

重组酶聚合酶扩增技术及其在食品安全检测领域的应用

李 龙¹, 王雨婷², 宫玉晶², 宋丽萍^{2*}

¹北京市计量检测科学研究院 北京

²北京市食品检验研究院 (北京市食品安全监控和风险评估中心) 北京

【摘要】随着人们对食品安全问题的日益重视, 适合在现场开展食品安全快速检测的技术越来越受到中国学者的广泛关注。重组酶聚合酶扩增技术 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 是近年来新建立的一种等温核酸扩增技术。与传统的核酸检测技术相比, RPA 技术具有检测速度快, 成本低, 对设备依赖性小等特点, 非常适合在条件简陋或资源不足的地方开展现场食品安全检测工作。本文介绍了 RPA 的扩增原理和最常见 RPA 反应终点检测技术——侧向流层析技术 (LED) 的原理; 综述了 RPA 技术在食源性致病微生物检测、物种成分鉴定、转基因食品鉴定以及食品中过敏原成分鉴定中的应用; 总结分析了 RPA 技术在食品安全检测领域应用的优势和面临的挑战; 并展望了 RPA 技术的未来发展前景。

【关键词】重组酶聚合酶扩增技术 (RPA); 等温核酸扩增技术; 食品安全检测; 食源性致病微生物; 物种成分鉴定; 转基因食品; 过敏原成分

【基金项目】十四五国家重点研发计划 (2022YFF1100902)

【收稿日期】2024 年 5 月 12 日

【出刊日期】2024 年 6 月 21 日

【DOI】10.12208/j.jafs.20240018

Recombinase polymerase amplification technology and its application in food detection

Long Li¹, Yuting Wang², Yujing Gong², Liping Song^{2*}

¹Beijing Institute of Metrology and Testing, Beijing

²Beijing Food Inspection and Research Institute (Beijing Food Safety Monitoring and Risk Assessment Center), Beijing

【Abstract】As people pay more and more attention to food safety issues, the technology suitable for rapid food safety detection in the field has attracted more and more attention from Chinese scholars. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) is a newly established isothermal nucleic acid amplification technique. Compared with the traditional nucleic acid detection technology, RPA technology has the characteristics of fast detection speed, low cost, little dependence on equipment, etc., which is very suitable for carrying out on-site food safety detection work in places with poor conditions or insufficient resources. This paper introduces the principle of RPA amplification and the principle of the most common RPA endpoint detection technology, lateral flow chromatography (LED). The application of RPA technology in detection of foodborne pathogenic microorganisms, identification of species components, identification of genetically modified food and identification of allergens in food was reviewed. The advantages and challenges of the application of RPA technology in the field of food safety inspection are summarized and analyzed. The future development prospect of RPA technology is also prospected.

【Keywords】Recombinase polymerase amplification technique (RPA); Isothermal nucleic acid amplification technique; Food safety testing; Foodborne pathogenic microorganisms; Species composition identification; Genetically modified food; Allergen component

重组酶聚合酶扩增技术 (RPA) 是 2006 年 Piepenburg 团队研发建立的, 该技术利用 DNA 酶

(包括合成酶、重组酶和修复酶等) 和引物一起实现对靶基因的扩增^[1]。与目前在食品检测领域被广

作者简介: 李龙 (1984-) 男, 湖北, 硕士, 高级工程师, 食品安全;

*通讯作者: 宋丽萍

泛使用的 PCR 技术相比, RPA 技术摆脱了对热循环仪的依赖, 在常温条件下, 5~30min 内即可完成检测工作^[2]。RPA 技术的这些优势使其极其适合在条件简陋或资源不足的地区开展食品安全检测工作。

另外, RPA 扩增过程对反应体系中的杂质耐受性较高^[3]。一些 PCR 反应的抑制剂, 例如血清、乙醇和肝素等, 并不能抑制 RPA 的扩增过程。正是由于 RPA 反应的这种特性, 使其更适合对成分比较复杂的食品样本进行检测。目前, 已经有研究证实 RPA 反应可以直接用于对牛奶等样本进行检测, 而无需对样品进行纯化处理^[4-6]。

1 RPA 反应

1.1 RPA 反应的扩增原理

RPA 扩增过程类似于模拟体内 DNA 的重组过程^[2]。主要分为 6 个基本步骤: 第一、重组酶蛋白 (Uvs X, 从 T4 噬菌体中提取) 在 ATP、辅助因子 (Uvs Y) 和拥挤试剂 (高分子量聚乙二醇) 存在的条件下与上、下游引物结合形成重组酶蛋白-引物复合物 (图 1A); 重组酶蛋白-引物复合物在双链 DNA 序列 (靶序列) 中寻找并结合到与引物核酸序列相似的部位 (图 1B); 重组酶蛋白-引物复合物解开 DNA 双链, 并结合在靶序列中与引物序列互补的区域上 (图 1C); 为了稳定被置换出的母链 DNA, 单链 DNA 结合蛋白 (SSB) 会与置换出的母链 DNA 结合 (图 1D);

随后, 重组酶蛋白与引物解离, 链置换 DNA 聚合酶结合在引物的 3' 端, 在 dNTPs 存在的条件下, 开始链延伸过程 (图 1E); 延伸置换出的单链 DNA 分子会立刻与单链 DNA 结合蛋白结合以稳定其自身结构, 这种结合并不是稳定的, 而是随着链延伸过程在“结合-解离”的动态变化中进行着的, 直到延伸过程结束 (图 1F)。RPA 的扩增过程十分迅速, 30min 内就可以使靶序列扩增到 10^{12} 数量级, 完全可以达到检测水平。

