·实验技术及其应用·

甲型 H1N1 流感病毒单管式 RT-RPA/CRISPR 快速检测方法的建立与评价

张朓[1],倪丹妮[1],黄青徽[1],郝玉通[2],刘启军[3],汪川[4],杨瑞[4],甘善萍[4],黄为[5,6],王文斟[5,6],文海燕[1]
1.重庆国际旅行卫生保健中心(重庆海关口岸门诊部),重庆 401147;2.重庆海关;3.重庆海关技术中心;
4.四川大学华西公共卫生学院 / 华西第四医院;5.重庆市疾病预防控制中心(重庆市预防医学科学院);
6.高致病性病原微生物重庆市重点实验室

摘要:目的 建立一种逆转录重组酶聚合酶扩增(reverse transcription recombinase polymerase amplification,RT-RPA)与成簇的规则间隔短回文重复序列及其相关蛋白 12a 系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 12a system,CRISPR/Cas12a)联合的单管检测方法(one-tube assay based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a,OTRRC)。**方法** 建立并优化甲型 H1N1 流感病毒 OTRRC 检测流程,根据结果读取方式不同,分别构建基于实时荧光信号的 OTRRC-FD(OTRRC fluorescence detection)方法和基于侧向层析试纸的 OTRRC-LFIA(OTRRC lateral flow immunoassay)检测方法。以甲型 H1N1 流感病毒质粒和假病毒为模板,评估两种方法的灵敏度及特异性,并进一步将方法应用于临床样本以验证临床检测效能。**结果** OTRRC-FD 法 20 min 内可检测 2.8×10^{-1} copies/μl 标准质粒模板,30 min 内可检测 1.71×10^{0} copies/μl 假病毒模板;OTRRC-LFIA 法 25 min 内可检测 10^{1} copies/μl 标准质粒模板,35 min 内可检测 10^{1} copies/μl 假病毒模板。且两种方法均未与 SARS-CoV-2、IBV-Victoria 系、RSV 产生交叉反应。真实样本检测中,OTRRC-FD 和 OTRRC-LFIA 方法的灵敏度分别为 95%和 90%,特异性均为 100%,与实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)结果一致性分别为 97.19%和 94.56%。**结论** 成功建立了甲型 H1N1 流感病毒 OTRRC 法,并通过侧向层析试纸条实现检测结果可视化,该方法具有快速、高灵敏度和良好特异性的优点,并在临床样本检测中表现出良好的适用性,检测结果与金标准 RT-qPCR 一致较好,展现了作为高效 POCT 工具的潜力。

关键词:甲型 H1N1 流感病毒;重组酶聚合酶扩增;CRISPR/Cas12a;侧向层析试纸
中图分类号:R373.13 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-8507(2026)11-2060-09
DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202512452

Establishment and evaluation of a one-tube RT-RPA/CRISPR assay for rapid detection of influenza A (H1N1) virus

ZHANG Tiao*, NI Dan-ni, HUANG Qing-hui, HAO Yu-tong, LIU Qi-jun, WANG Chuan, YANG Rui, GAN Shan-ping, HUANG Wei, WANG Wen-zhen, WEN Hai-yan
Chongqing International Travel Health Care Center (Chongqing Customs Port Clinic), Chongqing 401147, China

Abstract: Objective To establish a one-tube assay based on reverse transcription recombinase polymerase amplification (RT-RPA) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein system (CRISPR/Cas12a) (OTRRC). **Methods** An OTRRC-based detection workflow for influenza A H1N1 virus was established and optimized. According to different signal readout modes, two detection formats were developed, including fluorescence-based detection (OTRRC-FD) and lateral flow immunoassay-based detection (OTRRC-LFIA). The sensitivity and specificity of both methods were systematically evaluated using plasmids and pseudoviruses as templates, followed by validation using clinical samples. **Results** The OTRRC-FD method detected as low as 2.8×10^{-1} copies/μl of standard plasmid template within 20 min and 1.71×10^{0} copies/μl of pseudovirus template within 30 min. The OTRRC-LFIA method detected 10^{1} copies/μl of standard plasmid template within 25 min and 10^{1} copies/μl of pseudovirus template within 35 min. No cross-reactivity was observed with SARS-CoV-2, IBV-Victoria or respiratory syncytial virus (RSV). In clinical sample testing, the sensitivities of the OTRRC-FD and OTRRC-LFIA methods were 95% and 90%, respectively, with a specificity of 100% for both methods. The agreements with

