



## 重组酶聚合酶扩增技术结合侧流层析试纸条快速检测 新加坡石斑鱼虹彩病毒

潘莹<sup>1</sup>, 杨家辉<sup>1</sup>, 彭发永<sup>1</sup>, 黄友华<sup>1</sup>, 秦启伟<sup>1,2</sup>, 黄晓红<sup>1,2\*</sup>

(1. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642;

2. 广州华农南沙渔业研究院, 广东 广州 511464)

**摘要:** 为建立一种快速灵敏、可视化的适用于临床样品检测新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 的方法, 本研究针对 SGIV 特异基因 ORF014L 序列设计特异性引物及探针, 建立重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 技术及结合侧流层析试纸条 (lateral flow dipstick, LFD) (RPA-LFD) 的 SGIV 检测技术。RPA 反应使用 10 μmol/L 的引物浓度, 在 40.1 °C 恒温反应 20 min 即可完成特异性病毒的检测, 最低检测限为 10<sup>2</sup> 个/μL 标准质粒。RPA-LFD 反应在 42 °C 恒温反应 8 min 可将检测结果通过试纸条可视化呈现, 最低检测限为 10<sup>1</sup> 个/μL 标准质粒, 且与其他常见水生动物病原发生交叉反应, 临床样品检测结果也与 PCR 检测结果一致。RPA、RPA-LFD 均能特异性检测 SGIV, 两者的检测限均比常规 PCR 灵敏。RPA-LFD 法具有快捷简单、结果可视化的特点, 在临床应用具有较好的应用前景。

**关键词:** 新加坡石斑鱼虹彩病毒; ORF014L 基因; 重组酶聚合酶扩增; 侧流层析试纸条; 可视化

中图分类号: S 942

文献标志码: A

随着水产养殖品种的增多和养殖规模的扩大, 频发和流行的传染性疾病已成为制约水产养殖业健康可持续发展的主要瓶颈。虹彩病毒 (iridovirus) 是一类具正二十面体的双链大 DNA 病毒, 目前从世界各地 100 多种鱼类中分离鉴定出虹彩病毒<sup>[1]</sup>, 其已成为海水和淡水养殖鱼类最严重的病毒性病原之一。虹彩病毒科 (Iridoviridae) 分为 2 个亚科, 即感染鱼类、两栖和爬行动物的虹彩病毒 α 亚科, 包括蛙病毒属 (*Ranavirus*)、细胞肿大病毒属 (*Megalocytivirus*) 和淋巴囊肿病毒属 (*Lymphocystivirus*), 感染无脊椎动物的虹彩病毒 β 亚科, 包括虹彩病毒属 (*Iridovirus*)、绿虹彩

病毒属 (*Chloriridovirus*) 和十足目虹彩病毒属 (*Decapodiridovirus*)<sup>[2]</sup>。其中蛙病毒属成员不仅严重威胁低等水生脊椎动物的多样性和生态安全, 也给水产养殖业造成重大经济损失。新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 是从新加坡患病的石斑鱼中分离鉴定的高致病性虹彩病毒, 属于蛙病毒属的一个新种<sup>[2]</sup>。SGIV 主要感染石斑鱼 (*Epinephelus* spp.) 仔鱼和幼鱼, 感染可导致高达 90% 的死亡率, 给石斑鱼养殖业造成重大经济损失。目前从我国海南、广东、山东、天津和广西等地养殖石斑鱼中鉴定到 SGIV 的分离株, 提示其已经成为我国石斑鱼重要的传染性

收稿日期: 2023-10-08 修回日期: 2024-01-31

资助项目: 国家重点研发计划课题 (2023YFD2401703); 国家海水鱼产业技术体系专项 (CARS-47-G16); 国家自然科学基金 (U20A20102)

第一作者: 潘莹 (照片), 从事水生动物病害控制研究, E-mail: [panying@stu.scau.edu.cn](mailto:panying@stu.scau.edu.cn)

通信作者: 黄晓红, 从事水生动物疾病防治研究, E-mail: [huangxh@scau.edu.cn](mailto:huangxh@scau.edu.cn)



病原。目前对于 SGIV 尚缺乏有效的治疗方法和防控措施, 早期检测和诊断是预防该病暴发和流行的关键环节。

目前已经报道的针对 SGIV 的检测方法, 主要包括基于病毒学的电镜观察法<sup>[3]</sup>、病毒分离培养法<sup>[4]</sup>、基于组织病理的免疫组化分析<sup>[5]</sup>、基于单克隆抗体的流式细胞检测技术<sup>[6]</sup>、微流控芯片结合酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测系统<sup>[7]</sup>。随着分子生物学技术的发展, 研究人员开发出新型的检测方法, 如环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测方法<sup>[8]</sup>、基于核酸适配体的检测方法 [核酸适配体免疫吸附测定 (aptamer-based sandwich enzyme-linked aptamer sorbent assay) 和核酸适配体侧流层析测定 (aptamer-based lateral flow biosensor)]<sup>[9-10]</sup>。其中, 新型的 LAMP 检测方法引物设计复杂且在多重扩增方面有一定局限性; 基于核酸适配体的检测方法则灵敏度较低, 而其他较为传统的检测方法对设备要求高、需要专业的技术人员和耗时长等特点, 在临床样品检测中的应用前景有一定限制。

重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是英国的 TwistDx Inc 公司 2006 年开发的一种新型的等温核酸扩增技术<sup>[11]</sup>。由于该技术不受仪器设备和检测场地的限制, 具有操作简单、灵敏度高和特异性强及检测时间短等优点, 被认为是一种可替代 PCR 的核酸扩增技术<sup>[12-13]</sup>。该技术反应原理与 T4 噬菌体的复制原理相似, 即在恒温条件下, 利用重组酶、单链结合蛋白、链置换蛋白实现对模板 DNA 的识别结合、解链、结合及扩增<sup>[14]</sup>。此外, 核酸经 RPA 扩增后可整合多种检测模式, 如常规的凝胶电泳、试纸条、实时荧光检测、新型的微流控生物传感器<sup>[14-15]</sup> 或 SiSA 芯片分析技术<sup>[16]</sup> 等。

RPA 结合侧流层析试纸条 (lateral flow dipstick, LFD)(RPA-LFD) 检测方法具有检测时间短及结果可视化等优点, 较适用于养殖现场样品的即时检测。近年来, 开发了针对多种水生动物病毒性病原的 RPA 及其衍生的检测技术, 包括罗非鱼湖病毒 (tilapia lake virus)<sup>[17]</sup>、病毒性出血性败血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus)<sup>[18]</sup>、鲤疱疹病毒 II 型 (cyprinid herpesvirus 2)<sup>[19]</sup>、鲤疱疹病毒 III 型 (cyprinid herpesvirus 3)<sup>[20]</sup>、鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus)<sup>[21]</sup>、白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus)<sup>[22]</sup>、草鱼出血病病毒

III 型 (grass carp reovirus III)<sup>[23]</sup> 和鲤浮肿病毒 (carp edema virus)<sup>[24]</sup> 等。

