

NASBA和RPA两种等温扩增技术在病原菌检测中的应用研究

岳苑^{1,2} 张建中¹ 张茂俊¹

¹中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206; ²宁夏回族自治区食品检测研究院,银川 750001

通信作者:张茂俊, Email: zhangmaojun@icdc.cn

【摘要】 依赖核酸序列扩增和重组酶聚合酶扩增技术是在PCR基础上发展起来的等温扩增技术。本文介绍了这两个技术的反应原理、引物探针设计原则以及优势,根据其简便、准确性好、灵敏度高、周期短的特点进一步对该技术在病原菌检测中的应用予以综述及展望。

【关键词】 病原菌; 依赖核酸序列扩增; 重组酶聚合酶扩增

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2013CB127204); “西部之光”人才培养项目

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.08.027

Application of NASBA and RPA in detection of pathogenic bacteria

Yue Yuan^{1,2}, Zhang Jianzhong¹, Zhang Maojun¹

¹Institute for Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ²Ningxia Hui Autonomous Region Food Testing and Research Institute, Yinchuan 750001, China

Corresponding author: Zhang Maojun, Email: zhangmaojun@icdc.cn

【Abstract】 Nucleic acid sequence-based amplification and recombinase polymerase amplification are the recently developed thermostatic amplification techniques based on PCR. This paper briefly summarizes the principle of reaction, design principle of primer and probe, advantage of these two techniques (simple, accurate, highly sensitive and rapid) and introduces the application of the techniques in the detection of pathogenic bacteria.

【Key words】 Pathogenic bacteria; Nucleic acid sequence-based amplification; Recombinase polymerase amplification

Fund programs: National Basic Research Program of China (2013CB127204); “Light of the West” Talent Training Project

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.08.027

近几年,等温核酸扩增逐渐成为研究的热点^[1]。该技术的共同特点是可在固定的温度条件下实现核酸的快速扩增。因为整个反应过程是在单一温度条件下进行的,可以摆脱精密的温控循环系统,因而大幅度降低检测成本,同时实现对食品、病原体等的现场快速检测,极大地提高检测效率。对于检测过程中资源缺乏并且需要实时监测的情况下,等温扩增技术可以很好地取代传统PCR诊断技术^[2]。较为常见的等温扩增方法有依赖核酸序列扩增(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、依赖解旋酶扩增(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。本文主要阐述NASBA和RPA技术在病原菌检测中的应用,以期为此类技术的推广和应用提供参考。

一、RPA技术

1. 概况:2006年Piepenburg等^[3]报道RPA技术,该技术简单、快速、灵敏。RPA主要分为以下几个步骤:第一,重组蛋白酶(如T4 uvs X)在辅助因子uvs Y的协助下与上下游引物形成酶-引物复合物,在双链DNA中寻找结合位点;第二,复合物在模板上定位后直接启动链交换反应,形成D状环。单链结合蛋白(single strand DNA-binding protein, SSB)结合被置换的DNA链,防止引物解离;第三,重组酶uvs X解离后引物的3'端暴露,被链置换DNA聚合酶识别进行链延伸,形成新的互补链^[4];第四,在链置换DNA聚合酶系的协同作用下,开始特异性片段的扩增过程,30 min内就可以将靶序列扩增到10¹²数量级,达到检测水平^[5]。

2. 引物和探针的设计:RPA的引物长度一般为30~35 bp,以便于SSB结合^[3],扩增产物长度通常控制在500 bp以内,以100~200 bp为宜,能够保证检测的反应速度和敏感性。

此外,5'端3~5 bp应当避免出现多个G;3'端尾端最好选择GC,为聚合酶提供稳定的结合区域;避免连续出现多个相同核苷酸;GC含量在30%~70%之间,避免引物形成二聚体和二级结构^[6]。

RPA探针的设计与传统的Taqman探针的设计方法不同,探针较长,一般为46~52 bp,探针两端分别携带一个荧光基团和一个淬灭基团,这2个基团被四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)碱基(距离5'端30 bp的位置)隔开,在3'端作封闭处理以防止探针作为引物进行扩增。此探针结构完整时,检测不到荧光基团发出的信号,随着扩增的进行,大肠杆菌核酸外切酶Ⅲ可以识别并切割酶解THF残基,使荧光基团和淬灭基团分离,发出的荧光信号随着扩增产物同步积累^[7]。

