

呼吸道合胞病毒A型即时检测体系：一管式重组酶聚合酶扩增联合CRISPR/Cas12a检测及两种即时读取方案

余婕¹, 杨瑞¹, 唐田¹, 李蕊丹², 罗俊容², 田绿波³, 郝玉通⁴, 文海燕^{4*}, 汪川^{1,3*}

¹四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院卫生检验与检疫学系, 四川成都 610041; ²成都市疾病预防控制中心/成都市卫生监督所, 四川成都 610041; ³口岸疫病疫情监测四川省重点实验室/四川国际旅行卫生保健中心/成都海关口岸门诊部, 四川成都 610041; ⁴重庆国际旅行卫生保健中心/重庆海关口岸门诊部, 重庆 401147

[中图分类号] R373.1 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1508.2026.0407

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 余婕, 杨瑞, 唐田, 等. 呼吸道合胞病毒A型即时检测体系: 一管式重组酶聚合酶扩增联合CRISPR/Cas12a检测及两种即时读取方案[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(6): 875-883.

[收稿日期] 2025-07-24

[录用日期] 2026-01-06

[上线日期] 2026-04-07

[摘要] **目的** 构建基于一管式重组酶聚合酶扩增(RPA)联合CRISPR/Cas12a检测及两种读取方案的呼吸道合胞病毒(RSV)A型即时检测体系, 并评价其检测性能及临床应用潜力。**方法** 针对RSV-A型编码M蛋白的保守基因序列, 设计合成引物、CRISPR/Cas12a蛋白识别向导RNA(crRNA)及探针, 构建并优化一管式RPA-CRISPR/Cas12a检测体系; 分别利用实时荧光PCR仪或侧向层析试纸条实现检测信号即时读取, 开发一管式RPA-CRISPR/Cas12a荧光即时检测和一管式RPA-CRISPR/Cas12a试纸条即时检测体系; 以质粒及假病毒为模板, 分析两种即时检测体系的灵敏度及特异性; 检测39例含RSV-A型或其他3种发热呼吸道症候群病毒的真实样本, 评价即时检测体系与金标准RT-qPCR检测结果的Kappa一致性。**结果** 一管式RPA-CRISPR/Cas12a荧光即时检测可在37℃恒温条件下, 30 min检出 6.1×10^1 拷贝/ μ l的假病毒; 一管式RPA-CRISPR/Cas12a试纸条即时检测可在相同条件下35 min检测到低至 6.1×10^1 拷贝/ μ l的假病毒; 两种检测体系与其他3种发热呼吸道症候群病毒均无交叉反应。真实样本检测结果显示, 两种检测体系的特异度均为100.0%(15/15), 敏感度分别为95.8%(23/24)、91.7%(22/24); 与RT-qPCR Kappa一致性检验结果分别为94.7%、89.4%。**结论** 建立的RSV-A型即时检测体系敏感度和特异度较高, 可作为RSV-A型感染临床诊断和流行病学监测的有效工具。

[关键词] 呼吸道合胞病毒A型; 重组酶聚合酶扩增; CRISPR-Cas12a系统; 侧向层析试纸条

A point-of-care testing system for respiratory syncytial virus subtype A: one-tube recombinase polymerase amplification combined with CRISPR/Cas12a and two immediate readout modes

Yu Jie¹, Yang Rui¹, Tang Tian¹, Li Rui-Dan², Luo Jun-Rong², Tian Lv-Bo³, Hao Yu-Tong⁴, Wen Hai-Yan^{4*}, Wang Chuan^{1,3*}

¹West China School of Public Health/Department of Public Health Laboratory Sciences, West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

²Chengdu Center for Disease Control and Prevention/Chengdu Institute of Health Supervision, Chengdu, Sichuan 610041, China

³Port Epidemic Disease Monitor Key Laboratory of Sichuan Province/Sichuan International Travel Health Care Center/Chengdu Customs Port Outpatient Department, Chengdu, Sichuan 610041, China

⁴Chongqing International Travel Healthcare Center/Chongqing Customs Port Outpatient Department, Chongqing 401147, China

*Corresponding author. Wang Chuan, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn; Wen Hai-Yan, E-mail: Wenhaiyan2001@163.com

This work was supported by the Scientific Research Projects of the General Administration of Customs (2024HK263), and the Major Application Demonstration Project of Chengdu Science and Technology Bureau (2022-YF09-00011-SN)

[Abstract] **Objective** To establish a point-of-care testing system for respiratory syncytial virus subtype A (RSV-A) based on

[基金项目] 海关总署科研项目(2024HK263); 成都市科技局重大应用示范项目(2022-YF09-00011-SN)

[作者简介] 余婕, 硕士研究生, 主要从事疾病防控实验技术开发研究

[通信作者] 汪川, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn; 文海燕, E-mail: Wenhaiyan2001@163.com

one-tube recombinase polymerase amplification combined with CRISPR/Cas12a, and to evaluate its detection performance and potential for clinical application. **Methods** Primers, CRISPR/Cas12a guide RNA (crRNA), and probes were designed and synthesized targeting the conserved gene sequence encoding the M protein of RSV-A. A one-tube RPA-CRISPR/Cas12a detection platform was established and optimized. Two instant readout schemes were developed with real-time fluorescence PCR instrument reading or lateral flow dipstick reading: one-tube RPA-CRISPR/Cas12a fluorescence point-of-care testing, and one-tube RPA-CRISPR/Cas12a lateral flow dipstick point-of-care testing. The sensitivity and specificity of both schemes were analyzed using plasmid and pseudovirus templates. A total of 39 clinical samples containing RSV-A or 3 other febrile respiratory syndrome viruses were tested to assess the Kappa consistency between the established point-of-care testing system and the gold standard RT-qPCR. **Results** The one-tube RPA-CRISPR/Cas12a fluorescence point-of-care testing detected as low as 6.1×10^{-1} copies/ μl of pseudoviruses within 30 min at a constant temperature of 37 °C, and the one-tube RPA-CRISPR/Cas12a lateral flow dipstick point-of-care testing achieved a detection limit of 6.1×10^1 copies/ μl in 35 min under the same conditions. No cross-reactivity was observed with the other three febrile respiratory syndrome viruses for both schemes. In clinical sample testing, both schemes exhibited 100.0% specificity (15/15), with sensitivities of 95.8% (23/24) and 91.7% (22/24), respectively. The Kappa agreement with RT-qPCR was 94.7% and 89.4%, respectively. **Conclusion** The established RSV-A point-of-care testing system demonstrates high sensitivity and specificity, and can serve as an effective tool for the clinical diagnosis and epidemiological surveillance of RSV-A infection.