1.2 RPA 反应的技术参数

前还没有开发出针对 RPA 反应的引物设计软件。RPA 引物的设计原则与 PCR 引物的设计原则非常相似, 例如引物的设计长度不宜超过 45bp; 引物中 CG 碱基对的含量应在 30%-70%之间; 在设计引物时, 5' 端应避免出现连续的鸟嘌呤 (G) 等。事实上, 一些研究者发现, 在某些反应中, 普通的 PCR

扩增引物可以成功的完成 RPA 的扩增过程^[7]。

RPA 反应在 22~45°C 之间都可以进行^[3,8,9]。然而, 大部分研究报告中的研究结果都显示 RPA 反应的最佳反应温度在 37~42°C 之间^[2], 为了获得更快的反应速度和更高的灵敏度, 在进行 RPA 反应不得不借助加热设备的辅助, 在气候温暖的地区 (温度高于 30°C) 应用 RPA 技术进行检测时则不需要任何加热设备^[8,9]。

RPA 反应所需要的时间长短与反应模板中 DNA 的初始量密切相关, 反应最快可以在 3~4 分钟之内完成 (完成反应是指产物量可以达到终点检测的检出限), 最慢 20 分钟也可以完成扩增反应^[10]。

1.3 RPA 反应的样本类型

RPA 反应可以以双链 DNA, 单链 DNA, 甲基化 DNA, cDNA (通过反转录获得的单链 DNA 分子) 或 miRNA 为模板进行扩增^[11]。

RPA 反应可以检测的样本类型非常多, 包括微生物 (细菌、真菌、病毒等)、体液 (尿液、血液、泪液等)、外科手术样本 (皮肤、肝、肾等)、动物和植物^[12]。此外, 有研究结果显示, RPA 技术可以用于对非核酸物质——适配体进行间接检测^[13,14]

1.4 RPA 试剂的存储条件

试剂盒中提供的 RPA 试剂都是以固体形式存在的, 这些试剂在冷冻 (<15°C) 或冷藏 (2~8°C) 的环境下可以稳定保存至少一年以上, 在室温的环境下 (22~28°C) 可以稳定保存 6 个月以上^[9]。

以固体形式存在的颗粒配置成溶液后, 可以放置在 4°C 下存储, 存储液与新鲜配置的反应缓冲液相比检测的灵敏度会下降 10 倍左右, 固体颗粒配置成溶液后在室温条件下贮存会降解, 不能再进行有效检测^[15]。

1.5 RPA 反应的特异性

RPA 反应特异性与引物序列和靶序列的错配碱基的数量和分布相关, 相同数量的错配碱基在引物上分布的位置不同^[16], 对反应特异性的影响也不一样。

事实上, RPA 反应对于碱基错配的包容性的比较高的。因此, RPA 反应适宜用于检测可能存在突变靶基因的样本, 而不适于用于对靶基因进行分子分型^[17]。RPA 反应对引物错配碱基包容性较高的一大弊端在于很容易引起交叉反应, 产生假阳性的检

测结果^[17]。

使用肽核酸来替代 RPA 反应的引物可以显著提高 RPA 反应的特异性, 但是使用肽核酸作为引物进行 RPA 扩增时需要先将反应体系加温至 99°C 后再冷却至 66°C, 以便肽核酸于靶序列形成稳定的复合物以启动扩增反应, 然而, 这势必会增加 RPA 反应对设备的依赖性, 并延长 RPA 的反应时间^[18]。增加 RPA 反应特异性的另外一种方法是缩短引物的长度, 使引物的长度控制在 19~21bp 之间, 较短的引物会降低引物和靶序列之间的稳定性, 从而提高反应的特异性^[19]。

2 侧向流层析技术 (LFD) 原理简介

RPA 扩增结束后, 需要通过合适的技术方案对终点结果进行分析。目前可以用于 RPA 终点检测的

技术有很多, 例如: 琼脂糖凝胶电泳检测技术、实时荧光监测技术、侧向流层析技术 (lateral flow device, LFD)、微阵列芯片技术以及数字定量技术等^[20-24]。

然则, 要最大限度的发挥 RPA 技术可以在现场或简陋的环境下开展食品安全检测的优势特点, 使用 LED 技术对 RPA 的检测结果进行分析是最合适的。因为 LED 分析技术也不需要依赖任何检测设备, 仅凭肉眼就可以判读检测结果, 并且检测耗时很短, 几分钟就可获得分析结果^[25,26]。

目前 TwistDx 公司已经获得了 RPA 技术的专利授权, 该公司的 TwistAmp[®] nfo 试剂盒恰好是为 RPA-LED 技术研发的^[1]。因此, 从食品安全现场检测需求出发, 本综述以 TwistAmp[®] nfo 试剂盒为例, 综述 RPA-LED 的检测原理。