根据前期测序的 SGIV 全基因信息结合生物信息学比较发现<sup>[25]</sup>, ORF014L 为 SGIV 独有的基因, 在其他鱼类虹彩病毒中未发现同源基因。此外, 近期有关 SGIV 近原子水平的结构解析结果发现, SGIV ORF014L 可能为病毒的次衣壳蛋白编码基因<sup>[26]</sup>, 故选择 ORF014L 作为检测靶标基因, 设计引物及探针, 建立 RPA-LFD 快速检测 SGIV 方法, 为实验条件有限的养殖现场样品 SGIV 的诊断提供技术保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株、菌株与样品

SGIV、大口黑鲈虹彩病毒 (largemouth bass ranavirus, LMBV)、传染性脾肾坏死病毒 (infection spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 均由本实验室提供并保存。24 份疑似感染 SGIV 的临床鱼体样品从广东和海南石斑鱼养殖场采集及华南农业大学循环水养殖系统人工感染获得。

### 1.2 主要试剂

TwistAmp® Basic Kit 试剂盒购于 TwistDx 公司。Milenia GenLine HybriDtect 1 购于德国 Milenia Biotec 公司。pCDNA3.1-3×HA 载体及 RNase-free water 购于宝日医生物技术 (北京) 有限公司。组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司。细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒购于广州双螺旋基因技术有限公司。E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit PCR 产物纯化试剂盒及 E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit 质粒提取试剂盒购于 Omega Bio-Tek 公司。DNA 恒温快速扩增试剂盒 (胶体金试纸条型) 购于潍坊安普未来生物科技有限公司。DH5α 感受态细胞、DL2000 DNA Marker、6×Loading Buffer 均购于广州擎科生物有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

从 NCBI 中下载 SGIV 特异基因 ORF014L 序列, 并根据 TwistDx 公司说明书, 使用 Primer premier 5.0 软件设计 4 对特异性 RPA 引物 (014-

104F/R、014-165F/R、014-271F/R、014-348F/R)。RPA 最优引物通过普通 RPA 反应体系筛选。为结合侧流层析试纸条的可视化检测, 根据 TwistDx 公司说明书设计 TwistAmp<sup>®</sup> nfo 探针。探针设计基于 SGIV ORF014L 序列之间的最优上游和下游 RPA 引物。在探针 3'端上采用阻断聚合酶扩增 C3spacer 基团修饰, 5'端上进行羧基荧光素 (FAM)

标记, 并于探针中第 30 位 C 和第 31 位 C 之间加入四氢呋喃脱碱基位点 (THF) 修饰。同时, 在下游引物 5'端中应用生物素标记。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 探针由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。引物和探针的序列见表 1。

表 1 实验相关引物及探针序列信息

Tab. 1 Sequence information of primers and probes used in this study

名称 name	序列 (5'-3') sequence(5'-3')
014-104F	TCCGACTATCAATCAAACGTCATCGCCTCG
014-104R	CACCCGTTGTCGCAGTTTCGTATAGACCC
014-165F	CAAGTGACGACCGAACACCGGCTACCAGC
014-165R	AGCCATCGAACCCGTAGTCATATTGTGGA
014-271F	GCTACCAGCATCCAATTCTCACGCAAGAT
014-271R	GGCGATGACGTTTGATTGATAGTCGGAAA
014-348F	GCTACCAGCATCCAATTCTCACGCAAGAT
014-348R	CACCCGTTGTCGCAGTTTCGTATAGACCC
probe	(FAM)-AGCATCCAATTCTCACGCAAGATGGCCCCGT-(THF)-GAAGTCAGTTTCTATTTC-(C3spacer)
R1	(biotin)-CACCCGTTGTCGCAGTTTCGTATAGACCC
R2	(biotin)-AGGCGATGACGTGTGATTGATAGTCTGAAA
R3	(biotin)-CGCATGTCGACCGAGGCGATGACGTTTGAT
PCR-266F	AGCACAAGTTTCTCCCG
PCR-266R	ACACCCGTTGTCGCAGTT
pcDNA3.1-3×HA-ORF014-F	CTTGGTACCGAGTCATGTATAGAGGATTTCTTTAA
pcDNA3.1-3×HA-ORF014-R	GCCCTCTAGACTCGA TATGTACACCCGTTGTC

#### 1.4 RPA 引物筛选及反应条件的优化

**样品 DNA 的提取** 分别取健康点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 及患病点带石斑鱼的肝脏和脾脏研磨成组织匀浆, 按照组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取组织 DNA。收取 SGIV、LMBV 和 ISKNV 感染细胞, 按照细胞 DNA 提取试剂盒提取感染细胞的 DNA。按照细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒的说明提取哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌、无乳链球菌的基因组 DNA。以上提取的 DNA 存放于 -20 °C 冰箱中备用。

##### 重组质粒 pcDNA3.1×HA-ORF014 的构建

以 SGIV 感染细胞提取的 DNA 为模板, 利用设计的引物对 SGIV ORF014L 基因序列进行 PCR 扩增, 所用引物信息 (pcDNA3.1-3×HA-ORF014-F、pcDNA3.1-3×HA-ORF014-R) 见表 1。纯化后的产物与 pcDNA3.1-3×HA 载体连接后转入 DH5α 感受

态细胞, 涂板后进行菌落 PCR 鉴定, 挑选阳性单菌落进行测序验证, 重组质粒命名为 3×HA-ORF014。验证成功的单菌落扩大培养, 按照 E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit 质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒。提取完成后用 Nanodrop-2000 分光光度计测量质粒浓度, 保存于 -20 °C 备用。

##### 重组质粒 3×HA-ORF014 拷贝数的计算

分光光度计测得提取的重组质粒 3×HA-ORF014 浓度为 167 ng/μL, 碱基数为 5 967 bp, 根据拷贝数计算公式: 拷贝数 (个/μL) = 6.023×10<sup>23</sup>×质粒浓度 (ng/μL)×10<sup>-9</sup> / (质粒碱基数×660), 计算出重组质粒 3×HA-ORF014 拷贝数为 2.5×10<sup>10</sup> 个/μL, 稀释至 1×10<sup>10</sup> 个/μL。以 1×10<sup>10</sup> 个/μL 为原始浓度经 10 倍梯度稀释为 1×10<sup>6</sup>~1×10<sup>0</sup> 个/μL 的 7 个浓度的标准质粒用于后续实验。

##### RPA 反应体系的建立及反应条件的优化

据 TwistAmp® Basic Kit 试剂盒说明书配置 50  $\mu\text{L}$  反应体系: 向 RPA 反应管中加入 29.5  $\mu\text{L}$  Primer Free Rehydration Buffer, 2.4  $\mu\text{L}$  Primer A, 2.4  $\mu\text{L}$  Primer B, 2  $\mu\text{L}$  DNA 模板 (浓度为 300  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 11.2  $\mu\text{L}$  RNase-free water, 总体积为 47.5  $\mu\text{L}$ ; 无菌水作为阴性对照, 反应管中组分充分混匀后加入 280  $\text{mmol}/\text{L}$  MgOAc 2.5  $\mu\text{L}$  置于 39  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅反应 20 min, 反应结束后加入等体积酚氯仿纯化 RPA 产物, RPA 纯化产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。为提高 RPA 反应效率, 获取其最佳的反应条件, 对 RPA 反应温度 (32.0、33.1、34.9、37.1、40.1、42.4、43.9、45.0  $^{\circ}\text{C}$ )、反应时间 (5、10、15、20、25、30、35、40 min)、反应引物浓度 (1.0、5.0、7.5、10.0、20.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 进行优化。