[Key words] respiratory syncytial virus subtype A; recombinase polymerase amplification; CRISPR/Cas12a system; lateral flow dipstick

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是全球下呼吸道感染的主要病原之一, <5岁儿童及>60岁老年人是其易感人群^[1-3]。中国的RSV感染发病率较高, <5岁儿童RSV感染病例占全球10%以上^[4-5]。据报道,我国婴幼儿及学龄前儿童RSV-A型感染率高于RSV-B型,且RSV-A型被认为与更严重的疾病相关^[5-6]。近年来,全球相继批准3种RSV疫苗上市^[7-8],但由于上市时间短、临床证据尚不充分等原因,RSV疫苗接种率仍然偏低^[9-10]。在当前我国尚未建立RSV群体免疫的背景下,开展RSV感染的快速精准检测对于实现疾病的早期干预和疾病流行控制具有重要意义。

近年来,呼吸道病毒的现场即时检测(point-of-care testing, POCT)受到广泛关注。基于实时荧光定量反转录聚合酶链式反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR)的方法是病毒检测的“金标准”,但该方法需要昂贵的实验室设备和专业的技术人员,限制了其在资源匮乏地区的可及性^[11]。规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein system, CRISPR/Cas)是细菌抵御外源入侵的适应性免疫系统^[12]。其中,CRISPR/Cas12a系统因具有反式切割活性,可切割单链探针释放信号,成为POCT的新工具^[13]。重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)是一种高灵敏的等温扩增技术,其反应温度要求与CRISPR/Cas12a系统切割温度一致,二者协同联用可在信号放大的同时限制RPA非特异性扩增所致的假阳性,实现靶基因在恒温条件下的特异检测^[14-16]。目前,基于RPA-

CRISPR/Cas12a的核酸检测体系多采用两管式检测体系,步骤繁琐,易产生气溶胶污染^[17-18]。因此,本研究基于构建一管式RPA-CRISPR/Cas12a检测体系,通过实时荧光PCR仪或侧向层析试纸条(lateral flow assays, LFA)即时读取信号,以实现靶向RSV-A型M蛋白编码基因的快速检测。

1 资料与方法

1.1 样本和假病毒 随机选取来源于成都市疾病预防控制中心的39例阳性咽拭子样本,包括24例RSV-A型(Ct值 ≤ 37),5例人新型冠状病毒(Ct值 ≤ 40),5例人甲型H1N1流感病毒(Ct值 ≤ 37),5例人乙型维多利亚系流感病毒(Ct值 ≤ 37)样本。以上样本均在纳入本研究前通过RT-qPCR检测,且报告Ct值满足阳性样本判断标准。RSV-A型RNA标准物质(NIM-RM4057)、新型冠状病毒全序列假病毒(GBW09300)、灭活甲型H1N1流感病毒(NIM-RM4054)及乙型维多利亚系流感病毒(NIM-RM4056)均购自河南万佳标准物质研发中心,以上假病毒均以数字PCR测定的RNA拷贝数浓度作为标准值。

1.2 试剂耗材及仪器设备

1.2.1 试剂耗材 DNA快速提取液购自美国LGC Biosearch Technologies公司;重组酶聚合酶扩增试剂盒TwistAmp® Basic kit购自英国TwistDx™公司;SuperScript™ IV反转录酶、DEPC处理水购自美国赛默飞世尔科技公司;RNase H酶、EnGen® Lba Cas12a (Cpf1)核酸酶、NEBuffer™ r2.1(10×)购自美国New England Biolabs公司;6×SuperStain上样缓冲液购自北京康为世纪生物科技有限公司;250 bp DNA样条带购自北京擎科生物科技股份有限公司;核酸检测

试纸条(适用CRISPR SHERLOCK)购自深圳易致生物科技有限公司; RSV-A型核酸检测试剂盒(荧光PCR法)、新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒(荧光PCR法)、甲型/乙型流感病毒核酸检测试剂盒(荧光PCR法)均购自江苏硕世生物科技有限公司。RSV标准质粒、RPA引物、ssDNA探针及CRISPR/Cas12a蛋白识别向导RNA(crRNA)均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2.2 仪器设备 生物安全柜购自青岛海尔生物医疗股份有限公司; 干式恒温器购自杭州奥盛仪器有限公司; 核酸电泳仪购自上海天能科技有限公司; qPCR仪及凝胶成像分析仪购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 检测原理

1.3.1 一管式RPA-CRISPR/Cas12a荧光即时检测体系 样本在免提取核酸释放剂作用下95℃孵育5 min, 释放病毒RNA; 在反转录酶、RNase H酶及特异性引物作用下, 病毒RNA反转录生成单链cDNA, 随后在DNA聚合酶作用下生成双链DNA; 在37℃下, 引物与重组酶结合形成DNA-蛋白复合物, DNA-蛋白复合物识别病毒cDNA同源序列, 启动链置换反应, 被置换的DNA单链与单链结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein, SSB)结合, 防止其被进一步替换。随后引物与重组酶解离, 并与聚合酶结合, 引物从模板DNA 3'端开始延伸, 通过反复循环实现指数扩增, 产生大量RPA扩增产物; 通过瞬时离心, 将离心管管盖内侧的CRISPR/Cas12a体系离心至管底并与RPA扩增产物混合, CRISPR/Cas12a蛋白识别向导RNA(CRISPR-derived RNA, crRNA)形成CRISPR/Cas12a-crRNA复合物; 该复合物中的crRNA通过识别配对RPA扩增产物上的原间隔区邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)序列, 触发Cas12a蛋白构象变化, 从而激活其反式切割活性; Cas12a蛋白非特异性地切割其周围的单链DNA荧光探针, 使探针上的荧光基团发出可被检测的绿色荧光; 采用qPCR仪实时检测荧光信号强度, 可判断样本中有无目的病原体(附图1A-C)。

