

基于 RPA 技术的红火蚁快速可视化检测方法

秦 磊, 张绪风, 袁鸿超, 郭技星, 周 祥*

海南大学热带农林学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南儋州 571700

摘 要: 红火蚁 (*Solenopsis invicta*) 是一种原产于南美洲的严重入侵害虫, 目前已在我国广泛分布, 对农业、自然生态系统及公共卫生造成严重威胁。出入境检疫作为防止红火蚁入侵和扩散的关键环节, 需要在短时间内对检疫对象进行准确鉴定。现有红火蚁鉴定方法包括形态学鉴定、DNA 条形码、免疫检测及环介导等温扩增等技术, 这些技术均存在一定局限性, 在简便性、检测时间和灵敏度等方面难以满足快速检测的要求。重组聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是一种具有反应条件简单、灵敏度高及扩增效率高的等温扩增技术。为实现红火蚁快速、准确的现场检测, 本研究基于 RPA 技术, 建立了一种红火蚁可视化快速检测方法。通过分析 NCBI 数据库中红火蚁及其近缘种、形近种的线粒体基因组序列, 比对后选取线粒体 NADH₂ 脱氢酶基因作为扩增目标, 并设计了 RPA 特异性引物。结果表明: 设计引物对红火蚁具有高度特异性; 琼脂糖凝胶电泳检测的 RPA 反应灵敏度达到 1.0×10^{-4} ng/ μ L, 为 PCR 反应灵敏度的 1.0×10^3 倍。同时通过检测添加核酸染料后的荧光反应开发了可视化检测技术, 可视化荧光检测的灵敏度约为 1.0×10^{-1} ng/ μ L。最后本研究探索了 DNA 样品的快速提取方法, 采用无菌超纯水研磨蚂蚁样品, 并在 100 °C 水浴加热 1 min 条件下成功粗提 DNA, 取代传统 DNA 提取过程。本方法可在 37 °C 下完成对红火蚁基因的扩增, 并通过荧光反应判断检测结果, 30 min 内完成对红火蚁的快速检测, 为红火蚁的检疫和防控提供了方便、快速、准确、可靠的技术支持。

关键词: 红火蚁; 重组聚合酶扩增; 可视化; 快速检测; 灵敏度

中图分类号: Q968.1; S433 文献标志码: A

A Rapid Visual Detection Method for Red Fire Ants Based on RPA Technology

QIN Lei, ZHANG Xufeng, YUAN Hongchao, GUO Jixing, ZHOU Xiang*

School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests (Ministry of Education), Danzhou, Hainan 571700, China

Abstract: Red fire ant, *Solenopsis invicta*, a serious invasive pest native to South America, has been widely distributed in China, posing significant threats to agriculture, natural ecosystems, and public health. Effective entry-exit quarantine measures are essential to prevent the invasion and spread of *S. invicta*, which requires rapid and accurate identification of the pest. Existing detection methods, including morphological identification, DNA barcoding, immunoassay, and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) have limitations in simplicity, detection speed and sensitivity. Recombinase polymerase amplification (RPA) is an isothermal amplification technique characterized by its simplicity, high sensitivity, and efficient amplification. To enable rapid and accurate on-site detection of *S. invicta*, this study developed a visual detection method based on RPA technology. Mitochondrial genome sequences of *S. invicta* and closely related or morphologically similar species were analyzed using data from the NCBI database. The mitochondrial NADH₂ dehydrogenase gene was selected as the target for amplification, and specific RPA primers were designed. Experimental results confirmed that the primers demonstrated high specificity for *S. invicta*. Sensitivity testing using agarose gel elec-

收稿日期 2025-01-06; 接受日期 2025-02-12

基金项目 崖州湾种子实验室揭榜挂帅项目 (No. B21HJ0905)。

作者简介 秦 磊 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农业昆虫与害虫防治。*通信作者 (Corresponding author): 周 祥 (ZHOU Xiang), E-mail: 991017@hainanu.edu.cn。

trophoresis revealed that the RPA reaction could detect as low as 1.0×10^{-4} ng/ μ L, which is 10^3 times more sensitive than conventional PCR. A visual detection method was further developed by incorporating nucleic acid dyes into the reaction, achieving a sensitivity of approximately 1.0×10^{-1} ng/ μ L. Additionally, a rapid DNA extraction method was explored. This method involved grinding ant samples in sterile water followed by heating at 100 °C in a water bath for one minute, which successfully yielding crude DNA. The developed method enables gene amplification of *S. invicta* at 37 °C, with detection results assessed via fluorescence reactions, completing the entire process within 30 minutes. This approach provides a convenient, rapid, accurate, and reliable technical method for detecting *S. invicta*, offering valuable technical support for its quarantine, prevention and control.