### 1.5 RPA-LFD 反应体系的建立及条件优化

根据 DNA 恒温快速扩增试剂盒 (胶体金试纸条型) 说明书配置 RPA-LFD 反应体系: 29.4  $\mu\text{L}$  A Buffer, 2.4  $\mu\text{L}$  上游引物, 2.4  $\mu\text{L}$  下游引物, 2  $\mu\text{L}$  DNA 模板 (浓度为 300  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 11.2  $\mu\text{L}$  RNase-free water, 总体积为 47.5  $\mu\text{L}$ ; 无菌水作为阴性对照, 将反应管中组分充分混匀后加入 B Buffer 2.5  $\mu\text{L}$  置于 39  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅反应 10 min。取 10  $\mu\text{L}$  扩增产物加入到含有 190  $\mu\text{L}$  RNase-free water 的 0.2 mL 离心管中, 吹打混匀后迅速将试纸条插入离心管中, 在 5 min 内观察检测线和质控线, 根据检测线和质控线的显色情况判读结果。若检测线与质控线均出现红褐色条带, 结果判定为阳性; 若质控线出现红褐色条带, 检测线无红褐色条带, 结果判定为阴性; 若检测线和质控线均无条带, 结果判定为无效。为提高 RPA-LFD 反应效率, 获取其最佳的反应条件, 对 RPA-LFD 反应温度 (30、34、38、42、46、50  $^{\circ}\text{C}$ )、反应时间 (1、5、8、10、15、20、30 min) 进行优化。

### 1.6 RPA、RPA-LFD 检测方法的病原特异性

以提取的几种病原 (SGIV、LMBV、ISKNV、哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌及无乳链球菌) 的 DNA 分别作为 RPA 和 RPA-LFD 反应模板, 无菌水作为阴性对照, 在最适反应条件下进行 RPA、RPA-LFD 反应, 评价靶标 SGIV ORF014L 的 RPA、RPA-LFD 检测方法的病原特异性。

### 1.7 RPA、RPA-LFD 检测方法的灵敏性

为了测定靶标 SGIV ORF014L 的 RPA-LFD

检测方法的灵敏性, 用去离子水将标准质粒 3 $\times$  HA-ORF014 连续 10 倍稀释至  $1\times 10^6\sim 1\times 10^0$  个/ $\mu\text{L}$ , 以稀释后的标准质粒 DNA 为模板, 在最适反应条件下进行 RPA、RPA-LFD 反应。同时, 使用稀释后的标准质粒 DNA 为模板进行 PCR 反应, PCR 反应所用的引物见表 1, 并设置阴性对照, 比较二者之间检测灵敏度的差异。

### 1.8 RPA-LFD 方法对临床样品检测的适用性

24 份疑似感染 SGIV 的临床鱼体样品来自广东和海南石斑鱼养殖场及华南农业大学循环水养殖系统人工感染, 提取病变组织 (肝脏和脾脏混合) 的 DNA 作为模板, 应用 PCR 和 RPA-LFD 两种方法检测临床样品中的 SGIV, 验证 RPA-LFD 检测方法的临床实用性和准确性。

本研究获得了华南农业大学动物研究与伦理委员会的批准 (审批号: 2020g009, 2020.9.8), 所有实验都严格按照指导方针和规定进行。

## 2 结果

### 2.1 RPA 反应引物的筛选

针对 SGIV ORF014L 基因序列设计出 014-104F/R、014-165F/R、014-271F/R、014-348F/R 共 4 对引物 (表 1), 以 SGIV 感染细胞的 DNA 作为模板进行 RPA 反应扩增, 使用琼脂糖凝胶电泳对纯化后的扩增产物可视化分析。电泳结果显示, 4 对引物均能扩增出对应大小的目的条带, 其中引物 014-165F/R 和 014-348F/R 扩增出的条带清晰明亮, 且阴性样本无目的条带, 而引物 014-104F/R 和 014-271F/R 的扩增产物阴性样本检出条带 (图 1), 故选择阳性条带清晰明亮, 阴性对照更干净无杂带的引物 014-348F/R 为 RPA 方法的最适引物。同时针对引物 014-348F/R 设计探针, 用于 RPA-LFD 方法的建立。

### 2.2 RPA 反应条件的优化

为提高 RPA 反应效率, 获取其最佳的反应条件, 对 RPA 反应时间、反应温度及引物浓度进行优化。当反应时间为 20 min 和引物浓度为 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  时, 测定 RPA 在不同温度下 (32.0、33.1、34.9、37.1、40.1、42.4、43.9、45.0  $^{\circ}\text{C}$ ) 的反应扩增情况。结果显示, 在 32.0~45.0  $^{\circ}\text{C}$  温度条件下均有目的条带, 当反应温度为 40.1  $^{\circ}\text{C}$ , 目的条带最亮 (图 2-a), 故选择 40.1  $^{\circ}\text{C}$  为 RPA 反应的最佳

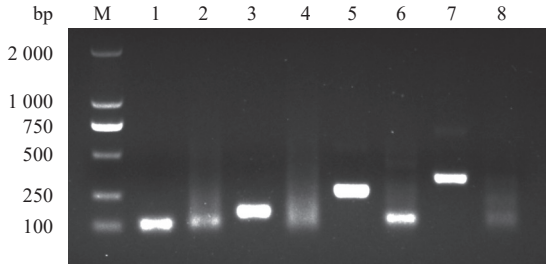


图 1 不同 RPA 引物对的扩增结果

M. DL2000 DNA marker; 1. 014-104F/014-104R 引物对; 2. 014-104F/014-104R 引物对 (阴性对照); 3. 014-165F/014-165R 引物对; 4. 014-165F/014-165R 引物对 (阴性对照); 5. 014-271F/014-271R 引物对; 6. 014-271F/014-271R 引物对 (阴性对照); 7. 014-348F/014-348R 引物对; 8. 014-348F/014-348R 引物对 (阴性对照)。

Fig. 1 Amplification results of different RPA primer pairs

M. DL2000 DNA marker; 1.014-104F/014-104R primer pairs; 2. 014-104F/014-104R primer pairs (negative control); 3. 014-165F/014-165R primer pairs; 4.014-165F/014-165R primer pairs (negative control); 5. 014-271F/014-271R primer pairs; 6.014-271F/014-271R primer pairs (negative control); 7. 014-348F/014-348R primer pairs; 8. 014-348F/014-348R primer pairs (negative control).