1.3.2 一管式RPA-CRISPR/Cas12a试纸条即时检测体系 反转录RPA扩增及CRISPR/Cas12a切割原理与荧光即时检测体系一致, LFA检测原理见附图1D。反应产物在毛细作用下迁移到偶联垫处, 单链DNA与胶体金标记的抗荧光素(FAM)单抗结合; 结合后的ssDNA-胶体金标记-抗复合物继续迁移至反应膜上。如果单链DNA未被切割, 则复合物通过单链DNA携带的生物素与质控线处包被的亲合素结合, 质控线出现条带; 若单链DNA被Cas12a酶切割, 则无生物素的单链DNA不能被质控线上的亲合素捕获, 但可

通过抗FAM单抗与固定在检测线处的羊抗鼠二抗结合, 检测线出现条带。

1.4 一管式RPA-CRISPR/Cas12a检测体系的建立

1.4.1 靶基因选择及标准质粒设计 以RSV-A型的M蛋白基因序列作为靶基因, 利用在线数据库美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库查询并下载14株不同时间、不同地区报道的A型RSV分离株的M蛋白基因序列, 使用DNAMAN软件进行多序列比对, 选择高度保守的区域设计标准质粒。RSV-A型的M蛋白基因质粒(NC_038235.1)的保守序列为: 5'-CTACGTGAACAAGCTTCACGAAGGCTCCACATACACAGCTGCTGTTCAATACAATGTCTTAGAAAAA GACGATGACCCTGCATCACTTACAATATGGGTGCCATGTTCCAATCATCTATGCCAGCAGATTTACTTATAAAAGAACTAGCTAATGTCAACATACTAGTGA AACAAATATCCACACCCAAGGGACCTTCACTAAGAGTCATGATAAACTCAAGAAGTGCAGTGCTAGCAC AAATGCCCAGCAAATTTACCATATGCGCTAATGTGTCTTGGATGAAAAGCAAAGTGCAGTATGAT GTAACCACACCCTGTGAAATCAAGGCATGTAGTCTAACATGCCTAAAATCAAAAAATATGTTGACTACAGTTAAAGATCTCACTATGAAGACACTCAACCCTACACATGATATTATTGCTTTATGTGAATTTGAAAAC ATAGTAACATCAAAAAAGTCATAATACCAACATACCTAAGATCCATCAGTGTC-3'。

1.4.2 RPA引物、crRNA及探针设计 根据RPA引物设计原则, 使用引物设计软件Primer Premier 5设计3对RPA正反向候选引物, 利用NCBI的序列比对搜索工具BLAST验证引物的特异性; 根据引物筛选结果, 以RPA最适引物所得扩增产物序列作为模板, 按照crRNA设计原则, 在CHOPCHOP网站设计crRNA; 以5'和3'端分别修饰有荧光基团FAM和淬灭基团BHQ1的单链DNA作为荧光即时检测体系探针; 以5'和3'端分别修饰有荧光基团FAM和亲和素Biotin的单链DNA作为试纸条即时检测体系探针(附表1)。

1.4.3 RPA引物筛选及检测的灵敏度初探 将3对RPA候选引物分别按RPA Basic kit试剂盒说明书进行操作, 以筛选出RPA最佳引物组。将RPA冻干粉用29.5 μl复水缓冲液溶解, 加入正反向引物各2.4 μl (10 μmol/L), DEPC处理水10.7 μl, 混匀后均分为两管; 向其中一管加入标准质粒1.25 μl, MgOAc 1.25 μl作为阳性对照组, 剩余一管加入DEPC处理水1.25 μl, MgOAc 1.25 μl作为阴性对照组, 充分混匀后置于干式恒温器, 在39℃条件下孵育20 min进行RPA扩增。扩增完成后, 加入等体积苯酚/氯仿(1:1)提取液进行纯化。随后12 000 r/min离心5 min, 吸取

5 μl 上清液, 加入 1 μl 的 6 $\times$ SuperStain 上样缓冲液, 混合均匀后加在 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上样孔中, 100 V 恒压电泳 35 min, 凝胶成像分析仪采集图像, 观察目标位置是否出现条带。

选择最优引物, 以梯度浓度的 RSV-A 型标准质粒 ($2.8 \times 10^{-1} \sim 2.8 \times 10^5$ 拷贝/ μl) 为模板, 依据 RPA 引物筛选条件扩增模板, 初步探究 RPA 检测灵敏度。

1.4.4 一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 反应体系及其流程 RPA-CRISPR/Cas12a 反应体系由在管底部 25 μl 的 RPA 扩增体系和在管盖内侧 10 μl 的 CRISPR/Cas12a 切割体系组成。RPA 扩增体系包括 RPA 冻干粉, 14.75 μl 复水缓冲液, 1 μl 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μl 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 1.25 μl 标准质粒, 1.25 μl MgOAc 及 5.75 μl DEPC 处理水; CRISPR/Cas12a 切割体系包括 3.5 μl 10 $\times$ NEBufferTM r2.1, 3.5 μl 1 $\mu\text{mol/L}$ EnGen[®] Lba Cas12a (Cpf1), 0.35 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ crRNA, 1.05 μl ssDNA (10 $\mu\text{mol/L}$) 及 1.6 μl DEPC 处理水。以假病毒或真实样本替代标准质粒时, 需在扩增体系中添加 0.24 μl 200 U/ μl SuperScriptTM IV 反转录酶, 0.48 μl 5 U/ μl RNase H, DEPC 处理水补齐至 25 μl 。