Keywords: *Solenopsis invicta*; recombinant polymerase amplification; visualization; rapid detection; sensitivity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.023

红火蚁 (*Solenopsis invicta*) 原生于南美洲巴拉那河流域^[1], 被认为是世界上最危险的 100 种恶性入侵物种之一^[2]。在全球化贸易背景下, 红火蚁随着人类活动, 借助各类交通工具在全球范围内快速传播扩散^[3]。我国最早在 2003 年于台湾省桃园、嘉义发现红火蚁入侵, 随后 2004 年在广东省吴川市出现, 此后分布范围不断扩大。截至 2021 年, 华南、华中、华东和西南地区的 12 个省份均有红火蚁发生的报道^[4]。红火蚁具有极强的破坏力和环境适应能力, 能够在农田、绿化带、草地等多种生境中迅速定殖并成为优势种, 给农业生产、生态、城市及公共卫生等方面带来严重危害^[5-8]。

红火蚁的入侵主要通过人类活动传播, 例如随苗木和土壤运输等途径扩散^[9]。检疫措施是防止红火蚁进一步扩散的重要手段^[10], 而快速、准确的检测技术是检疫工作的关键。目前红火蚁的鉴定依赖形态学和 DNA 条码技术鉴定, 但红火蚁的体型小, 形态特征不易观察, 特别是在脱离蚁巢后, 直观识别难度大, 需借助体视显微镜并依赖专业人员的经验。而 DNA 条码技术虽然准确性高, 但检测流程繁琐, 耗时较长, 难以满足现场快速检测的需求。VALLES 等^[11]开发了基于红火蚁特异性毒液蛋白的单克隆抗体检测法, 但该方法需要至少 5 只工蚁的毒液蛋白, 灵敏度较低, 当捕获的蚁群较少时难以满足检测需求。LAMP 技术被开发用于红火蚁检测^[12], 但 LAMP 技术容易受气溶胶污染产生假阳性, 此外反应需要 60 °C 和 90 °C 2 个反应温度, 需要仪器设备且操作流程相对繁琐, 检测时间较长^[13-17]。因此, 开发一种准确、高效、简便的红火蚁检测方法具有重要意义。重组聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是一种不通过高温解旋, 利用酶打开模板链, 不需要高温使 DNA

变性, 也不需要高温进行扩增反应^[18], 不依赖 PCR 仪完成核酸指数扩增的恒温扩增技术, 反应条件简单, 在 25~43 °C 恒温条件下即可实现核酸的指数扩增^[19-20]。相对 PCR 和其他恒温扩增技术, 如环介等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 反应时间更短, 条件更简单, 灵敏度更高。自 2006 年报道以来^[21], RPA 已被广泛应用于多种有害生物的现场快速检测。本研究开发了一种基于 RPA 技术的红火蚁可视化检测方法, 快速高效、简便易行, 灵敏准确, 对于防控红火蚁的进一步扩散具有重要的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试虫源 红火蚁 (*Solenopsis invicta*)、法老小家蚁 (*Monomorium pharaonis*) 采自海南省儋州市海南大学儋州校区, 热带火蚁 (*S. geminata*) 采自海南省海口市那央村, 广大头蚁 (*Pheidole megacephala*) 采自海南省乐东黎族自治县尖峰岭, 细纹毛切叶蚁 (*Trichomyrmex destructor*)、迈氏毛切叶蚁 (*T. mayri*) 采自海南省琼中黎族自治县黎母山。蚂蚁样本均为成虫, 保存在无水乙醇中, 存放于 -20 °C 冰箱内。

1.1.2 主要试剂 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、大肠杆菌感受态 (DH5 α) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, Premix Taq 酶、载体 pMD™18-T 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司, RPA 基础扩增试剂盒购自英国 TwistDx 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自德国默克公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒, 按照试剂盒说明书, 分别提取几种蚂蚁样本 DNA, 用超微量紫外分光光度计

(欧洲米欧仪器有限公司)对提取 DNA 的浓度及质量进行测定,保存在-20℃冰箱内备用。

1.2.2 PCR 扩增及物种鉴定 COI 基因通用引物 LCO1490 和 HCO2198^[22]由擎科生物科技股份有限公司(海口)合成,对各蚂蚁样本的 DNA 进行 PCR 反应扩增,PCR 反应使用 25 μL 体系,包括 12.5 μL Premix Taq、9.5 μL 无菌超纯水、1.0 μL DNA 模板和正、反向引物(10.0 μmol/L)各 1 uL。LCO1490 的 PCR 反应条件:94℃预变性 1 min;94℃变性 40 s,45℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,预扩增 5 个循环;HCO2198 的 PCR 反应条件:94℃变性 40 s,51℃退火 40 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 5 min。将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,使用 DNA 纯化回收试剂盒对目的条带进行纯化回收,将纯化产物和载体 pMD™18-T 连接,取连接产物转化到感受态(DH5α)中,筛选阳性克隆,将菌液送往擎科生物科技股份有限公司(海口)测序。

