMES A, MACDONALD J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(11): 1475–1489.
- [12] 陈纯阳, 张宸宁, 史爱莹, 等. 重组酶等温扩增试纸条快速检测阪崎克罗诺杆菌[J]. *食品科学*, 2019, 40(24): 306–312.
- CHEN CY, ZHANG CN, SHI AIY, *et al.* Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* by recombinant enzyme isothermal amplification test strip [J]. *Food Sci*, 2019, 40(24): 306–312.
- [13] JIANG W, REN YL, HAN XG, *et al.* Recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay combined with immunomagnetic separation for rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(7): 2903–2914.
- [14] 高建欣, 藏雨轩, 杜欣军, 等. 重组酶聚合酶恒温扩增结合乳胶微球试纸条快速检测金黄色葡萄球菌[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(1): 168–172.
- GAO JX, ZANG YX, DU XJ, *et al.* Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by thermostatic amplification of recombinant enzyme polymerase combined with latex microsphere test strip [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(1): 168–172.
- [15] 彭遥, 阙颀, 夏连续, 等. 侧流层析-重组酶聚合酶扩增技术快速检测土拉弗朗西斯菌[J]. *疾病监测*, 2019, 34(5): 455–459.
- PENG Y, KAN B, XIA LX, *et al.* Rapid detection of *Francisella tularensis* by side flow chromatography and recombinant enzyme polymerase amplification [J]. *Dis Surveil*, 2019, 34(5): 455–459.
- [16] JIA L, MACDONALD J. Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 196–211.
- [17] DENG H, GAO Z. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 853: 30–45.
- [18] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63.
- [19] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects [J]. *J Microbiol (Seoul, Korea)*, 2015, 53(1): 1–5.
- [20] 陈欢, 余蓓蓓, 黄世旺, 等. 联合环介导等温扩增技术和横向流动试纸条检测金黄色葡萄球菌[J]. *预防医学*, 2019, 31(4): 423–425, 429.
- CHEN H, YU BB, HUANG SW, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* by combined loop mediated isothermal amplification and transverse flow test strip [J]. *Prev Med*, 2019, 31(4): 423–425, 429.
- [21] MEI R, ZHAI XW, LEI CW, *et al.* Development and application of a visual loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick (LAMP-LFD) method for rapid detection of *Salmonella* strains in food samples [J]. *Food Control*, 2019, 104: 9–19.
- [22] LENA L, WINNIE W, GABRIELA H, *et al.* Method for the elucidation of LAMP products captured on lateral flow strips in a point of care test for HPV 16 [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(24): 6199–6209.
- [23] 李尚阳, 周前进, 张严峻, 等. 环介导等温扩增联合横向流动试纸条可视化检测志贺氏菌[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(7): 1616–1626.
- LI SY, ZHOU QJ, ZHANG YJ, *et al.* Visual detection of *Shigella* by loop mediated isothermal amplification combined with transverse flow test strip [J]. *Microbiol Chin*, 2016, 43(7): 1616–1626.
- [24] 李伟哲, 刘露, 李丽娜, 等. 桃拉综合征病毒的环介导等温扩增联合横向流动试纸条(LAMP-LFD)检测方法的建立[J]. *河北农业大学学报*, 2020, 43(3): 79–85.
- LI WZ, LIU L, LI LN, *et al.* Establishment of loop mediated isothermal amplification combined with transverse flow test strip (LAMP-LFD) for detection of Tara syndrome virus [J]. *J Hebei Agric Univ*, 2020, 43(3): 79–85.
- [25] 彭钟琴. 两种鱼源病原菌可视化 LAMP 及其核酸试纸条检测方法的建立与应用[D]. 佛山: 佛山科学技术学院, 2018.
- PENG ZQ. Establishment and application of visual lamp and nucleic acid strip detection methods for two fish pathogenic bacteria [D]. Foshan: Foshan University, 2018.
- [26] 徐昌平. 麻疹病毒核酸等温扩增试纸条快速检测技术的研究与应用[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2016.
- XU CP. Research and application of rapid detection technology of measles virus nucleic acid isothermal amplification test strip [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-tech University, 2016.
- [27] XU CP, WANG HL, JIN HL, *et al.* Visual detection of Ebola virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nucleic acid strip detection [J]. *Arch Virol*, 2016, 161(5): 1125–1133.
- [28] CHEN YT, CHENG N, XU YC, *et al.* Point-of-care and visual detection of *P. aeruginosa* and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 81: 317–323.
- [29] WALKER GT, LITTLE MC, NADEAU JG, *et al.* Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1992, 89(1): 392–396.
- [30] 赵锦, 夏海雄, 刘雨杰, 等. 采用等温链置换扩增结合纳米金侧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.
- ZHAO J, XIA HX, LIU YJ, *et al.* Dengue virus was detected by isothermal chain displacement amplification combined with nano gold flow chromatography strip [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2018, 47(4): 405–412.
- [31] ZHAO J, FANG ST, LIU YJ, *et al.* A lateral flow biosensor based on gold nanoparticles detects four hemorrhagic fever viruses [J]. *Anal Methods*, 2020, 12(46): 5613–5620.
- [32] 马丽敏, 卢亦愚. 核酸等温扩增技术研究进展[J]. *浙江预防医学*, 2013, 25(1): 24–27.
- MA LM, LU YY. Advances in isothermal amplification of nucleic acids [J]. *Prev Med*, 2013, 25(1): 24–27.
- [33] VINCENT M, XU Y, KONG H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. *Embo Rep*, 2004, 5(8): 795–800.
- [34] KOLM C, MARTZY R, MACH RL, *et al.* Detection of a microbial source tracking marker by isothermal helicase-dependent amplification and a nucleic acid lateral-flow strip test [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 393.
- [35] DU XJ, ZHOU TJ, LI PI, *et al.* A rapid *Salmonella* detection method involving thermophilic helicase-dependent amplification and a lateral flow