加入标准质粒的反应管在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min (假病毒或真实样本反应 15 min), 完成 RPA 扩增。之后通过瞬时离心将管盖内侧的 CRISPR/Cas12a 切割体系离心至管底并与 RPA 扩增产物充分混合, 完成探针切割。

1.5 两种信号即时读取模式的开发

1.5.1 信号读取流程 荧光即时检测体系在 RPA 反应结束后将反应管直接置于 qPCR 仪上 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 每隔 30 s 采集一次荧光信号; 试纸条即时检测体系在 CRISPR/Cas12a 切割 10 min 后, 加入 25 μl DEPC 处理水稀释混匀, 随后插入侧向层析试纸条, 常温放置 5 min 后取出平放于桌面, 判读结果。

1.5.2 检测结果判读方法 (1) 荧光即时检测体系。基于正态分布的 3σ 原则判定实验结果, 若样本荧光信号值高于阴性对照平均值 + 3 倍标准差, 则结果判定为阳性, 反之为阴性。(2) 试纸条即时检测体系。依据产品说明判定实验结果, 若质控线有条带, 检测线无条带, 表明样本中不含待测目标病原体核酸或其含量低于试纸条检出限, 结果为阴性; 若检测线有条带, 质控线无或者有条带, 表明样本中含有目标病原体核酸, 结果为阳性; 若质控线和检测线均无条带, 此结果表明试纸条失效, 损坏或操作有误, 若出现该情况, 则应重新测试。

1.6 一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系反应条件优化 以浓度 2.8×10^4 拷贝/ μl 的标准质粒为模板, 按照控制单一变量的原则, 分别改变反应温度 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、39 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$)、引物浓度 (240、320、400、480 nmol/L)、

Cas12a 浓度 (50、70、100、120 nmol/L)、Cas12a: crRNA 浓度比例 (2:1、1:1、1:2)、单链 DNA 浓度 (100、200、300 nmol/L) 及 RPA 反应时间 (2、4、6、8、10、12 min), 测定不同反应条件下的荧光信号强度, 从而选择最佳的反应条件组合。

1.7 即时检测体系的敏感度分析 分别以梯度浓度的 RSV-A 型标准质粒 ($2.8 \times 10^{-1} \sim 2.8 \times 10^4$ 拷贝/ μl) 和假病毒 ($6.1 \times 10^{-1} \sim 6.1 \times 10^1$ 拷贝/ μl) 为模板, 依照优化后检测体系进行反应, 分析两种检测体系的敏感度。样本检测敏感度 (%) = 真阳性样本数 / (真阳性样本数 + 假阴性样本数) $\times 100\%$ 。

1.8 即时检测体系的特异度分析 分别以 RSV-A 型假病毒及可引起相同或相似呼吸道临床症状的病原体 (甲型 H1N1 流感病毒、乙型维多利亚系流感病毒、新型冠状病毒) 的假病毒为模板, 依照优化后检测体系进行反应, 评估两种检测体系的特异度。样本检测特异度 (%) = 真阴性样本数 / (真阴性样本数 + 假阳性样本数) $\times 100\%$ 。

1.9 真实样本检测及与 RT-qPCR 法的一致性评估

收集 24 例 RSV-A 型病毒作为阳性样本, 5 例人新型冠状病毒、5 例人甲型 H1N1 流感病毒、5 例人乙型维多利亚系流感病毒共 15 例与 RSV-A 型感染症状相似的其他发热呼吸道症候群病毒作为阴性样本, 分别采用 RT-qPCR、一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 荧光即时检测体系和一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 试纸条即时检测体系进行测定; 以 RT-qPCR 检测结果为金标准, 评估本研究建立的两种即时检测体系与 RT-qPCR 检测的 Kappa 一致性。Kappa 一致性 (%) = (观察一致性 - 偶然一致性) / (1 - 偶然一致性) $\times 100\%$ 。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, GraphPad Prism 8 软件制图。计量资料均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。计数资料以例 (%) 表示, 组间比较采用配对 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 引物筛选及灵敏度初探 采用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行 RPA 扩增引物筛选。三对候选引物均成功扩增出与预期靶片段大小相符的目的条带; 候选引物 F2R2 阴性对照组未观察到明显的杂带, 而 F1R1 组和 F3R3 组出现非特异性条带, 故后续选用 F2R2 引物组进行实验。以 F2R2 作为引物扩增, 未优化条件前 RPA 灵敏度可达到 10^2 拷贝/ μl (附图 2)。

2.2 反应条件优化 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、39 $^{\circ}\text{C}$ 及 42 $^{\circ}\text{C}$ 3 个反应温度下, 荧光信号强度随着反应温度的升高而减

弱,且测试组与阴性对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),故选择 37℃为反应温度(图 1A);在 4 个 Cas12a 浓度下,荧光信号强度随着 Cas12a 浓度的增加而增强,但 100 nmol/L 和 120 nmol/L Cas12a 条件下,两组间荧光信号强度差异无统计学意义($P>0.05$),基于成本经济效益考虑,选择 100 nmol/L 作为 Cas12a 最终浓度(图 1B);CRISPR/Cas12a:crRNA 为 2:1、1:1、1:2 时,测试组与阴性对照组比较荧光信号强度差异均有统计学意义($P<0.05$),且比例为

2:1 时荧光信号强度明显高于 1:1 和 1:2,故选择 2:1 作为最终比例(图 1C);在 3 个单链 DNA 探针浓度下,荧光信号强度随着探针浓度的增高而增强,故选择 300 nmol/L 为单链 DNA 探针浓度(图 1D);在 4 个 RPA 引物浓度下,荧光信号强度在 400 nmol/L 时最高,故选其作为最终反应浓度(图 1E);当 RPA 扩增时间为 2~10 min,随着时间延长,荧光信号强度不断增强,而在 10 min 达到峰值后有所下降(图 1F),故最终选择 10 min 为 RPA 反应时间。