1.2.3 引物设计 引物按照 TwistAmp®检测设计手册指南(<https://www.twist-dx.co.uk>)设计,根据 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供的红火蚁线粒体全基因组与试验中 5 种近缘种和形体近似蚂蚁的线粒体全基因组用 MEGA 11 进行比对,找到红火蚁的特异性碱基位点,最终选取长度为 961 bp 的红火蚁的线粒体 NADH 脱氢酶 2(ND2)基因序列,使用 Primer Premier 5 软件设计引物,将设计引物序列在 NCBI 使用 Primer-BLAST 功能对引物进行分析筛选,得到 ND2F 和 ND2R,初步检验引物的特异性,筛选出特异性良好的引物,并由擎科生物科技股份有限公司(海口)合成(表 1)。

表 1 本试验所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
ND2F	CATAATAATAAAATTAGGTATCCCCCATT
ND2R	GGGGAGGATAGAGCATAGAAAGATAATAGA

1.2.4 PCR 验证引物特异性 对 RPA 引物进行 PCR 反应验证特异性,在 25 μL 体系中进行,体系包括 12.5 μL Premix Taq 酶,10 μL 无菌超纯水,正反向引物各 1 μL,0.5 μL DNA 模板。PCR 扩增

反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s;58℃退火 30 s;72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。取 20 μL 反应产物,在 3%琼脂糖凝胶 100 V 恒压电泳 30 min,电泳结束后在凝胶成像系统紫外透射下观察并且保存结果。

1.2.5 RPA 验证引物特异性 对引物进行 RPA 反应检验,按照试剂盒进行操作,RPA 反应体系为 50 μL 体系,包括 29.5 μL Rehydration buffer,11.2 μL 无菌超纯水,正反向引物各 2.4 μL,1 μL DNA 模板,2.5 μL 280 mmol/L 醋酸镁[Mg(CH₃COO)₂]溶液,简称为 MgOAc,先将 Rehydration buffer、无菌超纯水、正反向引物混匀后加入反应管溶解管中的酶,后加入 DNA 模板和 MgOAc,充分震荡混匀后离心,在 PCR 仪上 37℃孵育 20 min 终止反应。将反应产物按照 PCR 产物纯化试剂盒说明书进行纯化后,取 20 μL 与 2 μL 10×loading buffer 混匀点样,在 3%琼脂糖凝胶上 100 V 恒压电泳 30 min,电泳结束后在凝胶成像系统紫外透射下观察并且保存结果。

1.2.6 反应终点的可视化 将蚂蚁 DNA 进行 RPA 反应后产物中加入 1 μL 的 SYBR GREEN I 核酸染料震荡离心后,放在激发光源下进行观察。

1.2.7 RPA 反应的灵敏度检验 将初始浓度为 100 ng/μL 红火蚁 DNA 模版按照梯度依次稀释至 1.0×10¹、1.0、1.0×10⁻¹、1.0×10⁻²、1.0×10⁻³、1.0×10⁻⁴、1.0×10⁻⁵ ng/μL,PCR 和 RPA 的体系不变,分别进行 RCR 和 RPA 反应,PCR 结果通过琼脂糖凝胶电泳验证,RPA 结果通过琼脂糖凝胶电泳和荧光反应验证。

1.2.8 DNA 快速提取方法的探索 参照 PRITI 等^[23]在棕榈蓟马 RPA 检测中的 DNA 快速提取方法。在 1.5 mL 离心管中加入 50 μL 无菌超纯水,用研磨棒对蚂蚁进行充分研磨,研磨后将离心管在 100℃水浴锅中水浴加热 1 min 得到蚂蚁 DNA 粗提液。用 12.2 μL 的粗提液等体积代替原体系中 11.2 μL 无菌超纯水和 DNA 进行 RPA 反应,将反应产物按照 PCR 产物纯化试剂盒说明书进行纯化后,取 20 μL 与 2 μL 10×loading buffer 混匀点样,在 3%琼脂糖凝胶上 100 V 恒压电泳 50 min,电泳结束后在凝胶成像系统紫外透射下观察并且保存结果。

将待检测蚂蚁放入装有 50 μL 无菌超纯水的离心管中用研磨棒研磨,将离心管放入便携式金属浴中 100℃加热 1~2 min,取 11.2 μL 粗提液加

入提前混入引物与 buffer 的反应管中,加入 2.5 μL MgOAc 颠倒混匀,将反应管握在手中或放入 37 ℃便携式金属浴水浴加热 20 min 后,加入 1 μL SYBR GREEN I 核酸染料,摇匀后在激发光源下观察。

2 结果与分析

2.1 红火蚁及近似种鉴定

COI 通用引物扩增产物的凝胶电泳结果如图 1 所示,1~6 号泳道均出现条带,表明目标片段扩增成功。通过 NCBI 的 BLAST 工具将测序结果与数据库中的物种基因序列进行比对,序列同源性均大于 98%,可确认蚂蚁样本物种。