基金项目:海关总署科研项目(2024HK263);高致病性病原微生物重庆市重点实验室开放课题 2025 年(2025ZDSYS010);重庆市市级公共卫生重点专(学)科建设项目
作者简介:张朓(1976—),女,本科,副主任医师,研究方向:口岸卫生检疫技术研究
通信作者:文海燕,E-mail:wenhaiyan2001@163.com

real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were 97.19% for OTRRC-FD and 94.56% for OTRRC-LFIA. **Conclusion** In this study, an OTRRC method for the detection of influenza A H1N1 virus was successfully established, and visual readout was achieved using lateral flow strips. This method features rapid detection, high sensitivity, and good specificity, and demonstrated favorable applicability in clinical sample testing. The detection results showed good agreement with the gold standard RT-qPCR, highlighting the potential of this assay as an efficient point-of-care testing (POCT) tool.

Keywords: H1N1 influenza virus; Recombinant polymerase amplification; CRISPR/Cas12a; Lateral flow immunoassay

甲型 H1N1 流感病毒是一种单股负链 RNA 病毒，其基因组易发生变异、宿主范围广、传染性强，是全球范围内急性呼吸道感染的重要病原之一[1-2]。感染早期常表现为发热、咳嗽、咽痛等非特异性症状，与其它常见呼吸道病毒（其他流行性感冒病毒、呼吸道合胞病毒和严重急性呼吸系统综合症冠状病毒 2 型）感染临床表现相似，难以通过症状进行鉴别诊断[3-5]。并且，感染甲型 H1N1 流感病毒后可能进展为重症肺炎或引发并发症，因此，及时、准确的病原学检测对早期临床诊疗和感染防控具有重要意义[6-7]。

目前，临床实验室针对甲型 H1N1 流感病毒的主要检测方法依赖实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR）及其衍生的核酸检测平台，该类方法具有灵敏度和特异性高的优势，被广泛用于常规诊断和监测[8]。然而，此类检测通常对仪器设备和实验室条件要求较高，在基层医疗机构、现场筛查或资源受限环境中的应用仍存在一定限制。近年来，等温核酸扩增（isothermal nucleic acid amplification，INA）技术因无需热循环、检测时间短且可在实验室、现场检测和家庭自检等多种应用场景展现，已在许多病原体核酸检测方案中突显优势[9-10]。针对甲型 H1N1 流感病毒，现有研究基于环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）或重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）等技术，结合荧光检测或侧向层析试纸条，实现快速核酸检测，其中部分研究提出了“单管反应”或“一步法检测”的实现策略[11-13]。

成簇的规则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）因其高度特异的序列识别能力及可触发的反式切割活性，被广泛应用于核酸检测领域[14-16]。同时，RPA 扩增条件与 Cas12a 反应体系在温度及缓冲体系方面具有良好的兼容性，使得二者能够联合构建一体化核酸检测系统[17]。在该联合体系中，RPA 首先实现目标序列的快速扩增，随后扩增产物被 CRISPR/Cas12a 复合物特异性识别并激活其反式切割活性，从而实现双重特异性识别及信号放大效应[18-19]。然而，现有许多 RPA-CRISPR 检测方法仍采用分管反应或扩增后开盖转移的模式，操作流程相对复杂，且存在扩增产物气溶胶污染风险，限制了其在现场即时检测（point-of-care testing，POCT）中的进一步应用[20-21]。