3. 扩增产物检测方法:

(1)基础RPA:RPA技术发展初期,使用最简单的琼脂糖凝胶电泳对扩增结果进行检测,虽然灵敏度较高但增加了检测时间,而且RPA的扩增产物需要纯化后才能进行电泳,以防止抹带现象发生^[8]。

(2)探针法RPA:该法是目前最常见的检测方法,其核心在于exo探针(根据酶的名称进行命名)的设计。该法灵敏度、特异性较基础RPA更高,而且反应时间一般在20 min以内,但需要荧光PCR仪等仪器进行实时荧光采集,难以满足现场检测的需求。

(3)侧流层析试纸条(lateral-flow strip, LFD)RPA:该法可用于定性和半定量检测,适用于资源缺乏或非实验室环境^[9]。这一方法是将免疫技术、分子杂交技术、胶体金标记技术结合于一体,利用双抗体夹心法的工作原理,快速检测RPA扩增产物。其核心是Nfo(大肠埃希菌核酸内切酶Ⅳ)探针,5'末端有荧光基团,3'端有阻断物,两个基团之间同样设计一个THF分子。下游引物带有生物素或地高辛等标记物,随着反应进行,剪切后的探针与下游引物形成既带有探针荧光基团又带有引物特殊标记物的双标记扩增子,便于与试纸条上的抗体结合,检测结果在试纸条上显示红色条带,肉眼即可观察,结果清晰直观,非专业人员也可完成,非常适用于现场快速检测。

4. RPA技术的优势:第一,等温。RPA反应在常温下即可进行,其最适温度在37~42℃,不需要昂贵的温度循环设备,降低了成本;第二,耗时短。整个反应过程在10~20 min内即可完成,且不需要变性,从而实现了快速核酸检测;第三,灵敏度高。RPA技术在较短的反应时间内保持了高灵敏性,从单个模板分子可得到大约 10^{12} 数量级的扩增产物;第四,RPA技术不仅可扩增DNA,对RNA也有扩增作用,省略了cDNA合成的步骤;第五,除缓冲液及 Mg^{2+} 外,其余体系组分均以干粉状态保存于反应管中,稳定且易于保存,操作更简便,在封闭的反应体系中减少了污染的可能性;第六,读取结果多样化。RPA结果可通过琼脂糖凝胶电泳检测,也可通过real-time PCR对扩增过程进行实时监控,还可以通过LFD读取结果。

5. RPA技术在病原菌检测中的应用:自2014年以来,与RPA相关的研究文献呈现爆发式增长,研究领域覆盖了病毒、细菌、支原体、寄生虫等。

(1)细菌检测:在肠道病原菌检测方面,沙门菌被认为是众多食源性疾病的罪魁祸首。Liu等^[10]和刘立兵等^[11]分别建立了LFD RPA法和实时荧光RPA法检测沙门菌,检出限分别为10.5 cfu和 1.1×10^{-3} ng/ μ l,两种方法均具有高度的特异性。周广彪等^[12]研究了拟态弧菌vmh A基因的RPA检测方法,与其他10株标准菌株无交叉反应,灵敏度达到0.1 ng/ μ l,与普通PCR结果一致。Powell等^[13]开发了一种新型的DNA糖基化酶(Formamidopyrimidine DNA glycosylase, Fpg)探针用于RPA-LFD技术,并将该技术应用于空肠弯曲杆菌16S rDNA和两种重要的食源性病原菌大肠埃希菌O157:H7的遗传标记,该法的灵敏度都达到10~100个拷贝。此外,与RPA Nfo侧向流动法相比,该方法不需要稀释扩增子,操作步骤更少,适合在非实验室环境下使用。Raja等^[14]采用RPA技术检测常见细菌性泌尿系统感染病原菌,包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌和粪肠球菌,12 min能达到每个反应100个拷贝甚至更少拷贝数的检测限,并且与非靶点细菌基因组DNA未发生交叉反应。Charbel和Santiago^[15]采用RPA微流体技术扩增单核细胞增生李斯特菌,检测限达到5 000个细胞/ml。

呼吸道病原菌检测方面,陈斌等^[16]根据结核分枝杆菌基因保守序列设计了2对引物和特异性探针,该方法仅需15 min,灵敏度达到0.043 ng/ μ l,其他5种非结核分枝杆菌均不能扩增,特异性良好。Clancy等^[17]以编码导肽酶A的基因为靶标,设计并优化了检测全血中肺炎链球菌的实时RPA检测方法,检出限为每个反应4~5个基因组。