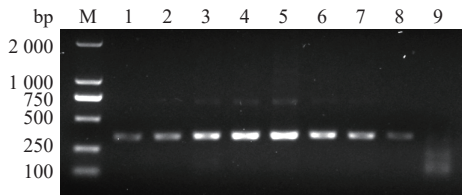
反应温度。当反应温度为 40.1 °C 和引物浓度为 10 μmol/L 时, 测定 RPA 在不同反应时间 (5、10、15、20、25、30、35、40 min) 的反应扩增情况。结果显示, 在反应时间为 10~40 min 时均能扩增

出目的条带, 为实现快速检测目的, 选择 20 min 为 RPA 反应的最佳反应时间 (图 2-b)。当反应时间为 20 min 和反应温度为 40.1 °C 时, 测定 RPA 在实验不同引物浓度 (1.0、5.0、7.5、10.0、20.0 μmol/L) 时的反应扩增情况。结果如图 2-c 所示, 当引物浓度为 5~20 μmol/L 均能扩增出目的条带, 引物浓度为 10 μmol/L 时目的条带最亮, 故选择 10 μmol/L 作为 RPA 反应的最佳引物浓度。

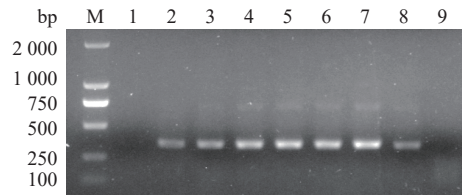
### 2.3 RPA-LFD 检测体系的建立与反应条件优化

根据 014-348F/R 扩增序列并结合 TwisAmp® nfo Kit 说明书设计用于 RPA-LFD 的 3 条带有生物素标记的反向引物 (R1、R2、R3) 及探针 Probe。按照建立的 RPA-LFD 反应体系, 以 SGIV 感染细胞的 DNA 作为模板, 分别使用 3 对引物探针组合 014-348F/R1/probe、014-348F/R2/probe、014-348F/R3/probe (表 1) 进行反应。结果显示, 3 组引物探针组合均能检测出阳性样品, 其中 014-348F/R1/probe 引物探针组合的检测线最明显 (图 3), 故选择 014-348F/R1/probe 引物探针组合用于后续实验。

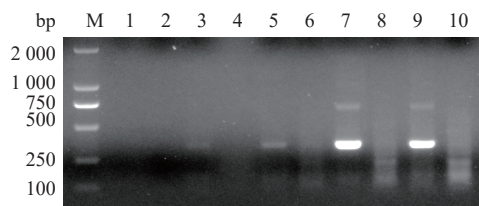
为提高 RPA-LFD 反应效率, 获取其最佳的反应条件, 对 RPA-LFD 反应时间、反应温度进行



(a)



(b)



(c)

图 2 RPA 检测方法的反应温度 (a)、反应时间 (b)、引物浓度 (c) 优化结果

(a) M. DL2000 DNA marker, 1. 32.0 °C, 2. 33.1 °C, 3. 34.9 °C, 4. 37.1 °C, 5. 40.1 °C, 6. 42.4 °C, 7. 43.9 °C, 8. 45.0 °C, 9. 阴性对照; (b) M. DL2000 DNA marker, 1. 5 min, 2. 10 min, 3. 15 min, 4. 20 min, 5. 25 min, 6. 30 min, 7. 35 min, 8. 40 min, 9. 阴性对照; (c) M. DL2000 DNA marker, 1. 1.0 μmol/L, 2. 1.0 μmol/L (阴性对照), 3. 5.0 μmol/L, 4. 5.0 μmol/L (阴性对照), 5. 7.5 μmol/L, 6. 7.5 μmol/L (阴性对照), 7. 10.0 μmol/L, 8. 10.0 μmol/L (阴性对照), 9. 20.0 μmol/L, 10. 20.0 μmol/L (阴性对照)。

Fig. 2 Optimization results of different temperatures (a), time (b) and concentrations of primer pair (c) for RPA assay

(a) M. DL2000 DNA marker, 1. 32.0 °C, 2. 33.1 °C, 3. 34.9 °C, 4. 37.1 °C, 5. 40.1 °C, 6. 42.4 °C, 7. 43.9 °C, 8. 45.0 °C, 9. negative control; (b) M. DL2000 DNA marker, 1. 5 min, 2. 10 min, 3. 15 min, 4. 20 min, 5. 25 min, 6. 30 min, 7. 35 min, 8. 40 min, 9. negative control; (c) M. DL2000 DNA marker, 1. 1.0 μmol/L, 2. 1.0 μmol/L (negative control), 3. 5.0 μmol/L, 4. 5.0 μmol/L (negative control), 5. 7.5 μmol/L, 6. 7.5 μmol/L (negative control), 7. 10.0 μmol/L, 8. 10.0 μmol/L (negative control), 9. 20.0 μmol/L, 10. 20.0 μmol/L (negative control).

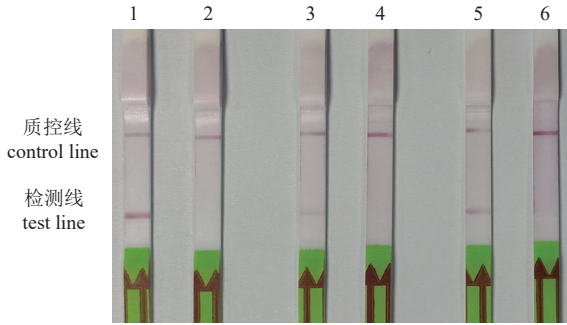


图3 不同 RPA-LFD 引物探针组合的扩增结果

1. 014-348F/R1/probe 引物探针组; 2. 014-348F/R1/probe 引物探针组 (阴性对照); 3. 014-348F/R2/ probe 引物探针组; 4. 014-348F/R2/probe 引物探针组 (阴性对照); 5. 014-348F/R3 引物探针组; 6. 014-348F/R3/probe 引物探针组 (阴性对照)。

Fig. 3 Amplification results of different RPA-LFD primers and probes

1. 014-348F/R1/probe prime-prode set; 2. 014-348F/R1/probe prime-prode set (negative control); 3. 014-348F/R2/probe prime-prode set; 4. 014-348F/R2/probe prime-prode set (negative control); 5. 014-348F/R3/probe set; 6. 014-348F/R3/probe prime-prode set (negative control).

优化。当反应时间为 10 min 时, 测定 RPA-LFD 在不同温度下 (30、34、38、42、46、50 °C) 的反应扩增情况。结果如图 4-a 所示, 在 34~42 °C 的反应温度下, 检测线均有条带, 在 42 °C 反应条件下, 检测线条带最明显, 故选择 42 °C 为最佳反应温度。当反应温度为 42 °C 时, 测定 RPA-LFD 在不同反应时间 (1、5、8、10、15、20、30 min) 的反应扩增情况。结果如图 4-b 所示, 反应时间为 5~30 min 时, 检测线均有条带, 反应时间为 8 min 时, 检测线出现较明显条带, 为实现快速检测目的, 最终选择反应时间 8 min, 反应温度 42 °C 为最佳反应条件。

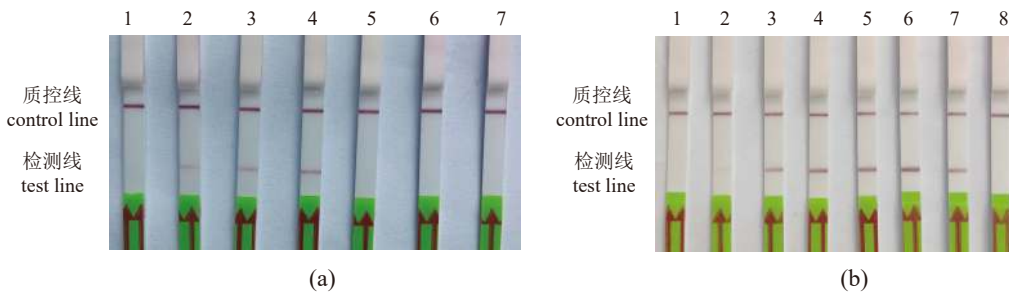


图4 RPA-LFD 检测方法的反应温度 (a)、反应时间 (b) 优化结果

(a) 1. 32 °C, 2. 34 °C, 3. 38 °C, 4. 42 °C, 5. 46 °C, 6. 50 °C, 7. 阴性对照; (b) 1. 1 min, 2. 5 min, 3. 8 min, 4. 10 min, 5. 15 min, 6. 20 min, 7. 30 min, 8. 阴性对照。

Fig. 4 Optimization results of different temperatures(a) and time(b) for RPA-LFD assay

(a) 1. 32 °C, 2. 34 °C, 3. 38 °C, 4. 42 °C, 5. 46 °C, 6. 50 °C, 7. negative control; (b) 1. 1 min, 2. 5 min, 3. 8 min, 4. 10 min, 5. 15 min, 6. 20 min, 7. 30 min, 8. negative control.