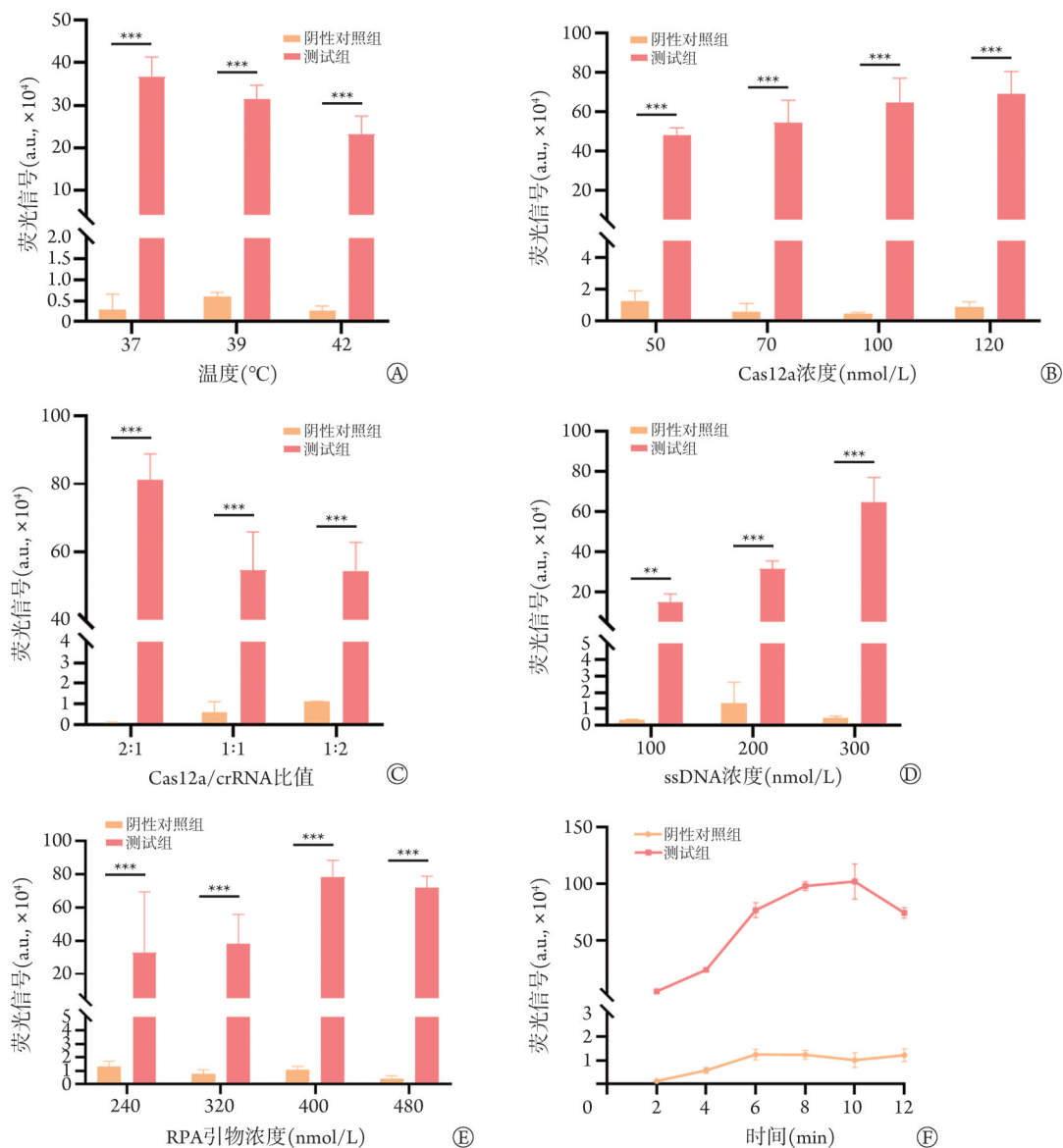


图1 一管式RPA-CRISPR/Cas12a检测体系反应条件优化

Fig.1 Optimization of reaction conditions for one-tube RPA-CRISPR/Cas12a detection system

A. 反应温度优化结果; B. Cas12a 浓度优化结果; C. Cas12a/crRNA 比值优化结果; D. ssDNA 探针浓度优化结果; E. RPA 引物浓度优化结果; F. RPA 扩增时间优化结果。测试组以 2.8×10^4 拷贝/ μ l 标准质粒为模板,阴性对照组以 DEPC 处理水代替质粒;图中纵坐标的荧光强度以任意单位(a.u.)表示,代表荧光信号的相对强度,而非绝对定量值;误差线代表 3 次重复实验的标准差。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。RPA. 重组酶聚合酶扩增; CRISPR/Cas12a. 规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白 12a; crRNA. 向导 RNA

2.3 一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 荧光即时检测体系的灵敏度与特异性分析 荧光即时检测体系灵敏度

分析结果显示,除低拷贝数的标准质粒外,不同浓度标准质粒($2.8 \times 10^{-1} \sim 2.8 \times 10^4$ 拷贝/ μ l)的检测荧光值

均在 10 min 达到平台期,以质粒为模板的灵敏度可达 2.8×10^1 拷贝/ μl (图 2A)。 6.1×10^1 拷贝/ μl 假病毒的检测荧光值可在 15 min 达到平台期,该体系以假病毒为模板的灵敏度可达 6.1×10^1 拷贝/ μl (图 2B)。

荧光即时检测体系特异性分析结果显示,检测呼吸道合胞病毒 A 型时反应终点荧光信号强烈,而检测其他发热呼吸道症候群病毒时,荧光值与阴性对照组的荧光值差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 2C)。