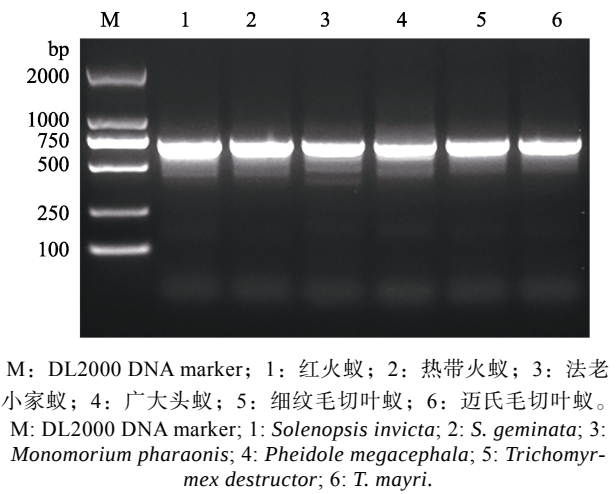


图 1 COI 通用引物 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Results of electrophoresis of PCR products from COI universal primers

2.2 RPA 引物特异性分析

首先利用普通 PCR 对 RPA 引物的特异性进行分析,琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示,1 号泳道有明显条带,2~6 泳道无条带出现,引物特异性良好。

RPA 反应琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示,泳道 1 有明显条带,泳道 2~6 无条带出现,引物在 RPA 反应中特异性良好。

2.3 可视化荧光检测分析

对 5 种蚂蚁 DNA 样品进行 RPA 反应,反应后向体系内加入 1 μL SYBR GREEN 核酸染料,震荡混匀。结果显示,1 号管的样品在激发光源下呈显著荧光,2~6 号管无荧光现象(图 4)。

2.4 PCR 与 RPA 反应灵敏度检测

利用普通 PCR 方法分析 RPA 引物对不同浓度模版检测灵敏度,琼脂糖凝胶电泳结果显示,

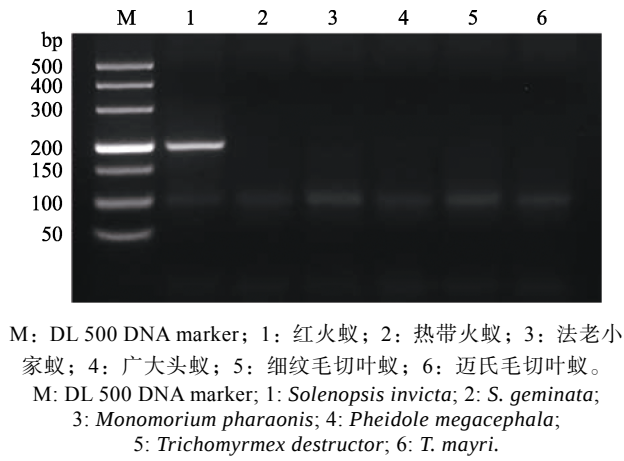


图 2 引物特异性 PCR 验证

Fig. 2 Primer-specific PCR validation

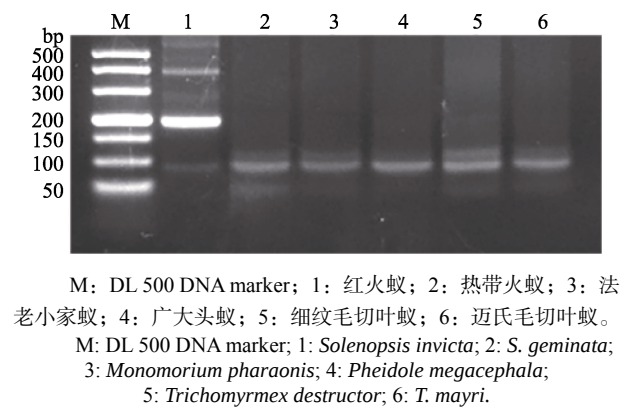


图 3 引物特异性 RPA 验证

Fig. 3 Primer specificity RPA validation

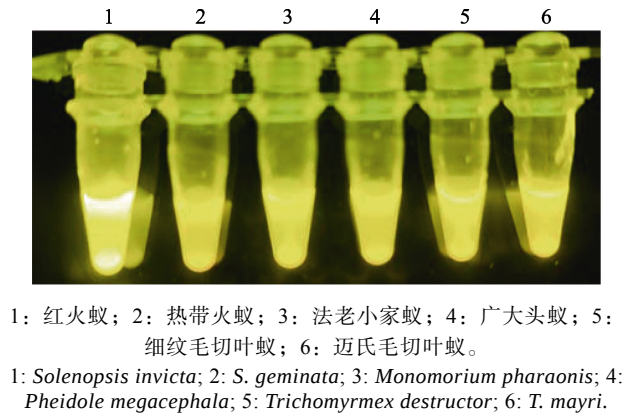
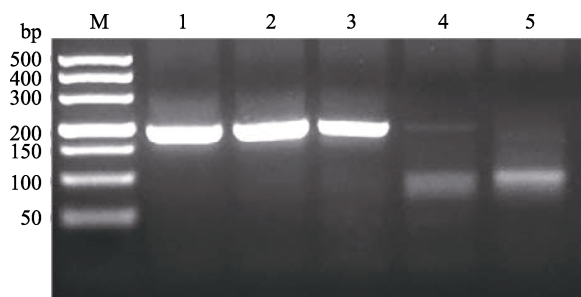