## 2.4 RPA 和 RPA-LFD 方法病原特异性检测

选取 SGIV、LMBV、ISKNV、哈维氏弧菌、嗜水气单胞菌、无乳链球菌 6 种常见水生病原作为检测对象, 利用条件优化后的 RPA、RPA-LFD 反应条件进行病原特异性检测分析。RPA 检测结果表明, 仅在以 SGIV 感染细胞 DNA 为模板的样品中扩增出目的条带, 而其他病原样品及阴性对照样品均未扩增出目的条带 (图 5-a)。RPA-LFD 检测结果如图 5-b 所示, 仅在 SGIV 感染细胞的样品中同时出现控制线和检测线条带, 而其他病原样品中均只出现控制线条带。以上结果表明本研究建立的 SGIV RPA、RPA-LFD 检测方法具有较强的病原特异性。

## 2.5 RPA 和 RPA-LFD 方法病原检测灵敏度

为测定 RPA、RPA-LFD 检测方法的灵敏性, 用去离子水稀释的不同浓度的重组质粒 3×HA-ORF014 为模板, 无菌水作为阴性对照。利用条件优化后的 RPA、RPA-LFD 检测方法进行灵敏性实验, 并与 PCR 方法的检测结果进行对比。结果显示, RPA 方法的最低检测限为  $10^2$  个/ $\mu$ L 标准质粒 (图 6-b), RPA-LFD 方法的最低检测限为  $10^1$  个/ $\mu$ L 标准质粒 (图 6-c), 而 PCR 方法最低能够检测到  $10^3$  个/ $\mu$ L 标准质粒 (图 6-a), 表明 RPA-LFD 检测方法的灵敏性是 PCR 方法的 100 倍。

## 2.6 RPA-LFD 方法对临床样品检测的适用性

对 24 份临床样品分别采用 PCR 和 RPA-LFD 检测, 结果如图 7 所示, RPA-LFD 检测方法检出的 SGIV 的阳性样品与 PCR 检测结果一致, 两者的符合率为 100%。表明本研究中建立的靶标

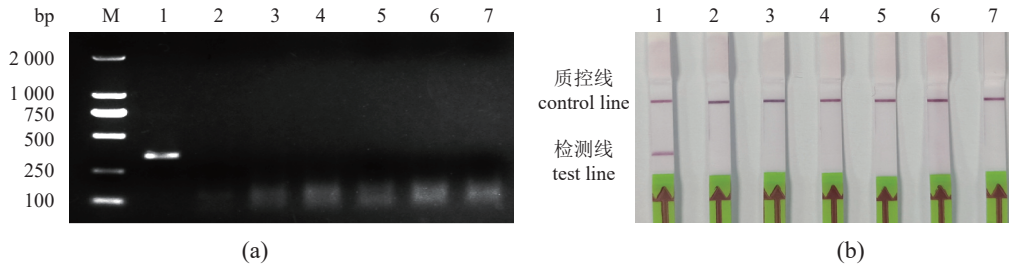


图5 RPA(a)、RPA-LFD(b)检测方法的特异性结果

(a) M. DL2000 DNA marker, 1. 新加坡石斑鱼虹彩病毒基因组 DNA, 2. 大口黑鲈虹彩病毒基因组 DNA, 3. 传染性脾肾坏死病毒基因组 DNA, 4. 哈维氏弧菌基因组 DNA, 5. 嗜水气单胞菌基因组 DNA, 6. 无乳链球菌基因组 DNA, 7. 阴性对照; (b) 1. 新加坡石斑鱼虹彩病毒基因组 DNA, 2. 大口黑鲈虹彩病毒基因组 DNA, 3. 传染性脾肾坏死病毒基因组 DNA, 4. 哈维氏弧菌基因组 DNA, 5. 嗜水气单胞菌基因组 DNA, 6. 无乳链球菌基因组 DNA, 7. 阴性对照。

Fig. 5 Specificity results of RPA (a) and RPA-LFD (b) assays

(a) M. DL2000 DNA marker, 1. genomic DNA of Singapore grouper iridovirus, 2. genomic DNA of largemouth bass ranavirus, 3. genomic DNA of infection spleen and kidney necrosis virus, 4. genomic DNA of *V. harveyi*, 5. genomic DNA of *A. hydrophila*, 6. genomic DNA of *S. agalactiae*, 7. negative control; (b) 1. genomic DNA of Singapore grouper iridovirus, 2. genomic DNA of largemouth bass ranavirus, 3. genomic DNA of infection spleen and kidney necrosis virus, 4. genomic DNA of *V. harveyi*, 5. genomic DNA of *A. hydrophila*, 6. genomic DNA of *S. agalactiae*, 7. negative control.