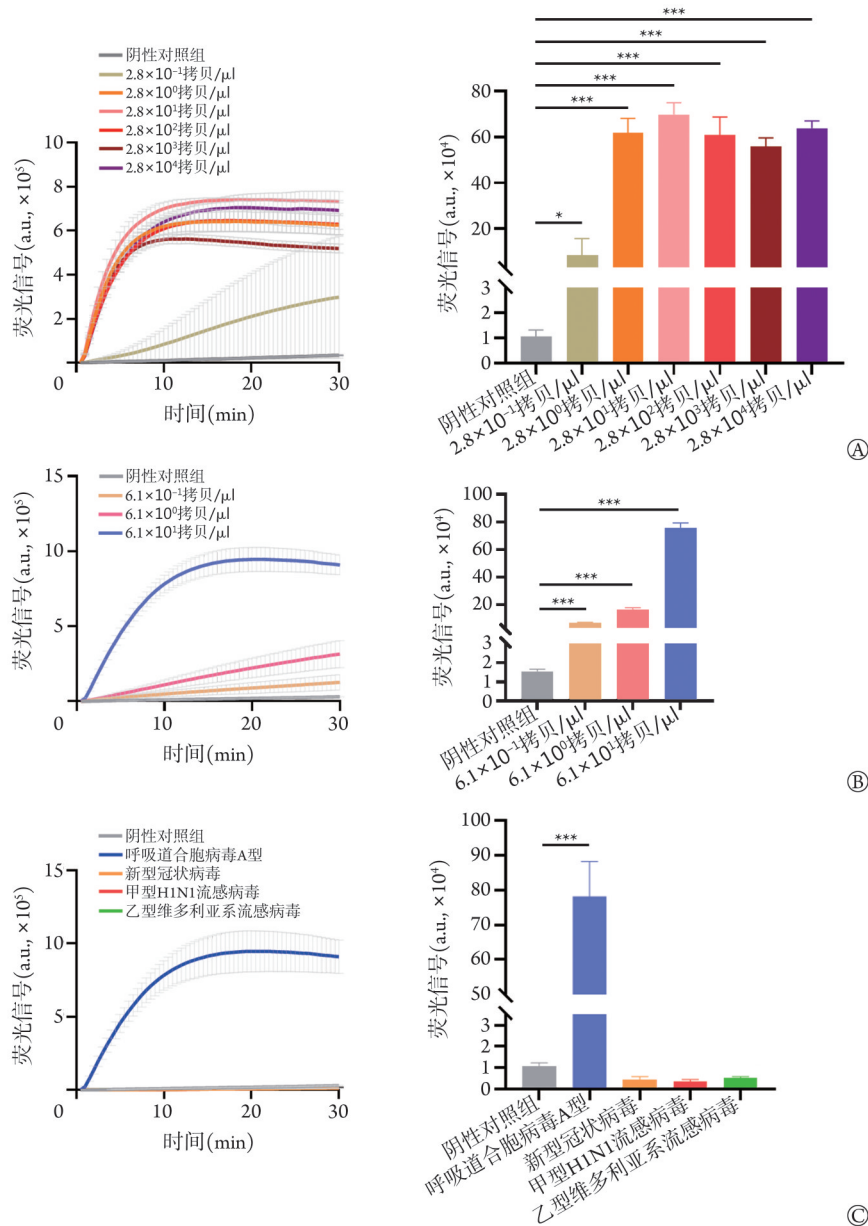


图2 一管式RPA-CRISPR/Cas12a荧光即时检测体系的灵敏度与特异性分析

Fig.2 Sensitivity and specificity analysis of RPA-CRISPR/Cas12a one-tube real-time fluorescence detection system

A. 以标准质粒为模板的灵敏度分析; B. 以假病毒为模板的灵敏度分析; C. 以多种发热呼吸道症候群假病毒为模板的特异性分析。阴性对照组以 DEPC 处理水代替质粒或假病毒; 图中纵坐标的荧光强度以任意单位(a.u.)表示, 代表荧光信号的相对强度, 而非绝对定量值; 误差线代表 3 次重复实验的标准差。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。RPA. 重组酶聚合酶扩增; CRISPR/Cas12a. 规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白 12a

2.4 一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 试纸条即时检测体系的灵敏度与特异性分析 试纸条即时检测体系敏感度分析结果显示, 该体系检测呼吸道合胞病毒以质粒为模板和以假病毒为模板的最低检出限分别为 2.8×10^1 拷贝/ μl 、 6.1×10^1 拷贝/ μl (图 3A-B)。试纸条即时检测体系特异性分析结果显示, 该体系与其他

发热呼吸道症候群病毒无交叉反应(图 3C)。

2.5 真实样本检测及与 RT-qPCR 检测的一致性 一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 荧光即时检测体系检测呼吸道合胞病毒真实样本的敏感度为 95.8%(23/24), 特异度为 100.0%(15/15), 与 RT-qPCR Kappa 一致性检验结果为 94.7%(图 4、表 1)。一管式 RPA-CRISPR/

Cas12a 试纸条即时检测体系检测呼吸道合胞病毒真实样本的灵敏度为 91.7%(22/24)，特异度为 100.0% (15/15)，与 RT-qPCR 检测的 Kappa 一致性检验结果为 89.4%(图 4、表 1)。