图 4 反应终点可视化检测结果

Fig. 4 Reaction endpoint visualization results

1~3 号泳道有明显条带,4 号泳道隐约可见条带,5 号泳道无条带出现,PCR 反应的灵敏度检测最低限度为 1.0×10^{-1} ng/μL(图 5)。

RPA 反应的琼脂糖凝胶电泳结果显示 1~4 号泳道有明显条带,5~7 号泳道隐约可见条带,8 号泳道无条带出现,RPA 反应的灵敏度检测最低限度为 1.0×10^{-4} ng/μL(图 6)。

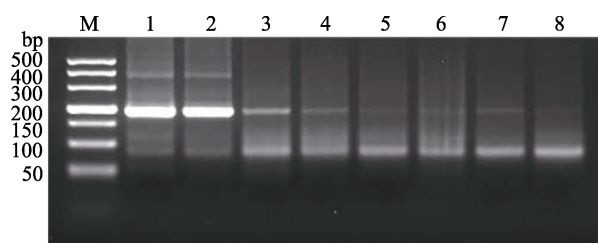


M: DL500 DNA marker; 1~5 表示核酸浓度, 1: 1.0×10^2 ng/μL; 2: 1.0×10^1 ng/μL; 3: 1.0 ng/μL; 4: 1.0×10^{-1} ng/μL; 5: 1.0×10^{-2} ng/μL。

M: DL500 DNA marker; 1~5 indicate nucleic acid concentrations, 1: 1.0×10^2 ng/μL; 2: 1.0×10^1 ng/μL; 3: 1.0 ng/μL; 4: 1.0×10^{-1} ng/μL; 5: 1.0×10^{-2} ng/μL.

图 5 PCR 反应灵敏度检测

Fig. 5 PCR reaction sensitivity



M: DL500 DNA marker; 1~8 表示核酸浓度, 1: 1.0×10^2 ng/μL; 2: 1.0×10^1 ng/μL; 3: 1 ng/μL; 4: 1.0×10^{-1} ng/μL; 5: 1.0×10^{-2} ng/μL; 6: 1.0×10^{-3} ng/μL; 7: 1.0×10^{-4} ng/μL; 8: 1.0×10^{-5} ng/μL。

M: DL500 DNA marker; 1~8 indicate nucleic acid concentrations, 1: 1.0×10^2 ng/μL; 2: 1.0×10^1 ng/μL; 3: 1 ng/μL; 4: 1.0×10^{-1} ng/μL; 5: 1.0×10^{-2} ng/μL; 6: 1.0×10^{-3} ng/μL; 7: 1.0×10^{-4} ng/μL; 8: 1.0×10^{-5} ng/μL.

图 6 RPA 反应灵敏度

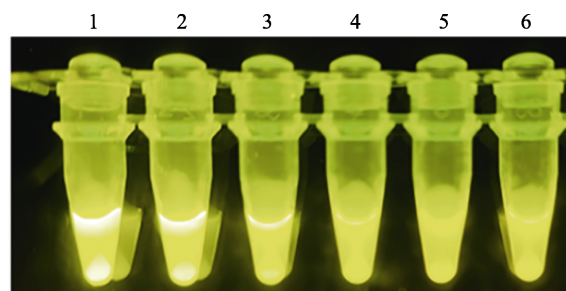
Fig. 6 RPA response sensitivity

可视化荧光检测结果显示, 1~3 号管可检测到显著荧光信号, 4~6 号管未检测到荧光信号, RPA 反应的可视化荧光检测灵敏度检测最低限度为 1.0×10^{-1} ng/μL (图 7)。

2.5 DNA 快速提取方法的探索

将粗提的 DNA 进行 RPA 反应, 再将反应产物纯化后进行琼脂糖凝胶电泳, 据琼脂糖凝胶电泳结果, 泳道 1 有明显的条带, 证明引物对红火蚁粗提的 DNA 成功扩增 (图 8)。该结果同时证明, 可用粗提 DNA 的方式代替 DNA 提取, 来达到减少检测时间, 提高检测效率的目的。

以粗提 DNA 代替试剂盒提取 DNA 过程, RPA 反应后向体系加入 1 μL SYBR GREEN 核酸染料, 在激发光源下, 管 1 有显著荧光现象 (图 9)。据该结果, 可用向体系中加入核酸染料在激发光源下观察是否有荧光现象代替琼脂糖凝胶电泳, 进而减少检测时间, 提高检测效率。