人兽共患病原菌检测方面,Ren等^[18]建立了检测布鲁氏菌的重组酶聚合酶方法,可在20 min内检出低于3个拷贝的布鲁氏菌。

(2)病毒检测:Abd El Wahed等^[19]利用部分核衣壳基因RNA分子建立RT-RPA法检测中东呼吸综合征冠状病毒,只需要3~7 min就能检测最低10个拷贝的RNA分子。Escadafal等^[20]建立了LFD-RPA法检测黄热病病毒的方法,整个反应在20 min内完成,检出限达到20个拷贝/反应,与20株密切相关的病毒无交叉反应。Teoh等^[21]用RT-RPA方法检测登革热病毒,检出限为10个拷贝/反应。Moore和Jaykus^[22]建立了针对人类诺如病毒株G II.4的RT-RPA检测方法。该方法成功地从多个病例中检测到纯化的诺如病毒RNA,检出限为 $(3.40 \pm 0.20) \log_{10}$ 基因组拷贝,这与大多数其他报道的等温诺如病毒扩增方法相同。

RPA是一种新的等温扩增技术,操作过程没有复杂的要求,无需昂贵的仪器。其次,与其他等温方法相比,RPA对抑制剂具有更大的耐受性^[23],可用于更复杂的样品。因为该方法依赖的酶的成分与生物系统更相似,重组酶可以提高引物结合效率,而产生聚合酶的枯草芽孢杆菌在37℃条件下适宜生长^[22]。再次,RPA的荧光检测反应体系仅需一对引物和

一条探针即可实现对目标基因的扩增并对整个扩增过程实时监控,与其他等温扩增技术比较,RPA引物探针设计较为简单。虽然RPA检测技术具有许多优势,但目前这一技术并未得到广泛的应用,尤其在国内外相关研究报道的较少。作为一种在核酸快速检测领域具有良好应用前景的等温扩增技术,有望在将来实现更广泛的应用。

二、NASBA技术

1. 概况:NASBA是在1991年由Compton^[24]报道的1种基于等温转录的核酸体外扩增技术,整个反应分为非循环相和循环相。在非循环相中,引物P1与模板RNA退火,AMV反转录酶催化合成一条cDNA链,形成RNA-DNA杂交链,RNaseH水解RNA,留下一条单链DNA。随后引物P2与DNA链的5'末端结合,AMV反转录酶催化合成第二条DNA链。T7 RNA聚合酶识别双链DNA中的启动子区,使DNA转录为RNA,每一分子模板可产生100个拷贝的RNA。新合成的RNA进入循环相成为反转录模板。它们与引物P2结合,由AMV反转录酶催化合成DNA链,RNaseH水解RNA,留下一条单链DNA,引物P1退火,反转录酶再催化合成一条新的含有T7 RNA聚合酶启动子的DNA片段,T7 RNA聚合酶再以此DNA为模板合成RNA,如此循环使得RNA的拷贝数被不断增大。

2. 引物:NASBA技术的引物P1长约45 bp,其3'末端大约20 bp与模板的3'末端互补,5'末端含有能被T7 RNA聚合酶识别的启动子序列。引物P2大约20 bp长,其序列与模板的5'末端一致^[25]。

3. 扩增产物检测方法:

(1)直接检测法:将反应产物直接在琼脂糖甲醛变性凝胶上电泳,染色后在紫外灯下观察单链RNA片段。该方法只能初步检测反应产物,如果进一步鉴定反应产物还需要结合Northern blot、限制性酶内切位点分析等其他检测方法。

(2)荧光检测法:NASBA技术是通过分子信标(Molecular Beacon)达到实时监控的目的。分子信标一般长约18~25 nt,呈茎环结构,其中环序列是与靶核酸互补的探针,通常在信标5'末端标记FAM荧光,3'末端标记4-二甲氨基苯基偶氮苯甲酸作为通用淬灭剂。当无靶序列存在时,分子信标茎部的荧光分子与淬灭分子非常接近(7~10 nm),发生荧光共振能量转移,发出的荧光被淬灭分子吸收并散发,此时检测不到荧光信号。信标与目标杂交时,分子信标的环序列与靶序列特异性结合,荧光分子发出的荧光不能被淬灭分子吸收,可检测到荧光^[26]。用不同的荧光基团标记分子信标,使得在一个反应中扩增和实时检测不同的目标RNA,在一个反应中检测多个分析物的能力突出了实时NASBA技术比其他等温扩增方法的优势^[27]。