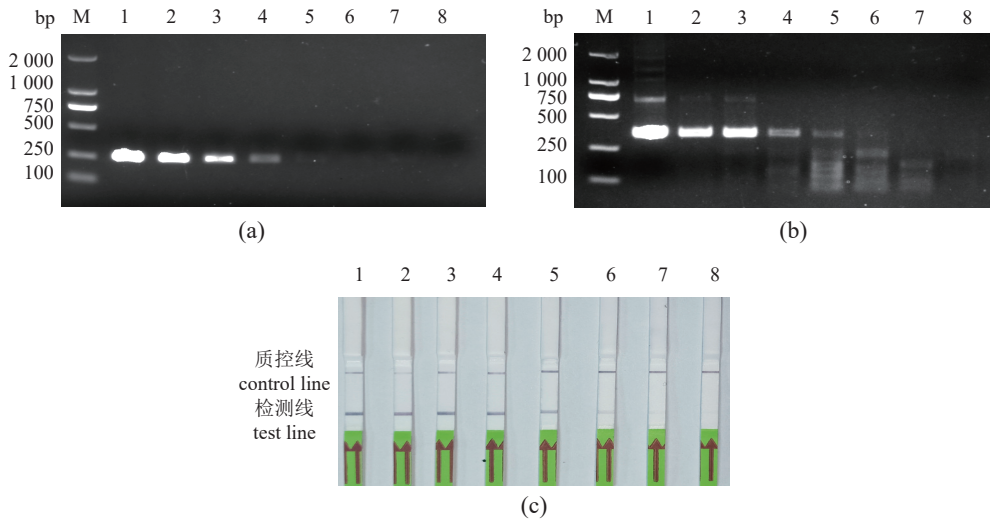


图6 PCR(a)、RPA(b)、RPA-LFD(c)检测方法的灵敏性结果

(a) M. DL2000 DNA marker, 1.  $10^6$  个/ $\mu\text{L}$ , 2.  $10^5$  个/ $\mu\text{L}$ , 3.  $10^4$  个/ $\mu\text{L}$ , 4.  $10^3$  个/ $\mu\text{L}$ , 5.  $10^2$  个/ $\mu\text{L}$ , 6.  $10^1$  个/ $\mu\text{L}$ , 7.  $10^0$  个/ $\mu\text{L}$ , 8. 阴性对照; (b) M. DL2000 DNA marker, 1.  $10^6$  个/ $\mu\text{L}$ , 2.  $10^5$  个/ $\mu\text{L}$ , 3.  $10^4$  个/ $\mu\text{L}$ , 4.  $10^3$  个/ $\mu\text{L}$ , 5.  $10^2$  个/ $\mu\text{L}$ , 6.  $10^1$  个/ $\mu\text{L}$ , 7.  $10^0$  个/ $\mu\text{L}$ , 8. 阴性对照; (c) 1.  $10^6$  个/ $\mu\text{L}$ , 2.  $10^5$  个/ $\mu\text{L}$ , 3.  $10^4$  个/ $\mu\text{L}$ , 4.  $10^3$  个/ $\mu\text{L}$ , 5.  $10^2$  个/ $\mu\text{L}$ , 6.  $10^1$  个/ $\mu\text{L}$ , 7.  $10^0$  个/ $\mu\text{L}$ , 8. 阴性对照。

Fig. 6 Sensitivity results of PCR (a), RPA (b) and RPA-LFD (c) assays

(a) M. DL2 000 DNA marker; 1.  $10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 2.  $10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 3.  $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 4.  $10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 5.  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 6.  $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 7.  $10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 8. negative control; (b) M. DL2 000 DNA marker; 1.  $10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 2.  $10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 3.  $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 4.  $10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 5.  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 6.  $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 7.  $10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 8. negative control; (c) 1.  $10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 2.  $10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 3.  $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 4.  $10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 5.  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 6.  $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 7.  $10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 8. negative control.

SGIV ORF014L 的 RPA-LFD 检测体系适用于临床样品中 SGIV 的检测。

### 3 讨论

石斑鱼是我国南方和东南亚国家重要的海水经济养殖鱼类, 据《2023 年渔业统计年鉴》数据

显示, 2022 年我国石斑鱼养殖产量突破 20 万 t, 位居海水鱼产量第四位。随着石斑鱼养殖规模的扩大和养殖环境恶化, 各种传染性疾病不断暴发和流行, 已成为制约石斑鱼养殖业健康可持续发展的主要瓶颈。虹彩病毒和神经坏死症病毒是石斑鱼最主要的两种病毒性病原, 不仅严重制约石

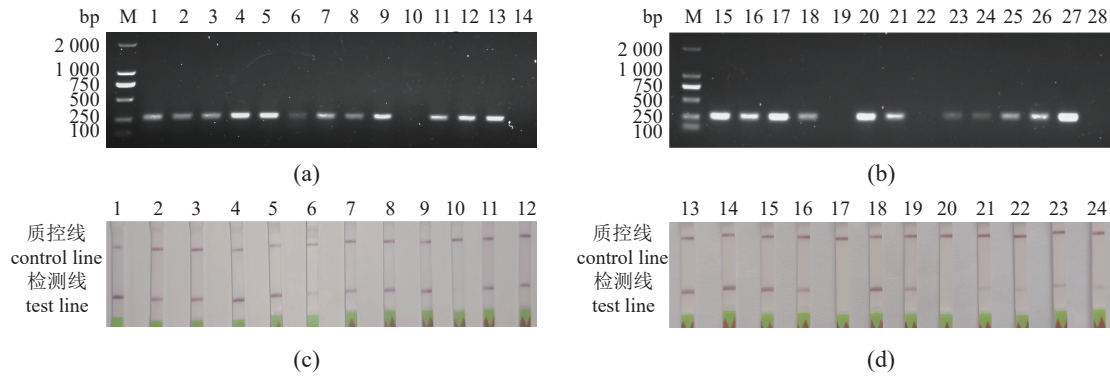


图 7 PCR 法 (a)(b)、RPA-LFD(c)(d) 法的临床样品检测结果

(a) M. DL2000 DNA marker, 1~12. 样品 1~12 号; 13. 阳性样本, 14. 阴性样本; (b) M. DL2000 DNA marker, 15~26. 样品 15~26 号, 27. 阳性样本, 28. 阴性样本; (c) 1~12. 样品 1~12 号; (d) 13~24. 样品 13~24 号。

Fig. 7 Results of clinical samples tested by PCR (a)(b) and RPA-LFD (c)(d) assays

(a) M. DL2000 DNA marker, 1-12. sample 1-12, 13. positive control, 14. negative control; (b) M. DL2000 DNA marker, 15-26. sample 15-26, 27. positive control, 28. negative control; (c) 1-12. sample 1-12; (d) 13-24. sample 13-24.

斑鱼种苗的供应, 也给石斑鱼成鱼养殖造成重大经济损失。作为蛙病毒属的新种, SGIV 首次是从新加坡患病的石斑鱼中分离鉴定到, 目前已在我国海南、广东、山东、天津和广西等地养殖石斑鱼中鉴定到 SGIV 的分离株, 提示其在我国和东南亚国家养殖石斑鱼中的广泛流行。目前针对 SGIV 尚缺乏有效的治疗方法, 对其防治主要集中于综合防控, 包括疫苗研发、免疫增强剂筛选及风险评估模型构建等<sup>[27-29]</sup>。尽管 SGIV 灭活疫苗已经获批农业农村部颁发的兽用生物制品临床试验批件 (批件号: 2021006), 但由于尚未获得新兽药证书和正式生产批文, 目前还未能大规模推广接种使用。故目前对于石斑鱼虹彩病毒病的防控, 早期检测和诊断 SGIV 是预防该病暴发和流行的关键环节。

目前已经报道的针对 SGIV 的检测方法, 包括传统的病原检测方法, 如电镜观察法<sup>[3]</sup>和细胞培养分离法<sup>[4]</sup>, 及基于抗原抗体反应的免疫学检测方法, 例如组织病理的免疫组化分析<sup>[5]</sup>和流式细胞检测技术<sup>[6]</sup>。相比于核酸等分子生物学的检测方法, 传统的病原学和免疫学检测方法存在设备要求高、耗时长和需要专业的技术人员等缺点。例如, 电镜观察法尽管可以直观地呈现病原的形态, 但是完成检测的时间需要一周以上, 不仅需要专业的人员完成超薄切片的制样, 并且需要在昂贵的电子显微镜下完成样品的观察。随着分子生物学技术的发展, 研究人员开发出新型的核酸检测方法: 如 LAMP<sup>[7]</sup>和基于核酸适配体的检测方法<sup>[8-9]</sup>。与传统的病原学和免疫学检测方法相比,