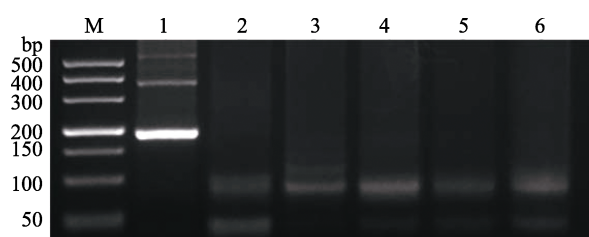


1~6 表示核酸浓度, 1: 1.0×10^2 ng/μL; 2: 1.0×10^1 ng/μL; 3: 1.0 ng/μL; 4: 1.0×10^{-1} ng/μL; 5: 1.0×10^{-2} ng/μL; 6: 1.0×10^{-3} ng/μL。

1~6 indicate nucleic acid concentrations, 1: 1.0×10^2 ng/μL; 2: 1.0×10^1 ng/μL; 3: 1.0 ng/μL; 4: 1.0×10^{-1} ng/μL; 5: 1.0×10^{-2} ng/μL; 6: 1.0×10^{-3} ng/μL.

图 7 荧光反应灵敏度

Fig. 7 Fluorescence reaction sensitivity

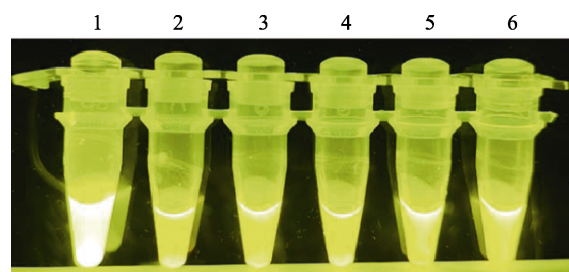


M: DL500 DNA marker; 1: 红火蚁; 2: 热带火蚁; 3: 法老小家蚁; 4: 广大头蚁; 5: 细纹毛切叶蚁; 6: 迈氏毛切叶蚁。

M: DL500 DNA marker; 1: *Solenopsis invicta*; 2: *S. geminata*; 3: *Monomorium pharaonis*; 4: *Pheidole megacephala*; 5: *Trichomyrmex destructor*; 6: *T. mayri*.

图 8 DNA 快速提取结果

Fig. 8 Results of rapid DNA extraction



1: 红火蚁; 2: 热带火蚁; 3: 法老小家蚁; 4: 广大头蚁; 5: 细纹毛切叶蚁; 6: 迈氏毛切叶蚁。

1: *Solenopsis invicta*; 2: *S. geminata*; 3: *Monomorium pharaonis*; 4: *Pheidole megacephala*; 5: *Trichomyrmex destructor*; 6: *T. mayri*.

图 9 现场检测效果

Fig. 9 On-site testing effect

3 讨论

红火蚁作为一种适应能力极强、危害严重的入侵害虫, 已引起全球范围的高度关注^[24]。红火蚁通过人类活动、苗木及土壤等途径传播扩散, 全球诸多地区均存在红火蚁入侵的潜在风险, 随着经济贸易全球化, 世界各国之间贸易往来频繁, 增加了红火蚁通过人类活动随交通工具进行传播

的风险。红火蚁一旦定殖, 红火蚁对农业、环境、城市基础设施及人类健康都会造成严重危害。目前检疫仍是预防红火蚁入侵最有效的手段, 国内外对红火蚁检疫工作越来越重视, 快速、准确的分子检测技术对红火蚁的早期防控至关重要。本研究开发了一种基于 RPA 技术的红火蚁可视化检测方法, 快速高效、简便易行, 灵敏准确, 对于防控红火蚁的进一步扩散具有重要的应用价值。