4. NASBA技术的优势:①操作简便,不需要经过热变性、温度循环的过程,不依赖昂贵的设备。②特异性强。由于上游引物的5'端具有T7 RNA聚合酶启动子序列,其他双链DNA不可能被扩增,而该方法使用的模板和反应的产物都是RNA,结果不受环境中DNA的影响,另外,由于反应不

需高温变性,所以不受到双链DNA的污染,更适用于粪便、血液、动物源性食品等样品的直接检测。③扩增效率高。PCR需要约20个循环可将DNA模板扩至 10^9 倍,而NASBA技术只需4~5个循环就可将RNA扩增 10^9 倍,与PCR技术相比,该技术能用较少的循环扩增出大量的目的基因^[25]。④保真度高。由于NASBA的反应时间很短,降低了酶促反应中核苷酸错配的概率,因此转录更加忠实于模板。

5. NASBA技术在病原菌检测中的应用:NASBA技术因其诸多优点,已广泛应用于病原体、基因异常的检测,肿瘤的诊断和监控、食品的监测、兽疫诊断、水质监控等领域。

(1)细菌检测:Churruca等^[28]采用基于分子信标的NASBA方法和对鸡肉中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌进行了实时检测,在16S rRNA设计特异性引物和信标探针,建立的方法具有良好的特异性。Cools等^[26]也建立了real-time NASBA技术检测空肠弯曲菌的方法。该方法设计了特异性的引物和探针,对空肠弯曲菌tuf基因和GTPase基因的mRNA进行扩增,结果只有tuf基因能够检测到100个拷贝数。Mollasalehi和Yazdanparast^[29]在沙门菌16S rRNA片段设计了高特异性的NASBA引物,同时检测肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌,设计的引物在单一反应环境下检测限 <10 cfu/ml。钟响等^[30]和雷质文等^[31]针对沙门氏菌属invA基因保守序列设计引物,分别建立常规和实时荧光NASBA检测方法,灵敏度分别为5.5 pg/ μ l和 7.1×10^2 cfu/ml。倪鑫等^[32]以副溶血性弧菌的th基因为靶基因设计特异性引物和探针,建立副溶血性弧菌的NASBA快速检测方法,该方法的最小检出限为 5.1×10^2 cfu/ml,高于普通PCR方法,而且与其他种属无任何交叉反应,实现了副溶血弧菌的快速特异性检测。

(2)病毒检测:朱晓娟等^[33]针对诺如病毒RdRp基因保守序列设计特异性引物,建立了NASBA检测方法,该法对诺如病毒具有高度特异性,与轮状病毒等腹泻相关病毒均无交叉反应,反应体系灵敏度高,最低检测限为20 pg/ μ l。徐德顺等^[34]在轮状病毒VP7基因保守序列设计引物,建立了NASBA检测方法,与诺如病毒等8种腹泻相关病毒均无交叉反应,灵敏度达5 μ g/L。Hibbitts等^[35]研究了人副流感病毒(HPIV)的NASBA检测方法。引物和探针来自HPIV1、HPIV2、HPIV3的血凝素神经氨酸酶(HN)基因的序列,结果表明该方法具有较高的灵敏度和特异性,检测限为100个拷贝的RNA,与其他呼吸道病毒之间没有交叉反应。

三、与其他等温扩增技术的比较

近几年,在逐渐发展起来的众多等温扩增技术中,LAMP和依赖解旋酶扩增技术(helicase dependent isothermal DNA amplification, HAD)应用范围也较为广泛,其他的等温扩增技术还有链置换、滚环、单引物、交叉引物等温扩增^[36]。

LAMP于2000年被Notomi等^[37]提出。该方法利用4条引物(外引物F3和B3、正向内引物和反向内引物)识别序列两端的6个特异性结合位点^[38]。该法包括琼脂糖凝胶电泳法、浊度检测法、颜色判定法^[36]。这一技术操作简单,灵敏度和特异性较高,反应结果肉眼即可观察,但是由于LAMP法