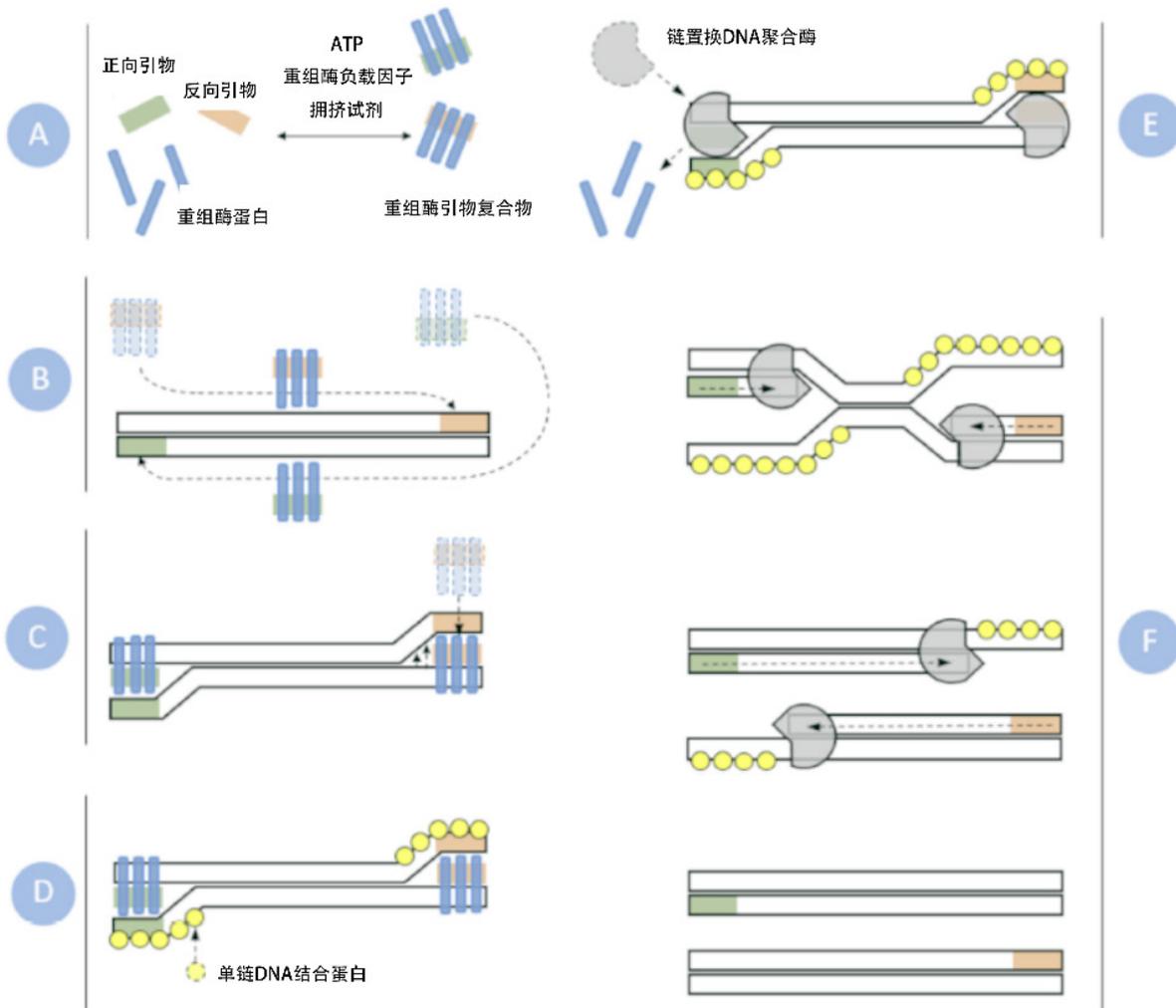


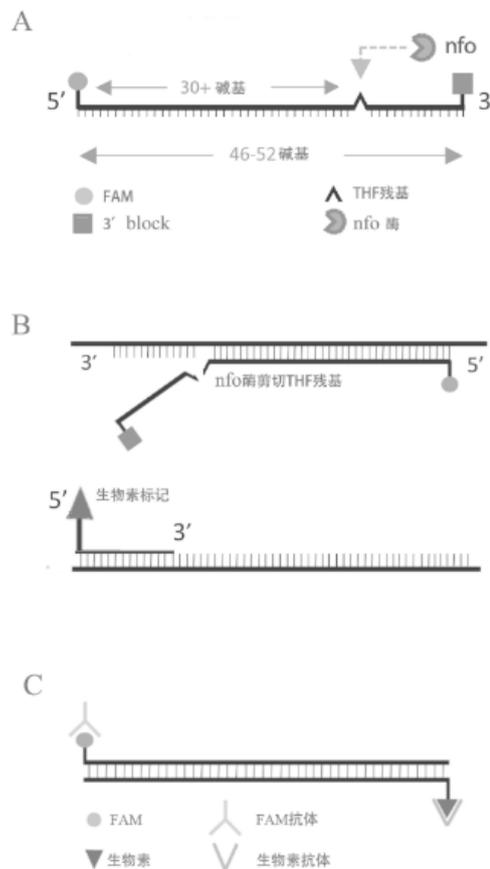
图 1 RPA 扩增原理图^[2]

在 TwistAmp[®] nfo 的检测试剂盒中,除提供了检测所必须的试剂外,还需要使用者根据自己的需求设计一条 nfo 探针和一对上、下游引物。试剂盒对探针和引物的设计都提出了具体的要求: nfo 探针长度为 46~52 个碱基,其 5'端需进行 FAM 标记,3'端需标记一个聚合酶延伸阻滞模块。探针的内部需设计插入一个核酸类似物(四氢呋喃,也叫 dSpacer。该类似物距离 5'端至少 30 个碱基,距离 3'端至少 15 个碱基)(图 2A)。与探针延伸方向相反的引物 5'端需标记生物素。与探针延伸方向相同的引物两端不进行任何标记修饰。