RPA 检测为红火蚁分子鉴定提供了新的方式, 相较于 DNA 条形码、免疫检测法、LAMP 等方法, RPA 检测时间更短, 灵敏度更高, 操作更简便, 无需仪器即可完成, 适用于各个场景, 为其他膜翅目害虫的分子鉴定提供了可借鉴的技术支持。现阶段 RPA 等温扩增技术已被广泛应用于病原菌和病毒的快速检测, 但在昆虫的鉴定和检疫中, 应用案例较少。PRITI 等^[23]建立了基于 RPA 反应的棕榈蓟马快速检测方法, 是 RPA 等温扩增在昆虫的检测与检疫的首次应用, 该方法无需 PCR 仪等设备即可在 30 min 内完成检测, 仅通过观察反应前后指示剂颜色变化就能判断反应结果; LEWALD 等^[25]基于 RPA 技术结合 Cas12a, 建立了番茄潜叶蛾 (*Phthorimaea absoluta*) 的快速检测方法, 该方法仅需 0.1 ng 的 DNA 作为模板即可完成扩增, 且仅需简单的紫外激发光源就能判断反应结果, 方法简便对操作人无知识储备要求; SHASHANK 等^[26]结合了 RPA 和 CRISPR, 相比实时荧光定量 PCR, RPA 反应时间更短, 灵敏度更高, 对番茄茎麦蛾、番茄潜叶蛾和斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 准确性达到了 100%。ZENG 等^[27]建立的谷斑皮蠹 (*Trogoderma granarium*) RPA 和 CRISPR/Cas12a 快速可视化检测, 能够在 40 min 完成对目标的检测, 灵敏度达到了 1.0×10^{-1} ng/ μ L, 王雅娜等^[28]建立的基于 RPA-CRISPR/Cas12a 的美国白蛾可视化快速检测通过 RPA 扩增目标序列, 结合 CRISPR 检测技术并对反应条件进行优化, 最终该体系灵敏度可检测的最低限度为 1.0×10^{-1} ng/ μ L, 检测体系在 30 min 内即可实现对害虫的现场快速、可视化、精准鉴定。

为有效防控红火蚁, 在检疫中快速、准确地鉴定红火蚁, 本研究对红火蚁和近缘种和近似种的蚂蚁通过 RPA 反应对目标序列扩增, 实现对红火蚁的快速鉴定。为满足在野外以及海关口岸等场景下快速检测的目的, 应精简反应所需设备与流程。RPA 反应所需温度和人体温接近, 将反应

的试管握在手中 20 min 代替 PCR 仪或在 37 °C 便携式金属浴中加热, 皆可完成 RPA 反应。在现场检测场景中, 若无凝胶成像系统, 则无法观察琼脂糖凝胶电泳的结果, 同时琼脂糖凝胶电泳耗时较长, 不符合现场检测简便性这一重要原则, 故采取使用荧光染料作为反应终点的指示剂代替琼脂糖凝胶电泳过程。成功扩增的核酸被核酸染料染色, 在激发光源下, 有显著荧光现象。反应后在蓝光或紫外灯等激发光源下有显著荧光现象, 灵敏度约为 1.0×10^{-1} ng/ μ L, 时间比 RPA 结合琼脂糖凝胶电泳减少了 30 min, 比 LAMP 反应减少了 60 min。该检测方法经多次重复检验, 重复性良好, 且鉴定结果实现可视化, 适用场景包括海关口岸、田间以及缺少实验设备的地方, 该方法在发现残缺虫体, 难以区分时, 仍可以准确鉴定, 同时该方法使用简便, 非专业人员仍可按方法准确鉴别。新方法为红火蚁的检疫防控提供了技术支持, 同时为其他检疫害虫的快速检测提供了经验。

本研究相比形态学鉴定、DNA 条形码、LAMP 等方法, 有检测时间更短, 灵敏度更高等优点。但是同时目前该方法仍存在不足之处, 该检测体系有待进一步改进。包括指示剂的改良, 羟基萘酚蓝作为指示剂相比荧光染料更加简便, 无需激发光源即可观察检测结果, 但在该方法中测试反应前后颜色变化不明显, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] CALLCOTT A M A, COLLINS H L. Invasion and range expansion of imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae) in North America from 1918—1995[J]. Florida Entomologist, 1996, 79(2): 240-251.
- [2] GLORIA M L, CÉLINE B, CLEO B, ELSA B, PIERO G, DANIEL S, FRANCK C. The 100th of the world's worst invasive alien species[J]. Biological Invasions, 2014, 16: 981-985.
- [3] ASCUNCE M S, YANG C C, OAKLEY J, CALCATERRA L, WU W J, SHIH C J, GOUDET J, ROSS K G, SHOEMAKER D. Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*[J]. Science, 2011, 331(6020): 1066-1068.
- [4] 陆永跃, 曾玲, 许益鏊, 王磊. 外来物种红火蚁入侵生物学与防控研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 149-160.
- LU Y Y, ZENG L, XU Y J, WANG L. Research progress of invasion biology and management of red imported fire ant[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(5):