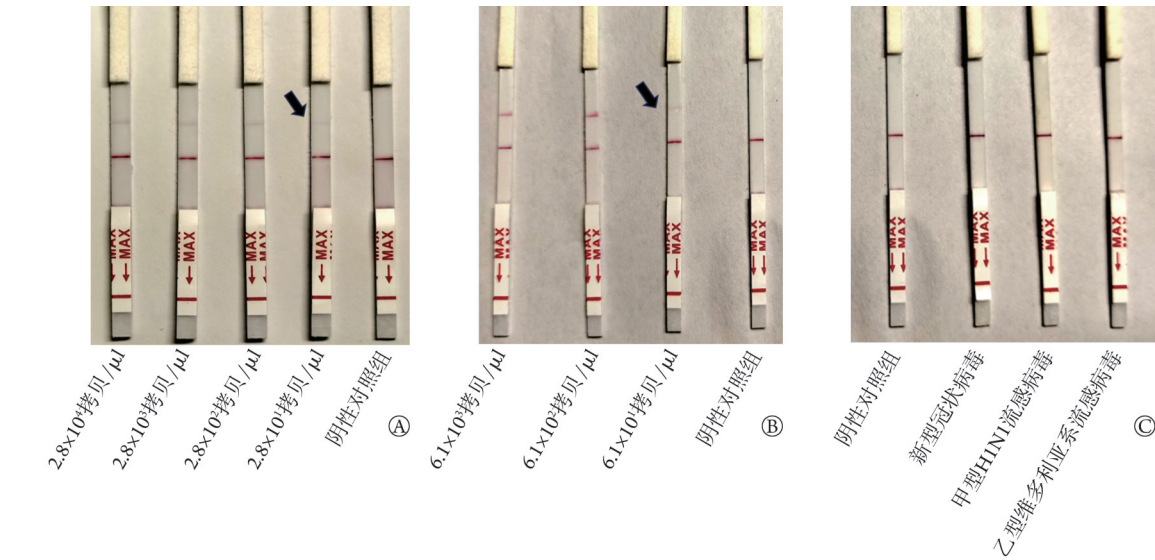


图 3 一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 试纸条即时检测体系的灵敏度与特异性分析

Fig.3 Sensitivity and specificity analysis of RPA-CRISPR/Cas12a one-tube lateral flow assay detection system
A. 以标准质粒为模板的灵敏度分析；B. 以假病毒为模板的灵敏度分析；C. 以各种发热呼吸道症候群假病毒为模板的特异性分析。测试组以不同浓度的标准质粒或假病毒为模板，阴性对照组以 DEPC 处理水代替质粒或假病毒。RPA 重组酶聚合酶扩增；CRISPR/Cas12a 规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白 12a

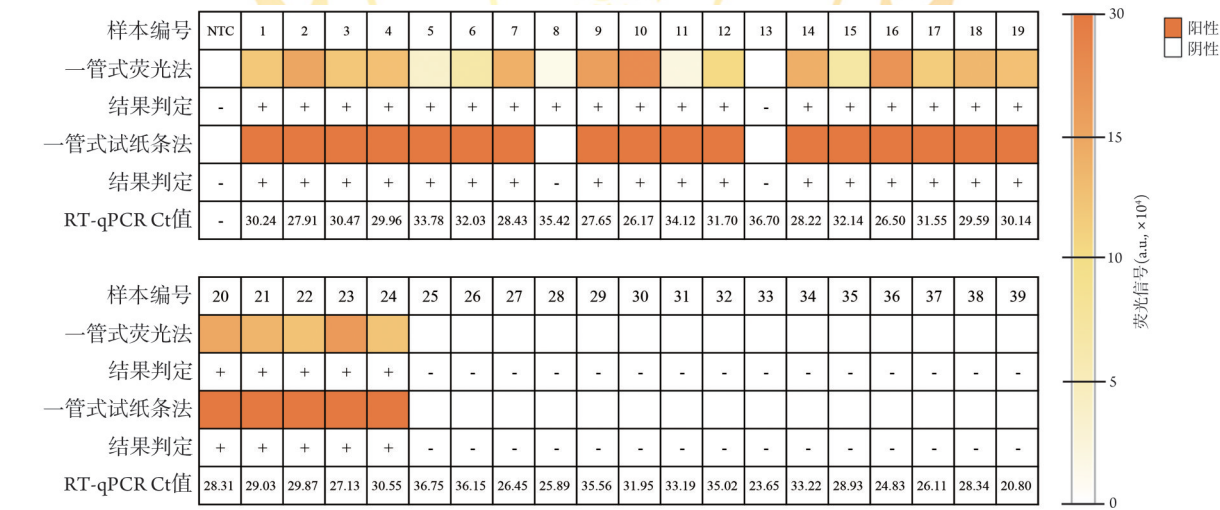


图 4 39 例临床样本 RT-qPCR、一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 荧光即时检测体系和一管式 RPA-CRISPR/Cas12a 试纸条即时检测体系检测结果

Fig.4 Detection results of 39 clinical samples by RT-qPCR, RPA-CRISPR/Cas12a one-tube real-time fluorescence detection system and RPA-CRISPR/Cas12a one-tube lateral flow assay detection system

NTC. 阴性对照；样本 1—24 为 A 型人呼吸道合胞病毒样本；样本 25—29 为人甲型 H1N1 流感病毒样本；样本 30—34 为乙型维多利亚系流感病毒样本；样本 35—39 为新型冠状病毒样本；图中纵坐标的荧光强度以任意单位(a.u.)表示，代表荧光信号的相对强度，而非绝对定量值。RPA 重组酶聚合酶扩增；CRISPR/Cas12a 规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白 12a

3 讨 论

RSV 是全球范围内婴幼儿下呼吸道感染的重要病原体，感染的发病率和病死率较高，可造成重大公共卫生负担。我国是 RSV 感染高发国家，建立快

速、准确的病原学诊断体系对于实现精准医疗、完善传染病监测防控网络具有重要的现实意义。

传统 RT-qPCR 依赖专业设备及人员，报告时间较长，难以满足重症诊疗的时效性需求、基层及资源匮乏地区的可及性需求及突发公共卫生事件的应

表1 一管式RPA-CRISPR/Cas12a荧光即时检测体系和试纸条即时检测体系的临床样本检测性能评价(例)

Tab.1 Performance evaluation of RPA-CRISPR/Cas12a one-tube real-time fluorescence detection system and lateral flow assay detection system for clinical samples (n)

检测体系	RT-qPCR		合计
	阳性	阴性	
一管式RPA-CRISPR/Cas12a 荧光即时检测体系			
阳性	23	0	23
阴性	1	15	16
合计	24	15	39
一管式RPA-CRISPR/Cas12a 试纸条即时检测体系			
阳性	22	0	22
阴性	2	15	17
合计	24	15	39

RPA. 重组酶聚合酶扩增; CRISPR/Cas12a. 规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白12a