本研究在已有等温扩增及 CRISPR 检测研究的基础上，通过联合逆转录 RPA（reverse transcription RPA，RT-RPA）和 CRISPR/Cas12a，建立甲型 H1N1 流感病毒单管检测法（one-tube assay based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a，OTRRC）。在同一反应管内顺序完成核酸扩增与信号检测过程，避免反应体系在不同容器间转移或开盖操作，实现快速高效检测甲型 H1N1 流感病毒，并简化操作流程和降低交叉污染风险。同时，为拓展检测场景，本研究进一步将 OTRRC 体系与侧向层析免疫试纸（lateral flow immunoassay，LFIA）平台相结合。CRISPR/Cas12a 切割报告探针产生的产物可在 LFIA 试纸条上产生可视化显色信号，从而实现检测结果的裸眼判读[22]，使方法更加便捷和适合现场应用。

1　材料与方法

1.1　样本及病毒标准物质来源　20 例人甲型 H1N1 流感病毒、5 例新型冠状病毒（SARS-CoV-2）、5 例乙型流感病毒 Victoria 系（IBV-Victoria 系）和 5 例呼吸道合胞病毒（RSV）临床 RNA 样本来源于成都市疾病预防控制中心，均经 RT-qPCR 验证为阳性；灭活的甲型 H1N1 流感病毒、SARS-CoV-2 及 IBV-Victoria 系全基因组假病毒标准物质，以及包含 *N*、*M*、*L* 基因片段的 RSV 假病毒标准物质，均购于河南万佳标准物质研发中心。

1.2　试剂及耗材　标准质粒、引物、ssDNA 荧光探针及 crRNA 由上海生工生物工程股份有限公司合成。核酸提取试剂盒（QuickExtract DNA Extraction Solution）购于 LGC Biosearch Technologies（美国）。RPA 试剂盒购于 TwistDX™ Ltd.（英国），SuperScript™ IV 反转录酶和 DEPC 处理水购于 Thermo Fisher Scientific（美国），RNase H 酶、EnGen ® Lba Cas12a（Cpf1）核酸酶和 NEBuffer™ r2.1（10 ×）购于 New England Biolabs（美国）。CRISPR 核酸检测试纸条购于深圳易致生物科技有限公司。

1.3　检测原理及流程　OTRRC 法的检测流程及原理，见图 1。临床样本经核酸免提取释放剂 95℃孵育

5 min 后释放病毒 RNA，取 5 μl 裂解产物加入 RT-RPA 反应体系，在 37℃条件下进行逆转录与等温扩增，获得靶序列扩增产物。随后，通过瞬时离心使预先置于管盖内侧的 CRISPR/Cas12a 反应体系与 RPA 扩增产物混合，37℃孵育 10 min。Cas12a-crRNA 复合物特异性识别扩增产物并被激活，进而触发其反式切割活性，非特异性切割体系中的 ssDNA 报告探针，产生可检测信号。

根据检测信号的读取方式不同，分别建立基于荧光检测的 OTRRC-FD（OTRRC fluorescence detection）方法和基于侧向层析试纸的 OTRRC-LFIA（OTRRC lateral flow immunoassay）方法。OTRRC-LFIA 检测时，将试纸条插入反应体系，体系在毛细作用下迁移；未被 Cas12a 切割的探针可在质控线处被捕获形成条带，而被切割的探针则在检测线处聚集显色，从而实现检测结果的直观判读。

1.4　OTRRC 方法建立

1.4.1　靶基因筛选、RPA 引物设计和选择　从数据库 NCBI（网址：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）下载 IAV-H1N1 *M* 基因核苷酸序列并进行比对，设计标准质粒。使用 Primer Premier V5.0 软件设计甲型 H1N1 流感病毒的 3 对 RPA 正反向候选引物。见表 1。