- 149-160. (in Chinese)
- [5] ROEDER K A, PENUELA USECHE V, LEVEY D J, RESASCO J. Testing effects of invasive fire ants and disturbance on ant communities of the longleaf pine ecosystem[J]. *Ecological Entomology*, 2021, 46(4): 964-972.
 - [6] MCGLYNN T P. The worldwide transfer of ants: geographical distribution and ecological invasions[J]. *Journal of Biogeography*, 1999, 26(3): 535-548.
 - [7] MORRISON L W. Long-term impacts of an arthropod community invasion by the imported fire ant, *Solenopsis invicta*[J]. *Ecology*, 2002, 83(8): 2337-2345.
 - [8] GOTELLI N J, ARNETT A E. Biogeographic effects of red fire ant invasion[J]. *Ecology Letters*, 2000, 3(4): 257-261.
 - [9] 曾玲, 陆永跃, 何晓芳, 张维球, 梁广文. 入侵中国大陆的红火蚁的鉴定及发生为害调查[J]. *昆虫知识*, 2005(2): 144-148, 230-231.
ZENG L, LU Y Y, HE X F, ZHANG W Q, LIANG G W. Identification of red imported fire ant *Solenopsis invicta* to invade Chinese mainland and infestation in Wuchuan Guangdong[J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2005, 42(2): 144-148, 230-231. (in Chinese)
 - [10] 郑华, 赵宇翔. 外来有害生物红火蚁风险分析及防控对策[J]. *林业科学研究*, 2005, 18(4): 479-483.
ZHENG H, ZHAO Y X. Alien pest risk analysis and control countermeasure of *Solenopsis invicta* Buren[J]. *Forest Research*, 2005, 18(4): 479-483. (in Chinese)
 - [11] VALLES S M, STRONG C A, CALLCOTT A M A. Development of a lateral flow immunoassay for rapid field detection of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408: 4693-4703.
 - [12] NAKAJIMA N, SAKAMOTO Y, GOKA K. Rapid detection of the red fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Applied Entomology and Zoology*, 2019, 54: 319-322.
 - [13] LI J, MACDONALD J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 64: 196-211.
 - [14] DENG H, GAO Z. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 853: 30-45.
 - [15] KIM J, EASLEY C J. Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications[J]. *Bioanalysis*, 2011, 3(2): 227-239.
 - [16] DE PAZ H D, BROTONS P, MUÑOZ-ALMAGRO C. Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2014, 14(7): 827-843.
 - [17] ALMASSIAN D R, COCKRELL L M, NELSON W M. Portable nucleic acid thermocyclers[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(22): 8769-8798.
 - [18] 孙魁, 邢微微, 徐东刚. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. *军事医学*, 2015, 39(10): 802-804, 807.
SUN K, XING W W, XU D G. Advances in recombinase polymerase amplification[J]. *Military Medical Sciences*, 2015, 39(10): 802-804, 807. (in Chinese)
 - [19] LILLIS L, LEHMAN D, SINGHAL M C, CANTERA J, SINGLETON J, LABARRE P, TOYAMA A, PIEPENBURG O, PARKER M, WOOD R, OVERBAUGH J, BOYLE D S. 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): 108-189.
 - [20] SHEN F, DAVYDOVA E K, DU W, KREUTZ J E, PIEPENBURG O, ISMAGILOV R F. Digital isothermal quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on SlipChip[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(9): 3533-3540.
 - [21] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, ARMES N A. DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(7): e204.
 - [22] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, LUTZ R, VRIJENHOEK R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
 - [23] PRITI, JANGRA S, BARANWAL V K, DIETZGEN R G, GHOSH A. A rapid field-based assay using recombinase polymerase amplification for identification of *Thrips palmi*, a vector of tospoviruses[J]. *Journal of Pest Science*, 2021, 94: 219-229.
 - [24] XU Y J, VARGO E L, TSUJI K, WYLIE R. Exotic ants of the Asia-Pacific: invasion, national response, and ongoing needs[J]. *Annual Review of Entomology*, 2022, 67(1): 27-42.
 - [25] LEWALD K M, SONG W, EWEIS-LABOLLE D, TRUONG C, GODFREY K E, CHIU J C. Probe-based quantitative PCR and RPA-Cas12a molecular diagnostics for detection of the tomato pest *Phthorimaea absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2023, 116(3): 993-1001.
 - [26] SHASHANK P R, PARKER B M, RANANAWARE S R, PLOTKIN D, COUCH C, YANG L G, NGUYEN L T, PRASANNAKUMAR N R, BRASWELL W E, JAIN P K, KAWAHARA A Y. CRISPR-based diagnostics detects in-

vasive insect pests[J]. Molecular Ecology Resources, 2023, 24(1): e13881.

[27] ZENG L, ZHENG S, STEJSKAL V, OPIT G, AULICKY R, LI Z. New and rapid visual detection assay for *Trogoderma granarium* everts based on recombinase polymerase amplification and CRISPR/Cas12a[J]. Pest Management Science, 2023, 79(12): 5304-5311.

[28] 王雅娜, 于艳雪, 田茜, 张柳, 李红卫, 杨硕, 翟俊峰. 基于 RPA-CRISPR/Cas12a 的美国白蛾可视化快速检测新方法[J]. 环境昆虫学报, 2024, 46(5): 1051-1058.

WANG Y N, YU Y X, TIAN Q, ZHANG L, LI H W, YANG S, ZHAI J F. New and rapid visual detection assay for *Hyphantria cunea* Drury based on recombinase polymerase amplification and CRISPR/Cas12a[J]. Journal of Environmental Entomology, 2024, 46(5): 1051-1058. (in Chinese)