当扩增反应开始后, nfo 探针与靶序列结合形成双链 DNA 复合物,此时, nfo 酶会识别这段双链序列,并剪切 dSpacer,从而使 nfo 探针 3'端的聚合酶延伸阻滞模块脱落,随后 nfo 探针的 3'端开始沿着靶序列复制延伸;与此同时,上下游引物也开始对靶序列进行扩增(图 2B)。扩增结束后,产生的扩

增产物是带有双标记的,其中 5'端带有 FAM 标记,而 3'端带有生物素标记(图 2C)。

LFD 层析试纸条的加样区预埋了过饱和的 anti-FAM 纳米金颗粒,这些纳米金颗粒聚集在一起后会在试纸条上呈现肉眼可辨的紫红色条带。试纸条的检测线处预埋了生物素抗体,在控制线处预埋了纳米金颗粒抗体(图 2D)。当将扩增产物加入试纸条的加样区后,样品中标记了 FAM 的核酸序列会被 anti-FAM 纳米金颗粒捕获;样品向下继续涌动到检测线处时,样品中标记了生物素的核酸序列就会被预埋在此处的生物素抗体捕获。如果样品中含有 FAM 和生物素双标的核酸序列,检测线处会因聚集大量的纳米金颗粒而出现紫红色条带(图 2F);样品继续向下涌动,剩余的纳米金颗粒会被指控线处预埋的纳米金颗粒抗体捕获,呈紫红色条带。如果试纸条失效,则在试纸条上不会出现任何紫红色条带。



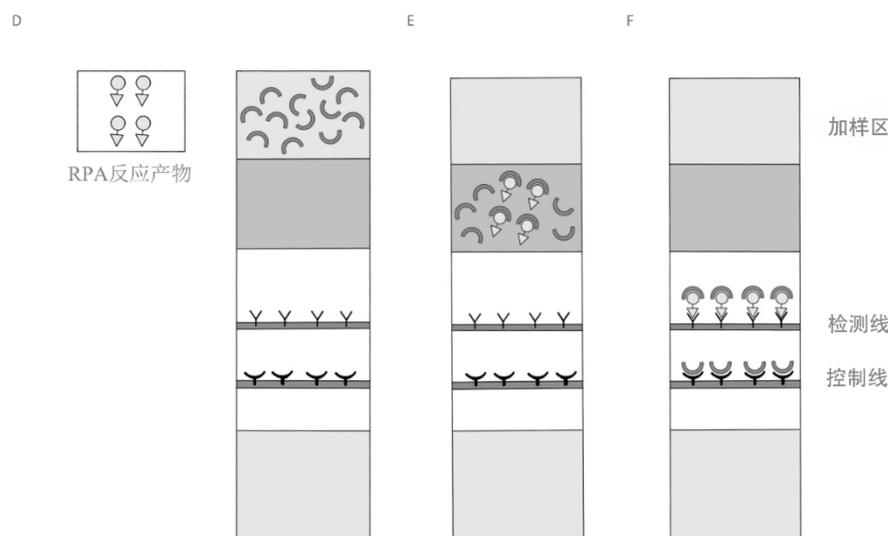


图2 RPA-LED 检测原理图

3 RPA 技术在食品安全检测领域的应用

本综述以 PubMed 和 CNKI 数据库为基础, 检索了 RPA 技术发明以来, 该技术在食品安全检测领域的相关研究报道。虽然在 2006 年 RPA 技术就被公诸于世, 然而, 近 10 年来才是 RPA 检测技术在食品安全检测领域应用最为蓬勃发展的时期。我国领土幅员辽阔, 并且地区发展极为不均衡, 最大程度的摆脱实验设备对食品检验工作的限制有利于食品安全检测计划在全国范围的实施。因此, 中国学者对于 RPA 技术在食品安全检测领域的应用研究热情格外高涨, 在可见的报道中, 中国学者的研究成果占据了总数的 90% 以上。

RPA 技术在食品安全检测领域的应用相当广泛, 这些领域主要包括食源性病原微生物的检测(病毒、细菌、真菌和寄生虫)、动物源性成分鉴定、转基因食品鉴定和过敏原物质检测四大领域。其中 RPA 技术在食源性病原微生物检测领域的应用报道最多。

3.1 RPA 技术在食源性病原微生物检测领域的应用

食源性病原微生物主要包括细菌、病毒、真菌和寄生虫等。其中应用 RPA 技术对食品中食源性致病菌的检测报道居多(表 1)。

正常食品中食源性致病菌的含量极低。要想成功的对食品中的食源性致病菌进行检测, 必须对样本中的食源性致病菌进行增菌富集。通常, 富集增

菌的时间会控制在 4~24 小时以内, 各别致病菌的增菌时间会延长至 48 小时^[27-39]。一些研究者为了缩短检测时间, 会采取震荡培养的方式进行增菌富集^[27, 30, 35, 39]。适当延长增菌时间可以有效的提升下游 RPA 技术的检测灵敏度^[32, 34, 35, 40]。增菌结束后, 绝大部分研究者采用离心(首先通过 800g, 10min 离心去除增菌液中的食品残渣; 随后采用 12000g, 10min 离心收集细菌)的方法收集待检测致病菌^[32, 33, 40], 少部分研究者会采用磁珠富集技术收集食源性致病菌。磁珠富集技术的应用可以有效提高 RPA 技术对食源性致病菌检测的灵敏度^[32]。