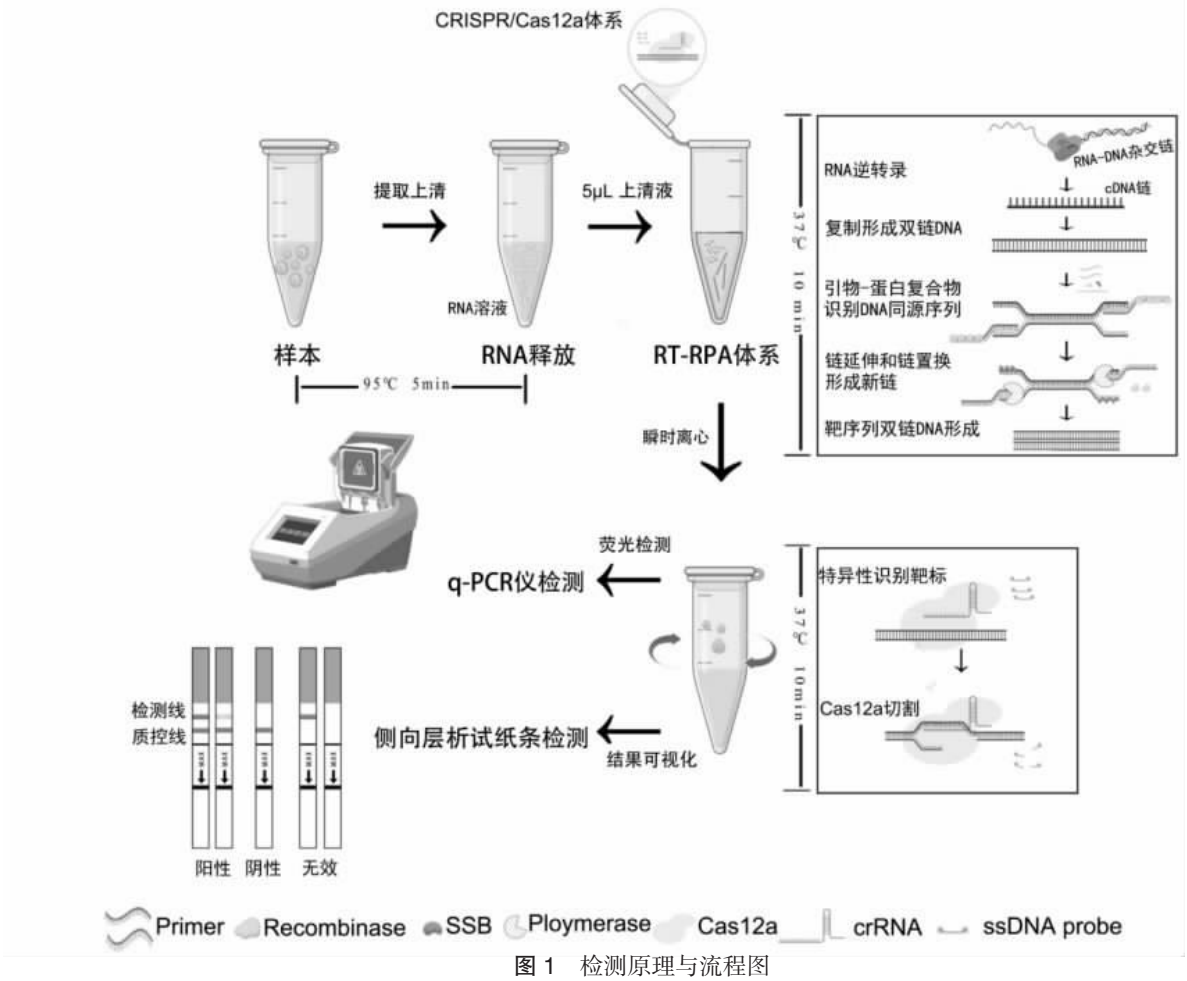


图 1　检测原理与流程图

Figure 1　Experimental principle and process

表 1　甲型 H1N1 流感病毒保守基因标准质粒及引物

Table 1　Standard plasmids and primers for conserved genes of influenza A (H1N1) virus