急响应要求。因此,开发兼具较高检测性能和POCT便捷性的新型RSV检测技术极为必要。核酸检测的POCT技术主要包括核酸提取、核酸扩增和信号输出读取3个模块。在核酸提取模块,本研究采用免提取核酸释放剂提取核酸,相比于同类研究耗时20~40 min的磁珠提取法^[19-20],本法仅需5 min即可完成提取,且所得产物可直接用于下一模块。在核酸扩增模块,研究将RPA与CRISPR/Cas12a系统联用,通过整合两种技术的核心优势,实现了核酸检测效能的显著提升,与现有单独使用RPA检测RSV的报道比较^[21],本研究灵敏度提高了两个数量级。此外,与现有基于RPA-CRISPR/Cas12a的检测方法相比^[20],一管法可避免RPA扩增完成后开盖所致检测步骤繁琐、气溶胶污染风险增加等缺点,在多病原检测及微流控集成方面更具优势。在信号输出读取模块,本研究提供了可适应不同检测需求的两种检测体系。通过更换单链DNA探针上修饰基团类型,研究者可通过采集荧光信号或观察侧向层析试纸条带,5~10 min获取检测结果。如本研究结果所示,荧光即时检测体系在灵敏度方面优于试纸条即时检测体系两个数量级,但需荧光检测仪器输出信号;试纸条即时检测体系的灵敏度虽低于荧光即时检测,但无须复杂仪器即可完成检测信号可视化即时读取,在现场及家庭检测中更为便捷、可及。本研究采用RPA技术对本课题组早期建立的多重交叉置换扩增技术^[22]进行革新,成功将扩增温度从64℃降至37℃,扩增时间从55 min缩短至15 min,且摆脱了对复杂引物体系的依赖,在保持高灵敏度

的同时提高了操作便捷性。相比本课题组建立的人乙型流感病毒检测体系^[23],本研究除对结果采用荧光信号来判定外,还使用试纸条判定结果,实现更为经济、可视的信号输出,为现场检测提供了新方案。

本研究结果显示,建立的一管式RPA-CRISPR/Cas12a即时检测体系具有良好的特异性和灵敏度,可作为RSV-A型感染临床诊断和流行病学监测的有效工具。但本研究尚存在局限性,真实样本量相对不足,特异性评价涵盖的病原体种类较为单一,未进行crRNA筛选优化等。后续研究将优化crRNA设计以期进一步提高检测体系的灵敏度、一致性;持续扩大样本收集规模,纳入更加多样化的样本类型,以进一步验证该检测体系的性能。另外,本方法仅针对RSV-A型M基因保守序列进行设计,不能检测其他型别的RSV。今后可针对RSV-B型保守序列或A、B型通用序列设计检测体系,以更好地满足临床诊断和流行病学监测的需求。

【附加材料】

附图1—2及附表1见 <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1508.2026.0407FJ>。
请扫描右方二维码获取。



【参考文献】

[1] Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults[J]. N Engl J Med, 2005, 352(17): 1749-1759.

[2] Cong B, Koç U, Bandeira T, et al. Changes in the global hospitalisation burden of respiratory syncytial virus in young children during the COVID-19 pandemic: a systematic analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2024, 24(4): 361-374.

[3] 邓娟,于莉莉.人鼠嵌合呼吸道合胞病毒-免疫球蛋白M重组抗体的制备及应用[J].新乡医学院学报, 2025, 42(7): 538-543.

[4] Li Y, Wang X, Blau DM, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis[J]. Lancet, 2022, 399(10340): 2047-2064.

[5] Li ZJ, Zhang HY, Ren LL, et al. Etiological and epidemiological features of acute respiratory infections in China[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5026.

[6] Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, et al. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain[J]. J Infect Dis, 1997, 175(4): 814-820.

[7] Mazur NI, Terstappen J, Baral R, et al. Respiratory syncytial virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape[J]. Lancet Infect Dis, 2023, 23(1): e2-e21.

[8] Walter EB, Munoz FM. New approaches to respiratory syncytial virus prevention and treatment[J]. Annu Rev Med, 2025, 76(1): 13-28.

[9] Branche AR. Real-world effectiveness studies of the benefit of RSV vaccines[J]. Lancet, 2024, 404(10462): 1498-1500.

- [10] 杨欣宇, 朱传凤. 呼吸道合胞病毒候选疫苗临床研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2025, 53(1): 73-83.
- [11] Mahony JB, Blackhouse G, Babwah J, *et al.* Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(9): 2812-2817.
- [12] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [13] Paul B, Montoya G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications[J]. Biomed J, 2020, 43(1): 8-17.
- [14] Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances[J]. Trends Anal Chem, 2018, 98: 19-35.
- [15] Kaminski MM, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, *et al.* CRISPR-based diagnostics[J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(7): 643-656.
- [16] Chen JS, Ma E, Harrington LB, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439.
- [17] Wang B, Wang R, Wang D, *et al.* Cas12aVDe: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. Anal Chem, 2019, 91(19): 12156-12161.
- [18] Wang Y, Ke Y, Liu W, *et al.* A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level[J]. ACS Sens, 2020, 5(5): 1427-1435.
- [19] 姚雪春, 李磊, 王志贤, 等. 基于 CRISPR-Cas12a 技术的呼吸道合胞病毒检测方法的建立[J]. 生物技术通报, 2025, 41(1): 103-109.
- [20] Xi Y, Xu CZ, Xie ZZ, *et al.* Development of a reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of human respiratory syncytial virus[J]. Mol Cell Probes, 2019, 45: 8-13.
- [21] 薛晓宁, 徐鹏飞, 毛毛, 等. 通用型人类呼吸道合胞病毒 RT-RPA 检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2023, 46(6): 523-526.
- [22] Wang X, Yang R, Tang T, *et al.* One-pot MCDA-CRISPR-Cas-based detection platform for point-of-care testing of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2[J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1503356.
- [23] 杨瑞, 唐田, 吾拉尔, 等. 重组酶聚合酶扩增和 CRISPR/Cas12a 蛋白一步法检测人乙型流感病毒[J]. 四川大学学报(医学版), 2025, 56(2): 549-555.

(责任编辑: 蒋铭敏)

解放军医学杂志®