RPA 检测技术适合应用于食品安全检测的另一特点在于: RPA 的扩增反应对体系的纯净度要求不高, 一些可以抑制 PCR 反应的物质并不能抑制 RPA 扩增反应的进行^[1]。食品组成成分相当复杂, 其中难免会存在一些 PCR 反应的抑制剂。然而, 应用 RPA 技术进行检测时, 一些研究者探索使用将富集后收集到的菌体直接煮沸作为基因组 DNA 模板进行 RPA 检测, 实验结果显示, 这种简单的基因组 DNA 获取方式并不影响 RPA 检测的灵敏度^[28, 30, 32, 33, 40]。与使用试剂盒法提取细菌基因组 DNA 相比, 煮沸法不但耗时短、费用低, 而且对设备的依赖性也不强, 非常适合在现场或者条件艰苦的地区开展检测。为了获得更好的扩增效果, 多数的 RPA 检测都是在 37~42°C 之间开展的^[5, 27-43]。RPA 反应持续的时间与 RPA 检测的灵敏度密切相关^[31]。研究结果显示, 只

要检测条件控制适宜, RPA-LED 的检测灵敏度与 PCR 和 LAMP 技术几乎相当, 略低于 real-time RPA 和 real-time PCR 的检测灵敏度^[36,37]。

在实际的检测工作中, 一份样本很可能会含有多种食源性致病菌。如果 RPA 技术可以实现对食源性致病菌的多重检测, 那么会大大提高 RPA 技术在实际工作中的应用价值。目前, 已经有研究者在这一领域开展了探索性的研究工作。2020 年, Ma 等人利用 RPA-LED 技术同时检测鱼、虾和鳕鱼中的金黄色葡萄球菌, 副溶血性弧菌以及沙门氏菌^[39]; 2018 年, Ahn 等人利用 RPA-纸芯片法实现了对牛奶中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及鼠伤寒沙门氏菌的多重检测^[41]; 2016 年, Choi 等人设计了一种“直接离心的 RPA 微型设备”建立了同时检测奶制品中的沙

门氏菌、大肠杆菌 O157 以及副溶血性弧菌的技术方法^[5]。然而, 在实际的应用过程中, 基于 RPA 技术对食源性致病菌进行多重检测仍任重而道远。其主要的难点在于, 很难研发出一种可以适合多种致病菌同时富集的增菌培养, 增菌效果的好坏与最终检测的准确性和灵敏性密切相关; 另外, 设计在同一体系中没有交叉反应的多对扩增引物也是一项突出的技术难题。除食源性致病菌外, RPA 技术在其它食源性病原微生物检测领域也有应用。目前, 诸如病毒是流行性最为广泛的食源性病毒, 每年全世界 60% 以上的食源性疾病都是由诺如病毒引起的^[44]。2020 年, Jia^[44]等人利用 RPA-LED 技术实现了对 II 型诺如病毒的检测, 检测反应可以在 20min 内完成, 检测的灵敏度为 50copies/反应。

表 1 基于 RPA 技术对食源性致病菌的检测

食源性致病菌名称	前增菌培养条件	检测方法	检测耗时* (min)	检测温度 (°C)	检测灵敏度 CFU/mL (g)	食品基质	基因组 DNA 提取方法	参考文献
沙门氏菌	37°C 200rpm 震荡培养 16h	RPA-LED	10	37	1.29x10 ²	番茄、卷心菜、西兰花	试剂盒	[27]
沙门氏菌	/	RPA-LED	10	40~42	1.95x10 ⁰	牛奶	试剂盒	[42]
沙门氏菌	/	RPA-LED	20	常温	1.00x10 ³	牛奶、液体蛋	100°C 煮沸 10min	[40]
沙门氏菌	37°C 静置培养 4h	RPA-LED	20	37	1.05x10 ⁰	鸡胸肉和牛奶	100°C 煮沸 10min	[28]
沙门氏菌	37°C 静置培养 16h	RPA-LED	8	40	5.00x10 ¹	文蛤、黄斑蛤、贻贝	试剂盒	[29]
副溶血性弧菌	37°C 200rpm 震荡培养 2h	RPA-LED	25	37	1.00x10 ⁰	虾、牡蛎、鲳鱼	100°C 煮沸 10min	[30]
副溶血性弧菌	37°C 静置培养过夜	real-time RPA	14	39	0.10x10 ⁰	大黄鱼	试剂盒	[31]
副溶血性弧菌	37°C 静置培养 8h	real-time RPA	35	38	1.00~7.00x10 ⁰	耗油、鳕鱼、鱿鱼	100°C 煮沸 10min	[32]
副溶血性弧菌	37°C 静置培养 8h	RPA-LED	10	37	2.00x10 ⁰	牡蛎	100°C 煮沸 10min	[33]
金黄色葡萄球菌	37°C 静置培养 6h	RPA-PFS#	10	40~42	3.80x10 ¹	猪肉、牛肉、虾、鱼、 奶酪、卷心菜、剩饭、 鸡蛋、牛奶、橙子	试剂盒	[34]
单增李斯特氏菌	30°C 震荡培养 24h	RPA-LED	40	39	9.10x10 ⁰ **	生产食品设备表面	试剂盒	[35]
O157: H7	/	RPA-LED	10	42	4.40x10 ⁰	牛奶	试剂盒	[36]
克罗诺杆菌	36°C 静置培养 8h	real-time RPA	10	38	0.10x10 ⁰	婴幼儿配方奶粉	试剂盒	[37]
空肠弯曲菌	42°C 静置培养 48h	real-time RPA	12	38	4.00x10 ⁰	牛奶、鸡胸肉	试剂盒	[38]
产志贺毒素的大肠杆菌	/	real-time RPA	10	39	5.00~7.00x10 ⁰	/	试剂盒	[43]
金黄色葡萄球菌 沙门氏菌 副溶血性弧菌	37°C 200rpm 震荡培养 6h	RPA-LED	15	37	1.20~7.60x10 ⁰	鱼、虾、鳕鱼	试剂盒	[39]
大肠杆菌 金黄色葡萄球菌 鼠伤寒沙门氏菌	/	RPA-纸芯片	20	37	1.00~7.60x10 ²	牛奶	试剂盒	[41]
大肠杆菌 O157 沙门氏菌 副溶血性弧菌	/	RPA-荧光检测	30	39	1.20x10 ³	奶制品	试剂盒	[5]