中所使用的4种引物要与6个目标区域覆盖,使得LAMP的引物设计非常复杂,而且极易产生非特异性扩增。

HAD是一种新型体外等温基因扩增技术^[39]。该技术在62~65℃下利用解旋酶解开DNA双链,SSB与之结合,保持单链DNA的稳定性,在DNA聚合酶的作用下催化生成新的双链DNA,如此重复,DNA的量呈指数增加。该技术的优势在于解旋酶不需要热变性就可以打开DNA双链,使得HDA技术的反应程序十分简单,等温条件下就可以完成,但是受解旋酶解旋速度的限制,这一方法只适合扩增短序列。

较其他等温扩增方法而言,NASBA技术更加简便、快速、特异,适用样品范围广,加上便携式NASBA检测仪的出现,使得该技术更适于现场诊断。然而NASBA方法也有一些缺点:基质相关的抑制剂能影响目的基因的扩增从而出现假阴性结果,相反,非特异性扩增出现假阳性结果,尤其当目的基因水平很低时,上述现象更容易出现。

RPA技术被称为有望取代PCR的核酸检测技术,主要优势在于不需温控仪器即可快速进行痕量DNA或RNA的特异性扩增,在临床检测和现场快速诊断方面具有显著的优势^[40]。RPA技术也存在一些缺点:在琼脂糖凝胶电泳检测时扩增产物需要纯化,另外RPA是在单一温度下进行扩增,当模板浓度较低时会产生非特异信号,影响实验结果。

从灵敏度的角度分析,NASBA技术的灵敏度为100 cfu/ml,RPA和LAMP技术的灵敏度可以达到10 cfu/ml,这与绝对定量的Taqman探针法的灵敏度相当。但是由于Taqman探针法需要依赖昂贵的温控设备,无法实现现场快速检测。

四、展望

NASBA和RPA这两种等温检测技术具有操作简便、快速,灵敏度高,特异性强等特点,在病毒、细菌、支原体、衣原体、霉菌、寄生虫和细胞因子等方面应用广泛,特别是结合了其他检测试剂盒的使用,使得这两个检测技术的普及率大大提高。相信经过不断的发展和改进,这两种技术将会在医学诊断、致病菌检测、转基因检测等多方面具有更广阔的前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Karami A, Gill P, Motamedi MHK, et al. A review of the current isothermal amplification techniques: applications, advantages and disadvantages[J]. J Global Infect Dis, 2011, 3(3): 293-302. DOI: 10.4103/0974-777X.83538.
- [2] Chen JG, Xu YC, Yan H, et al. Sensitive and rapid detection of pathogenic bacteria from urine samples using multiplex recombinase polymerase amplification[J]. Lab Chip, 2018, 18(16): 2441-2452. DOI: 10.1039/C8LC00399H.
- [3] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204.
- [4] Boyle DS, McNerney R, Low HT, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e103091. DOI: 10.1371/journal.pone.0103091.
- [5] 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. DOI: 10.1586/14737159.2015.1090877.
- [6] Jaroenram W, Owens L. Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for discriminating between infectious *Penaeus stylirostris* densovirus and virus-related sequences in shrimp genome[J]. J Virol Methods, 2014, 208: 144-151. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.08.006.
- [7] 王晓勋,徐嘉良.重组酶聚合酶扩增技术及其在食品安全领域的应用[J].食品科技,2018,43(6):1-7. DOI: 10.13684/j.cnki.spkj.2018.06.001.
- [8] Wang XX, Xu JL. Recombinase polymerase amplification technology and its application in the field of food safety detection[J]. Food Sci Technol, 2018, 43(6): 1-7. DOI: 10.13684/j.cnki.spkj.2018.06.001.
- [9] Wee EJH, Lau HY, Botella JR, et al. Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings[J]. Chem Commun, 2015, 51(27): 5828-5831. DOI: 10.1039/C4CC10068A.
- [10] Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393(2): 569-582. DOI: 10.1007/s00216-008-2287-2.
- [11] Liu HB, Zang YX, Du XJ, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria[J]. J Dairy Sci, 2017, 100(9): 7016-7025. DOI: 10.3168/jds.2016-11302.
- [12] 刘立兵,耿云云,姜彦芬,等.沙门氏菌重组酶聚合酶检测方法的建立及应用[J].食品科学,2019,40(2):298-303. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20170906-094.
- [13] Liu LB, Geng YY, Jiang YF, et al. Development and application of the Recombinase polymerase amplification assay for detection of *Salmonella* [J]. Food Sci, 2019, 40(2): 298-303. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20170906-094.
- [14] 周广彪,段建发,胡晓珊,等.重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测拟态弧菌[J].检验检疫学刊,2018,28(5):1-4.
- [15] Zhou GB, Duan JF, Hu XS, et al. Detection of *Vibrio Mimicus* heat-labile hemolysin by Recombinase Polymerase Amplification[J]. J Inspect Quarant, 2018, 28(5): 1-4.
- [16] Powell ML, Bowler FR, Martinez AJ, et al. New Fpg probe chemistry for direct detection of recombinase polymerase amplification on lateral flow strips[J]. Anal Biochem, 2018, 543: 108-115. DOI: 10.1016/j.ab.2017.12.003.
- [17] Raja B, Goux HJ, Marapadaga A, et al. Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of common bacterial urinary tract infection pathogens[J]. J Appl Microbiol, 2017, 123(2): 544-555. DOI: 10.1111/jam.13493.
- [18] Charbel E, Santiago JG. Assay for *Listeria monocytogenes* cells in whole blood using isotachopheresis and recombinase polymerase amplification[J]. Analyst, 2017, 142(1): 48-54. DOI: 10.1039/C6AN02119K.
- [19] 陈斌,杨银梅,钟志敏,等.重组酶聚合酶等温扩增快速检测结核分枝杆菌[J].热带医学杂志,2016,16(8):955-957.
- [20] Chen B, Yang YM, Zhong ZM, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* using recombinase polymerase amplification[J]. J Trop Med, 2016, 16(8): 955-957.
- [21] Clancy E, Higgins O, Forrest MS, et al. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood[J]. BMC Infect Dis, 2015, 15: 481. DOI: 10.1186/s12879-015-1212-5.