新型核酸检测方法在一定程度上克服了检测中设备需求高的缺点, 部分检测方法也实现了检测结果可视化, 但仍然存在检测耗时长, 操作繁琐和灵敏度低等缺点。为有效地完成 SGIV 的早期检测和临床样品中的快速诊断, 需要开发特异性强、方便快捷、灵敏度高的检测方法。

作为一种新型的等温核酸扩增技术, RPA 技术不受仪器设备和检测场地的限制, 具有操作简单、灵敏度高和特异性强及检测时间短等诸多优点, 被认为是一种可替代 PCR 的核酸扩增技术。近年来, 开发了针对 10 多种水生动物病毒性病原的 RPA 及其衍生的检测技术<sup>[17-24]</sup>, 尤其是 RPA-LFD 技术方法具有检测时间短及结果可视化等优点, 凸显了在养殖现场样品的即时检测的应用前景。

本研究针对 SGIV 特异基因 ORF014L 序列设计特异性引物及探针, 优化 RPA、RPA-LFD 的反应条件, 评估两种方法的特异性和灵敏性, 并对 RPA-LFD 的临床样品适用性进行评估。Mao 等<sup>[8]</sup>针对 SGIV ORF014L 开发了 LAMP 检测方法, 该方法可以在 65 °C 的普通水浴锅中扩增 20 min 即可完成 LAMP 反应。相较于普通的 RPA, LAMP 检测方法反应温度比较高。Liu 等<sup>[10]</sup>在筛选获得特异性识别 SGIV 感染细胞的核酸适配体 (Q2 和 Q3) 的基础上, 开发了一种检测 SGIV 的核酸适配体侧流层析检测方法。相比较普通 PCR, 该方法不需要特殊设备, 操作简便, 整个检测过程不超过 90 min。尽管靶标 SGIV ORF014L 的 LAMP 检测方法或靶标感染细胞的核酸适配体侧流层析



测均可实现结果可视化, 但与结果同样可视化的 RPA-LFD 方法相比, RPA-LFD 具有检测时间短 (10 min 内可完成检测) 及操作便捷 (反应温度比较低) 等优点。RPA-LFD 快速检测锦鲤疱疹病毒的方法也仅需 5 min 便可将结果通过试纸条可视化呈现<sup>[30]</sup>。而 RPA 与 LFD 相结合, 可以在 36 °C 下 20 min 内对金鱼中的 CyHV-2 进行灵敏诊断<sup>[19]</sup>。

利用 LAMP 方法检测 SGIV, 肉眼观察反应产物白色浑浊物的最低检测下限为  $6.3 \times 10^2$  个/ $\mu\text{L}$  标准质粒, 而观察反应溶液颜色的最低检测下限为 6.3 个/ $\mu\text{L}$  标准质粒<sup>[8]</sup>。RPA-LFD 方法检测锦鲤疱疹病毒的下限为每个反应  $10^2$  个基因拷贝<sup>[19]</sup>。在临床样品检测应用中, 靶标 SGIV ORF014L 的 RPA-LFD 方法与常规 PCR 法检出的结果一致, 准确率较高。Li 等<sup>[9]</sup> 利用核酸适配体免疫吸附测定 (apt-ELISA) 方法检测临床样品中 SGIV 的感染情况, 尽管 apt-ELISA 检测的结果与 PCR 检测结果有很好的-一致性, 但 apt-ELISA 检测的灵敏度稍低。如在鱼体脾脏中 PCR 方法阳性检出率为 33.3%(10/30), 而同样组织中 apt-ELISA 方法阳性检出率为 26.7%(8/30)。

目前 RPA 技术仍存在一些缺点与不足: 普通 RPA 扩增后需要纯化后才能通过琼脂糖电泳凝胶验证, 较为耗时, 可采用加入苯酚/氯仿 (体积比 1 : 1) 纯化法减少纯化时间。RPA 引物和 RPA-LFD 探针的设计对实验至关重要, 专门的设计软件较少且未制定统一的设计标准, 需要自行筛选与判定。此外, RPA 反应中引物二聚体的出现会影响 RPA 扩增的结果<sup>[31]</sup>, 可使用避免引物二聚体的自回避分子识别系统进行优化<sup>[32]</sup>; RPA-LFD 法中若形成引物-探针复合物可能导致结果出现假阳性<sup>[33]</sup>, 通过控制引物和探针之间的连续配对碱基少于 3 个能有效地降低形成引物-探针复合物的可能性<sup>[34]</sup>; RPA-LFD 法扩增过程中, 易发生气溶胶污染, 需要及时关闭反应管、减少开盖次数或进行实验分区以降低污染风险。综上, 虽然 RPA 存在一些不足, 但 RPA 相较传统病原检测方法、基于免疫学或核酸的检测法, 能大大缩短检测时间, 无需特殊设备且操作简单、特异性强和灵敏度较高, 适用于临床样品的现场快速检测。

综上, 本研究以 SGIV 的特异基因 ORF014L 为检测靶标基因, 建立了 RPA 和 RPA-LFD 快速检测方法。RPA-LFD 方法具有反应时间短、灵敏度高、快捷简单、结果可视化等特点。此外,

RPA-LFD 反应不需要特殊的仪器设备, 也无需专业的操作技术, 适合实验条件有限的基层或养殖现场的临床样品中 SGIV 地检测。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Qin Q W, Chang S F, Ngoh-Lim G H, *et al.* Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 53(1): 1-9.
- [2] Chinchar V G, Waltzek T B, Subramaniam K. Ranaviruses and other members of the family *Iridoviridae*: their place in the virosphere[J]. *Virology*, 2017, 511: 259-271.
- [3] Qin Q W, Lam T J, Sin Y M, *et al.* Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, 98(1): 17-24.
- [4] Qin Q W, Wu T H, Jia T L, *et al.* Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 131(1): 58-64.
- [5] Huang C H, Zhang X B, Gin K Y H, *et al.* In situ hybridization of a marine fish virus, Singapore grouper iridovirus with a nucleic acid probe of major capsid protein[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 117(2): 123-128.
- [6] Qin Q W, Gin K Y H, Lee L Y, *et al.* Development of a flow cytometry based method for rapid and sensitive detection of a novel marine fish iridovirus in cell culture[J]. *Journal of Virological Methods*, 2005, 125(1): 49-54.
- [7] Liu W T, Zhu L, Qin Q W, *et al.* Microfluidic device as a new platform for immunofluorescent detection of viruses[J]. *Lab on a Chip*, 2005, 5(11): 1327-1330.
- [8] Mao X L, Zhou S, Xu D, *et al.* Rapid and sensitive detection of Singapore grouper iridovirus by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(2): 389-397.
- [9] Li P, Zhou L, Wei J, *et al.* Development and characterization of aptamer-based enzyme-linked apta-sorbent assay for the detection of Singapore grouper iridovirus infection[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 634-643.
- [10] Liu J X, Zhang X Y, Zheng J Y, *et al.* A lateral flow biosensor for rapid detection of Singapore grouper