*本表格中的检测时间不包括前增菌的培养时间。

#RPA-PFS 是指利用重组酶聚合酶扩增技术对靶基因扩增, 利用聚合物絮凝沉淀技术 (PFS) 对扩增结果进行分析。

**因为检测对象是食品生产设备的表面, 因此, 该检测灵敏度的单位为 CFU/cm²

同年, Han^[45]等人应用 real-time RPA 技术对环境 and 临床样本的 II 型诺如病毒进行检测, 检测可以在 20min 内完成, 检测的灵敏度可以达到 17 copies/ μ L。除食源性病毒外, RPA 技术在食源性寄生虫检测领域的应用也有报道。广州管圆线虫属于食源性寄生虫, 其幼虫可以侵犯人体中枢神经系统, 引发脑膜炎等疾病。2021 年, Jarvi^[46]等人对比分析了应用 real-time PCR 和 RPA-LED 两种技术检测蛞蝓中的广州管圆线虫的实验结果。研究结果表明, 虽然 RPA-LED 的检测灵敏度不如 real-time PCR, 但是该技术的检测耗时要远远低于 real-time PCR。

3.2 RPA 技术在物种鉴定领域的应用

市场上, 不法商贩以次充好、挂羊头卖狗肉的现象屡见不鲜。物种鉴定技术是监管部门惩治不法商贩的主要技术手段之一。Fu^[47]等人联合应用 RPA 与 MLED (多重试纸条扩增技术) 技术, 鉴别牛肉中混有的鸭肉成分, 整个鉴定反应可以在 35min 内完成, 样品中鸭源性成分的检出限为 5%。Kissenkotter^[48]等人利用 real-time RPA 技术鉴定马肉和猪肉。鉴定过程仅需 6-11 分钟即可完成, 对马肉和猪肉的检测灵敏度均可达到 0.1%。

3.3 RPA 技术在转基因食品检测领域的应用

随着转基因技术的不断发展, 越来越多的转基因食品开始走向市场, 对于转基因食品的监管和检测越来越受到有关部门的重视。Xu^[49]等人以 camv-35S 启动子和 NOS 终止子为检测靶点, 利用 real-time RPA 技术对转基因玉米进行检测, 检测可在 15~25min 内完成, 检测灵敏度可以达到 100copies/反应。同时, 该研究团队还成功的利用该技术实现了对转基因玉米、转基因水稻、转基因棉花和转基因大豆的检测。Li^[50]等人应用 RPA 技术对转基因玉米进行鉴定, 作者通过在 RPA 扩增引物的 5'端设计一段转基因玉米 MON810, MON863, MON89034 的通用扩增序列, 从而实现使用一对扩增引物同时检测三种转基因玉米实验构想。CHANDUA^[9]等人以转基因 RR2Y 大豆为研究对象, 建立了一种 RPA 的现场检测方法, 以大豆样品中内源 Lec 基因作为对照, 反应开始后大约 5-7min, Lec 调控的反应在所有的情况下均产生阳性信号。

3.4 RPA 技术在过敏原检测领域的应用

随着食品行业的发展, 食源性过敏性疾病已经成为全球性的问题, 并且已经引起了世界广泛的关

注。目前, 世界范围内公认的八大食源性过敏原物质主要包括牛奶、蛋、花生、坚果、鱼类、贝类、大豆和麦类。Santiago-Felipe^[34]等人应用 RPA-ELISA 技术检测榛子、花生、大豆、番茄和玉米种的过敏原成分, 检出限为 1.3-5.3 μ g/g。Jause-Trubio^[14]等人基于核酸适配体-重组酶聚合酶 (Apta-RPA) 对食品中的羽扇豆成分进行检测, 25min 即可完成检测, 检测的灵敏度可以到达 3.5×10^{-11} mol/L。