- [18] Ren H, Yang MJ, Zhang GX, et al. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for detection of *Brucella* in blood samples [J]. Mol Cell Probes, 2016, 30 (2) : 122-124. DOI: 10.1016/j.mcp.2016.02.007.
- [19] Abd El Wahed A, Patel P, Heidenreich D, et al. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. Plos Currents, 2013, 5(8) : 813-818.
- [20] Escadafal C, Faye O, Sall AA, et al. Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8 (3) : e2730. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002730.
- [21] Teoh BT, Sam SS, Tan KK, et al. Early detection of dengue virus by use of reverse transcription-recombinase polymerase amplification [J]. Clin Microbiol, 2015, 53 (3) : 830-837. DOI: 10.1128/JCM.02648-14.
- [22] Moore MD, Jaykus LA. Development of a recombinase polymerase amplification assay for detection of epidemic human noroviruses [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40244. DOI: 10.1038/srep40244.
- [23] Ahmed FA, Larrea-Sarmiento A, Alvarez AM, et al. Genome-informed diagnostics for specific and rapid detection of *Pectobacterium* species using recombinase polymerase amplification coupled with a lateral flow device [J]. Sci Rep, 2018, 8: 15972. DOI: 10.1038/s41598-018-34275-0.
- [24] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. Nature, 1991, 350(6313) : 91-92. DOI: 10.1038/350091a0.
- [25] 高闪电, 常惠芸, 丛国正, 等. NASBA (依赖核酸序列的扩增) 技术及其在病毒检测中的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29 (1) : 80-85. DOI: 10.13523/j.cb.20090116.
- Gao SD, Chang HY, Cong GZ, et al. Nucleic acid sequence-based amplification and its applications in viral diagnosis [J]. China Biotechnol, 2009, 29 (1) : 80-85. DOI: 10.13523/j.cb.20090116.
- [26] Cools I, Uyttendaele M, D' Haese E, et al. Development of a real-time NASBA assay for the detection of *Campylobacter jejuni* cells [J]. J Microbiol Methods, 2006, 66 (2) : 313-320. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.12.004.
- [27] Clancy E, Coughlan H, Higgins O, et al. Development of internally controlled duplex real-time NASBA diagnostics assays for the detection of microorganisms associated with bacterial meningitis [J]. J Microbiol Methods, 2016, 127: 197-202. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.06.017.
- [28] Churrua E, Girbau C, Martínez I, et al. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken meat samples by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacons [J]. Int J Food Microbiol, 2007, 117(1) : 85-90. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.007.
- [29] Mollasalehi H, Yazdanparast R. Development and evaluation of a novel nucleic acid sequence-based amplification method using one specific primer and one degenerate primer for simultaneous detection of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* [J]. Anal Chim Acta, 2013, 770: 169-174. DOI: 10.1016/j.aca.2013.01.053.
- [30] 钟响, 刘宁, 尹伟力, 等. 食品中沙门氏菌的NASBA快速检测技术 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34 (23) : 45-47, 64. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6521.2013.23.012.