- iridovirus (SGIV)[J]. *Aquaculture*, 2021, 541: 736756.
- [11] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, *et al.* DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(7): e204.
- [12] 郭正洋, 刘钟栋, 刘小青, 等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展 [J]. 食品科技, 2018, 43(9): 55-59.
- Guo Z Y, Liu Z D, Liu X Q, *et al.* Research progress of recombinase polymerase amplification[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(9): 55-59 (in Chinese).
- [13] 兰海鸥, 柯义强, 马咸莹, 等. 重组酶聚合酶等温扩增技术在食品安全检测领域的应用 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(14): 233-238.
- Lan H O, Ke Y Q, Ma X Y, *et al.* Application of recombinase-polymerase mediated isothermal amplification in food safety analysis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(14): 233-238 (in Chinese).
- [14] Daher R K, Stewart G, Boissinot M, *et al.* Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications[J]. *Clinical Chemistry*, 2016, 62(7): 947-958.
- [15] Fu R X, Du W L, Jin X Y, *et al.* Microfluidic biosensor for rapid nucleic acid quantitation based on hyperspectral interferometric amplicon-complex analysis[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(11): 4057-4066.
- [16] Jin X Y, Fu R X, Du W L, *et al.* Rapid, highly sensitive, and label-free pathogen assay system using a solid-phase self-interference recombinase polymerase amplification chip and hyperspectral interferometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(6): 2926-2933.
- [17] Wang Y H, Wang Q, Bergmann S M, *et al.* Development and comparative evaluation of real-time PCR and real-time RPA assays for detection of tilapia lake virus[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2021, 60: 101776.
- [18] Tamer C, Benkaroun J, Kurucay H N, *et al.* Development of a recombinase polymerase amplification assay for viral haemorrhagic septicemia virus[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2022, 45(8): 1065-1071.
- [19] Preena P G, Kumar T V A, Johny T K, *et al.* Quick hassle-free detection of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in goldfish using recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick (RPA-LFD) assay[J]. *Aquaculture International*, 2022, 30(3): 1211-1220.
- [20] Prescott M A, Reed A N, Jin L, *et al.* Rapid detection of cyprinid herpesvirus 3 in latently infected koi by recombinase polymerase amplification[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2016, 28(3): 173-180.
- [21] Cong F, Zeng F W, Wu M L, *et al.* Development of a real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of spring viremia of carp virus[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 50: 101494.
- [22] Wang Y, Chen Y K, Tang Y X, *et al.* A recombinase polymerase amplification and *Pyrococcus furiosus* Argonaute combined method for ultra-sensitive detection of white spot syndrome virus in shrimp[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2023, 46(12): 1357-1365.
- [23] Wang H, Zhou S T, Wen J X, *et al.* A real-time reverse-transcription isothermal recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of genotype III grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 277: 113802.
- [24] Soliman H, El-Matbouli M. Rapid detection and differentiation of carp oedema virus and cyprinid herpes virus-3 in koi and common carp[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(5): 761-772.
- [25] Song W J, Qin Q W, Qiu J, *et al.* Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(22): 12576-12590.
- [26] Zhao Z N, Huang Y H, Liu C C, *et al.* Near-atomic architecture of Singapore grouper iridovirus and implications for giant virus assembly[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2050.
- [27] Ou-Yang Z L, Wang P R, Huang X H, *et al.* Immunogenicity and protective effects of inactivated Singapore grouper iridovirus (SGIV) vaccines in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 38(2): 254-261.
- [28] Wang Y X, Xu S F, Han C Z, *et al.* Modulatory effects of curcumin on Singapore grouper iridovirus infection-associated apoptosis and autophagy *in vitro*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 131: 84-94.
- [29] 刘泽天, 张馨, 黄晓红, 等. 石斑鱼虹彩病毒病发生风险评估模型的建立和验证 [J]. 水产学报, 2022, 46(1): 85-94.
- Liu Z T, Zhang X, Huang X H, *et al.* Mechanism of oligochitosan improving non-specific immunity of *Epinephelus fuscoguttatus*(♀)×*E. lanceolatus*(♂)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(1): 85-94 (in Chinese).
- [30] 楚馨, 冯梓钊, 姜有声, 等. 重组酶聚合酶扩增技术结合侧向流动试纸条快速检测锦鲤疱疹病毒 [J]. 水生生物学报, 2023, 47(6): 866-873.
- Chu X, Feng Z Z, Jiang Y S, *et al.* Rapid visual detection of KHV by recombinase polymerase amplification (RPA) combined with a lateral flow dipstick (LFD)[J].

- Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, 47(6): 866-873 (in Chinese).
- [31] Wang L, Zhao P P, Si X X, *et al.* Rapid and specific detection of *Listeria monocytogenes* with an isothermal amplification and lateral flow strip combined method that eliminates false-positive signals from primers[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 2959.
- [32] Sharma N, Hoshika S, Hutter D, *et al.* Recombinase-based isothermal amplification of nucleic acids with self-avoiding molecular recognition systems (SAMRS)[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(15): 2268-2274.
- [33] Wu H H, Zhao P P, Yang X H, *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]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1015.
- [34] Dong Y, Zhao P P, Chen L, *et al.* Fast, simple and highly specific molecular detection of *Vibrio alginolyticus* pathogenic strains using a visualized isothermal amplification method[J]. *BMC Veterinary Research*, 2020, 16(1): 76.

## Rapid detection of Singapore grouper iridovirus by a recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick

PAN Ying<sup>1</sup>, YANG Jiahui<sup>1</sup>, PENG Fayong<sup>1</sup>, HUANG Youhua<sup>1</sup>,  
QIN Qiwei<sup>1,2</sup>, HUANG Xiaohong<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Nansha-South China Agricultural University Fishery Research Institute Guangdong, Guangzhou 511464, China)

**Abstract:** Singapore grouper iridovirus (SGIV), a novel species of *Ranavirus*, caused more than 90% mortality in larval and juvenile groupers. Up to now, there is still a lack of effective prevention and control strategies for SGIV. Therefore, it is essential to develop convenient diagnostic methods for field detection of SGIV without special equipment. In this study, to establish a rapid, sensitive and visualized method for the detection of SGIV in clinical samples, specific primers and probes were designed by targeting the SGIV ORF014L, and a recombinase polymerase amplification (RPA) technique combined with lateral flow dipstick (LFD) (RPA-LFD) was developed for the detection of SGIV. The results showed that the RPA reaction specifically detected target fragment of SGIV within 20 min at 40.1 °C with the lowest detection limit of 10<sup>2</sup> copies/μL. The RPA-LFD reaction at a constant temperature of 42 °C for 8 min was able to visualize the results on the test strips with the lowest detection limit of 10<sup>1</sup> copies/μL, and showed no cross-reaction with other common aquatic pathogens. The coincidence rate of positive test of clinical samples was consistent between RPA-LFD and PCR methods. Both RPA and RPA-LFD could specifically detect SGIV with lower limit than conventional PCR assay. Taken together, RPA-LFD assay developed in the present study provides a convenient, specific, sensitive and visualized method for on-site rapid detection of SGIV without special equipment.

**Key words:** Singapore grouper iridovirus; ORF014L gene; recombinase polymerase amplification; lateral flow dipstick; visualization

**Corresponding author:** HUANG Xiaohong. E-mail: [huangxh@scau.edu.cn](mailto:huangxh@scau.edu.cn)

**Funding projects:** National Key Research and Development Program of China (2023YFD2401703); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47-G16); National Natural Science Foundation of China (U20A20102)