4 RPA 技术在食品检测领域应用的局限性

RPA 检测技术具有检测速度快、成本低, 对设备依赖性小, 特别适合在资源匮乏的地区开展检测工作等优势。然而, RPA 技术在食品检测领域的应用仍面临严峻挑战。首先, 市场上基于 RPA 技术的检测便携设备多集中在医疗领域。针对食品检测开发的检测装备数量有限, 这主要是由于食品基质复杂的原因造成的。基质成分越复杂, 分离获取 DNA 的难度就越大, 特别是针对深加工的食品, 很难开发出对应的样品前处理设备。其次, 英国的 TwistDx 公司已经获取了 RPA 技术专利。开展 RPA 检测所需要的试剂必须从 TwistDx 公司购买, 这极大的增加了该技术的应用成本。最后, 在食品安全监测工作中, 特别是对食源性致病微生物的监测过程中, 通常需要同时检测样品中的多种食源性致病菌。然而, 目前大部分基于 RPA 技术的检测方法都是通过单一靶标开展的检测, 在同一个体系中, 进行多重 RPA 反应对引物的设计要求和体系配比的要求都相当的高, 未来, 开发高通量, 可以同时检测多种目标成分的 RPA 技术是其在食品领域应用的发展方向。

5 RPA 技术在食品检测领域的应用展望

RPA 技术具有很多适于在食品检测领域应用的优点。例如, 在开展检测的过程中仅需要简单的加热设备。检测的操作和结果的判读都极为简单, 基本上不需要检测人员具备相关的知识背景就可完成检测。检测的速度快、灵敏度高。再例如, RPA 反应对工作体系中的扩增抑制剂反应不敏感, 很多没有办法用 PCR 技术完成的扩增反应都可以利用 RPA 技术完成扩增检测, 这一特点恰恰可以满足食品基质复杂, 样品中高纯度、高质量的 DNA 提取困难这一特点。在未来, RPA 技术很有可能全面取代 PCR 技术在食品快速检测领域发挥作用。在未来, 开发适合食品检测的 RPA 便携设备, 建立高通量 RPA 检测技术是推动 RPA 技术在食品检测领域广泛应用的发展方向。

参考文献

- [1] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(7): e204.
- [2] LOBATO I M, O'SULLIVAN C K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances [J]. *Trends Analyt Chem*, 2018, 98(19-35).
- [3] KERSTING S, RAUSCH V, BIER F, et al. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis [J]. 2014, 13(1): 1-9.
- [4] KROLOV K, FROLOVA J, TUDORAN O, et al. Sensitive and rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by recombinase polymerase amplification directly from urine samples [J]. *J Mol Diagn*, 2014, 16(1): 127-35.
- [5] CHOI G, JUNG J H, PARK B H, et al. A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria [J]. *Lab Chip*, 2016, 16(12): 2309-16.
- [6] WU Y D, ZHOU D H, ZHANG L X, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for equipment-free detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy cattle feces [J]. *Parasitol Res*, 2016, 115(9): 3551-5.
- [7] MAYBORODA O, GONZALEZ BENITO A, SABATE DEL RIO J, et al. Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis* [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(3): 671-6.
- [8] LILLIS L, LEHMAN D, SINGHAL M C, et al. Non-instrumented incubation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of proviral HIV-1 DNA [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108189.
- [9] CHANDU D, PAUL S, PARKER M, et al. Development of a Rapid Point-of-Use DNA Test for the Screening of Genuity(R) Roundup Ready 2 Yield(R) Soybean in Seed Samples [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016(3145921).
- [10] XIA X, YU Y, WEIDMANN M, et al. Rapid detection of shrimp white spot syndrome virus by real time, isothermal recombinase polymerase amplification assay [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104667.
- [11] WEE E J, NGO T H, TRAU M. Colorimetric detection of both total genomic and loci-specific DNA methylation from limited DNA inputs [J]. *Clin Epigenetics*, 2015, 7(65).
- [12] VALIADIM, KALSI S, JONES I G, et al. Simple and rapid sample preparation system for the molecular detection of antibiotic resistant pathogens in human urine [J]. *Biomed Microdevices*, 2016, 18(1): 18.
- [13] LOO J F, LAU P M, HO H P, et al. An aptamer-based bio-barcode assay with isothermal recombinase polymerase amplification for cytochrome-c detection and anti-cancer drug screening [J]. *Talanta*, 2013, 115(159-65).
- [14] JAUSET-RUBIO M, SABATE DEL RIO J, MAIRAL T, et al. Ultrasensitive and rapid detection of beta-conglutinin combining aptamers and isothermal recombinase polymerase amplification [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(1): 143-9.
- [15] LILJANDER A, YU M, O'BRIEN E, et al. Field-Applicable Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(9):2810-5.
- [16] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology [J]. *Mol Cell Probes*, 2015, 29(2): 116-21.
- [17] MONDAL D, GHOSH P, KHAN M A, et al. Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay [J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9(1): 281.
- [18] LIU Y, LEI T, LIU Z, et al. A Novel Technique to Detect EGFR Mutations in Lung Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5):
- [19] BOYLE D S, LEHMAN D A, LILLIS L, et al. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification [J]. *mBio*, 2013, 4(2):
- [20] KERSTING S, RAUSCH V, BIER F F, et al. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens [J]. *Mikrochim Acta*, 2014, 181(13-14): 1715-23.