- Zhong X, Liu N, Yin WL, et al. Rapid detection of *Salmonella* spp. in foodstuffs using NASBA assay [J]. Food Res Dev, 2013, 34(23) : 45-47, 64. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6521.2013.23.012.
- [31] 雷质文, 姜英辉, 王妍婷, 等. 沙门氏菌的依赖于核酸序列恒温扩增检测方法的建立 [J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(5) : 248-252.
- Lei ZW, Jiang YH, Wang YT, et al. Establishment of the nucleic acid sequence-based amplification method of detecting *Salmonella* [J]. J Food Saf Qual, 2011, 2(5) : 248-252.
- [32] 倪鑫, 王志聪, 雷质文, 等. 依赖于核酸序列恒温扩增技术快速检测副溶血性弧菌方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(11) : 882-886. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.2011.11.13.
- Ni X, Wang ZC, Lei ZW, et al. Establishment of the nucleic acid sequence-based amplification method of detecting *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chin J Prev Veter Med, 2011, 33 (11) : 882-886. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0589.2011.11.13.
- [33] 朱晓娟, 徐德顺, 陈莉萍, 等. 依赖核酸序列的扩增技术在诺如病毒基因检测中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(5) : 697-699.
- Zhu XJ, Xu DS, Chen LP, et al. Application of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in noroviruses fast detection [J]. Chin J Health Lab Tec, 2015, 25(5) : 697-699.
- [34] 徐德顺, 陈莉萍, 朱晓娟, 等. 依赖核酸扩增技术在轮状病毒检测中的应用 [J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16(4) : 275-278. DOI: 10.16506/j.1009-6639.2015.04.018.
- Xu DS, Chen LP, Zhu XJ, et al. Application of nucleic acid sequence-based amplification in the detection of rotavirus [J]. Chin Prev Med, 2015, 16(4) : 275-278. DOI: 10.16506/j.1009-6639.2015.04.018.
- [35] Hibbitts S, Rahman A, John R, et al. Development and evaluation of NucliSens® Basic Kit NASBA for diagnosis of parainfluenza virus infection with 'end-point' and 'realtime' detection [J]. J Virol Methods, 2003, 108(2) : 145-155.
- [36] 梁海燕, 刘文鑫, 杨志刚, 等. 恒温核酸扩增技术进展 [J]. 中国医学创新, 2017, 14(16) : 145-148. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2017.16.042.
- Liang HY, Liu WX, Yang ZG. Progress of isothermal nucleic acid amplification techniques [J]. Med Innovat China, 2017, 14 (16) : 145-148. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2017.16.042.
- [37] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12) : e63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [38] 彭志, 陈刚毅, 刘雪飞, 等. 等温核酸扩增技术在病原体检测中的应用 [J]. 生物技术进展, 2018, 8(4) : 284-292. DOI: 10.19586/j.2095-2341.2018.0011.
- Peng Z, Chen GY, Liu XF, et al. Application of isothermal nucleic acid amplification technique in pathogen detection [J]. Curr Biotechnol, 2018, 8(4) : 284-292. DOI: 10.19586/j.2095-2341.2018.0011.
- [39] Vincent M, Xu Y, Kong HM. Helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. EMBO Rep, 2004, 5(8) : 795-800. DOI: 10.1038/sj.embor.7400200.
- [40] 景志刚, 董浩, 狄栋栋, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(6) : 47-53. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.06.008.
- Jing ZG, Dong H, Di DD, et al. Research progress on recombinase polymerase amplification [J]. Biotechnol Bull, 2016, 32(6) : 47-53. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.06.008.

(收稿日期: 2018-12-05)

(本文编辑: 万玉立)