- assay [J]. Mol Cell Probe, 2017, 34: 37–44.
- [36] FIRE A, XU SQ. Rolling replication of short DNA circles [J]. Proc Nat Acad Sci, 1995, 92(10): 4641–4645.
- [37] 王晓亮, 王星宇, 梁长城, 等. DNA 的滚环扩增技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 358–363.
- WANG XL, WANG XY, LIANG CC, *et al.* Research progress of rolling ring amplification of DNA [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(16): 358–363.
- [38] MITANI Y, LEZHAVA A, KAWAI Y, *et al.* Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology [J]. Nat Methods, 2007, 4(3): 257–262.
- [39] LEE DC, YIP SP, LEE TMH. Simple and sensitive electrochemical DNA detection of primer generation-rolling circle amplification [J]. Electroanal, 2013, 25(5): 1310–1315.
- [40] XUE QW, LV YQ, CUI H, *et al.* A DNA nanomachine based on rolling circle amplification-bridged two-stage exonuclease III-assisted recycling strategy for label-free multi-amplified biosensing of nucleic acid [J]. Anal Chim Acta, 2015, 856: 103–109.
- [41] MURAKAMI T, SUMAOKA J, KOMIYAMA M. Sensitive RNA detection by combining three-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification [J]. Nucl Acids Res, 2012, 40(3): e22.
- [42] CONZE T, SHETYE A, TANAKA Y, *et al.* Analysis of genes, transcripts, and proteins via DNA ligation [J]. Annu Rev Anal Chem, 2009, 2: 215–239.
- [43] STOUGAARD M, JUUL S, ANDERSEN FF, *et al.* Strategies for highly sensitive biomarker detection by rolling circle amplification of signals from nucleic acid composed sensors [J]. Narnia, 2011, 3(10): 982–992.
- [44] ALI MM, LI F, ZHANG ZQ, *et al.* Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine [J]. Chem Soc Rev, 2014, 43(10): 3324–3341.
- [45] 徐翻飞. 超分支滚环扩增纸条法快速检测多种虫媒病毒的研究[Z]. XU HF. Rapid detection of multiple arboviruses by hyperbranched rolling ring amplification test strip method [Z].
- [46] COMPTON J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. Nature, 1991, 350(6313): 91–92.
- [47] WON J Y, MIN J. Highly sensitive *Escherichia coli* O157: H7 detection in a large volume sample using a conical polymer tube chamber consisting of micro-glass beads [J]. Biosens Bioelectron, 2010, 26(1): 112–117.
- [48] 林锋. 罗氏沼虾野田村病毒致病性及其快速检测技术研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2018.
- LIN F. Study on pathogenicity and rapid detection of Nomura virus of *Macrobrachium rosenbergii* [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018.
- [49] YRAD FM, CASTANAREA JM, ALOCILJA EC. Visual detection of dengue-1 rna using gold nanoparticle-based lateral flow biosensor [J]. Diagnostics, 2019, 9(3): 74.
- [50] CHANG CC, CHEN CC, WEI SC, *et al.* Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification [J]. Sens Basel, 2012, 12(6): 8319–8337.
- [51] 王纪东. 血小板制品细菌污染快速核酸检测方法研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2012.
- WANG JD. Study on rapid nucleic acid detection method for bacterial contamination of platelet products [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2012.
- [52] ZHANG Y, HU J, LI Q, *et al.* Detection of microorganisms using recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks [J]. Method Microbiol, 2020, 47: 319–349.
- [53] YANG XH, ZHAO PP, DONG X, *et al.* An improved recombinase polymerase amplification assay for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* with lateral flow strips [J]. Food Sci, 2020, 85(6): 1834–1844.
- [54] WU HH, ZHAO PP, YANG XH, *et al.* A recombinase polymerase amplification and lateral flow strip combined method that detects *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* with no worry of primer-dependent artifacts [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1015.
- [55] KUMAR Y. Isothermal amplification-based methods for assessment of microbiological safety and authenticity of meat and meat products [J]. Food Control, 2021, 12: 107679.
- [56] SHI C, LIU Q, ZHOU M, *et al.* Nicking endonuclease-mediated isothermal exponential amplification for double-stranded DNA detection [J]. Sens Actuators B Chem, 2016, 222: 221–225.
- [57] ÖZAY B, MCCALLA SE. A review of reaction enhancement strategies for isothermal nucleic acid amplification reactions [J]. Sens Actuators Rep, 2021, 3: 100033.

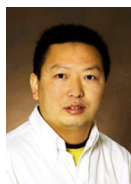
(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



陆 璐, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量与安全检测。

E-mail: 1173243171@qq.com



刘国东, 博士, 教授, 主要研究方向为基于纳米材料构建的生物传感器、生物分析方法和现场检测装置, 应用于食品安全检测, 临床即时检测以及环境监测等。

E-mail: liugd@ahstu.edu.cn