- [21] KUNZE A, DILCHER M, ABD EL WAHED A, et al. On-Chip Isothermal Nucleic Acid Amplification on Flow-Based Chemiluminescence Microarray Analysis Platform for the Detection of Viruses and Bacteria [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(1): 898-905.
- [22] WEE E J, HA NGO T, TRAU M. A simple bridging flocculation assay for rapid, sensitive and stringent detection of gene specific DNA methylation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(15028).
- [23] KIM J, BIONDI M J, FELD J J, et al. Clinical Validation of Quantum Dot Barcode Diagnostic Technology [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(4): 4742-53.
- [24] MING K, KIM J, BIONDI M J, et al. Integrated quantum dot barcode smartphone optical device for wireless multiplexed diagnosis of infected patients [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 3060-74.
- [25] ROHRMAN B A, RICHARDS-KORTUM R R. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(17): 3082-8.
- [26] CRANNELL Z A, CASTELLANOS-GONZALEZ A, IRANI A, et al. Nucleic acid test to diagnose cryptosporidiosis: lab assessment in animal and patient specimens [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(5): 2565-71.
- [27] LI J, MA B, FANG J, et al. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Combined with Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Salmonella in Food [J]. *Foods*, 2019, 9(1):
- [28] LIU H B, ZANG Y X, DU X J, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of Salmonella bacteria [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(9): 7016-25.
- [29] GAO W, HUANG H, ZHU P, et al. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick for equipment-free detection of Salmonella in shellfish [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2018, 41(5): 603-11.
- [30] YANG X, ZHAO P, DONG Y, et al. An improved recombinase polymerase amplification assay for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* with lateral flow strips [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(6): 1834-44.
- [31] YANG X, ZHANG X, WANG Y, et al. A Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Method for Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in Seafood [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11(586981).
- [32] GENG Y, TAN K, LIU L, et al. Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1): 186.
- [33] JIANG W, REN Y, HAN X, 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(12): 2903-14.
- [34] HU J, WANG Y, DING H, et al. Recombinase polymerase amplification with polymer flocculation sedimentation for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food samples [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 331(108691).
- [35] AZINHEIRO S, CARVALHO J, PRADO M, et al. Application of Recombinase Polymerase Amplification with Lateral Flow for a Naked-Eye Detection of *Listeria monocytogenes* on Food Processing Surfaces [J]. *Foods*, 2020, 9(9):
- [36] HU J, WANG Y, SU H, et al. Rapid analysis of *Escherichia coli* O157:H7 using isothermal recombinase polymerase amplification combined with triple-labeled nucleotide probes [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 50(101501).
- [37] LIU S, GENG Y, LIU L, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid detection of *Cronobacter* spp [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(6): 4914-22.
- [38] GENG Y, LIU G, LIU L, et al. Real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of *Campylobacter jejuni* in food samples [J]. *J Microbiol Methods*, 2019, 157(31-6).
- [39] MA B, LI J, CHEN K, et al. Multiplex Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Simultaneous Detection of Three Foodborne Pathogens in Seafood [J]. *Foods*, 2020, 9(3):
- [40] HICE S A, CLARK K D, ANDERSON J L, et al. Capture, Concentration, and Detection of Salmonella in Foods Using Magnetic Ionic Liquids and Recombinase Polymerase

- Amplification [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(1): 1113-20.
- [41] AHN H, BATULE B S, SEOK Y, et al. Single-Step Recombinase Polymerase Amplification Assay Based on a Paper Chip for Simultaneous Detection of Multiple Foodborne Pathogens [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(17): 10211-6.
- [42] HU J, HUANG R, SUN Y, et al. Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella* Typhimurium in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks [J]. *J Microbiol Methods*, 2019, 158(25-32).
- [43] MURINDA S E, IBEKWE A M, ZULKAFFLY S, et al. Real-time isothermal detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using recombinase polymerase amplification [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2014, 11(7): 529-36.
- [44] JIA T, YU Y, WANG Y. A recombinase polymerase amplification-based lateral flow strip assay for rapid detection of genogroup II noroviruses in the field [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(12): 2767-76.
- [45] HAN Y, WANG J, ZHANG S, et al. Rapid detection of norovirus genogroup II in clinical and environmental samples using recombinase polymerase amplification [J]. *Anal Biochem*, 2020, 605(113834).
- [46] JARVI S I, ATKINSON E S, KALUNA L M, et al. Development of a recombinase polymerase amplification (RPA-EXO) and lateral flow assay (RPA-LFA) based on the ITS1 gene for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* in gastropod intermediate hosts [J]. *Parasitology*, 2021, 148(2): 251-8.
- [47] FU M, ZHANG Q, ZHOU X, et al. Recombinase Polymerase Amplification Based Multiplex Lateral Flow Dipstick for Fast Identification of Duck Ingredient in Adulterated Beef [J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10(10):
- [48] KISSENKOTTER J, BOHLKEN-FASCHER S, FORREST M S, et al. Recombinase polymerase amplification assays for the identification of pork and horsemeat [J]. *Food Chem*, 2020, 322(126759).
- [49] XU C, LI L, JIN W, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid detection of genetically modified crops [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18197-205.
- [50] LI K, LUO Y, HUANG K, et al. Single universal primer recombinase polymerase amplification-based lateral flow biosensor (SUP-RPA-LFB) for multiplex detection of genetically modified maize [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1127(217-24).
- 版权声明:** ©2024 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

**OPEN ACCESS**