名称		序列（5'→3'）
甲型流感病毒 H1N1	*M* 基因质粒（PP633608.1）	catggaatggctaaagacaagaccaatcttgtcacctctgactaagggaattttaggatttgtgttcacgctcaccgtgcccagtgagcgaggactgcagcgtagacgctttgtccaaaatgccctaaatgggaatggggacccgaacaacatggatagagcagttaaactatacaagaagctcaaaagagaaataacgttccatggggccaaggaggtgtcactaagctattcaactggtgcacttgccagttgcatgggcctcatatacaacaggatgggaacagtgaccacagaagctgcttttggtctagtgtgtgccacttgtgaacagattgctgattcacagcatcggtctcacagacagatggctactaccaccatccactaatcaggcatgaaaacagaatggtgctggctagcactacggcaaaggctatggaacagatggctggatcgagtgaacaggcagcggaggccatggaggttgctaatcagactaggcagatggtacatgca
	F1/3	cgtagacgctttgtccaaaatgccctaaat
	F2	agcgtagacgctttgtccaaaatgccctaa
	R1/2	cagcttctgtggtcactgttcccatcctgt
	R3	aaagcagcttctgtggtcactgttcccatc

1.4.2　RPA 引物筛选　以浓度为 2.8×10^5 copies/μl 的甲型 H1N1 标准质粒为模板，对候选 RPA 引物对进行筛选。按照 RPA Basic kit 说明书配制反应体系，阳性对照加入 1.25 μl 标准质粒，阴性对照以等体积 DEPC 处理水代替标准质粒。反应体系混匀后，于 39 ℃条件下孵育 20 min 完成扩增。扩增产物经酚氯仿法纯化后，通过琼脂糖凝胶电泳分析效果。

1.4.3　crRNA 及 ssDNA 探针设计合成　根据 RPA 引物筛选出的最佳引物组，确定扩增目的片段序列，按照 CRISPR/Cas12a crRNA 设计原则，利用 CHOPCHOP 网站（http://chopchop.cbu.uib.no/）设计 crRNA 以及 5'和 3'端分别修饰有荧光基团和淬灭基团的单链 DNA（ssDNA）探针。见表 2。

表 2　crRNA 和 ssDNA 探针

Table 2　crRNA and ssDNA probes

名称	序列（5'→3'）
crRNA	uaauuucuacuaaguguagaugccccauggaacguuauuuc
ssDNA	FAM-ttattatt-BHQ1

1.4.4　标准检测程序　OTRRC 法标准检测程序为：35 μl 检测体系由 A（管底）和 B（管盖内）两部分组成。其中，A 部分为 25 μl RPA 扩增体系（正反向引物各 1.00 μl、半粒 RPA 冻干粉、1.25 μl 质粒 DNA、14.75 μl 复水缓冲液、DEPC 处理水 5.75 μl、1.25 μl MgOAc），B 部分为 10 μl CRISPR/Cas12a 切割体系［3.5μl 1 μM EnGen® Lba Cas12a　(Cpf1)、3.5 μl 10× NEBuffer™ r2.1、0.35 μl 10 μM crRNA、1.05 μl 10 μM ssDNA、DEPC 处理水 5.1 μl］。37℃条件下孵育 10 min，完成 RPA 扩增，通过瞬时离心将管盖内侧的 CRISPR/Cas12a 切割体系离心至管底与 RPA 扩增产物充分混合，置于 qPCR 仪上 37℃反应 30 min，每间隔 30 s 采集一次荧光信号。RNA 检测体系中，以 RNA 代替标准质粒，反应体系中加入 0.24 μl SuperScriptTM IV 反转录酶，0.48 μl RNase H 酶，0.5 μl DTT，其余条件均与上述一致。

1.4.5　条件优化　在标准检测程序下按照控制单一变量原则对引物浓度、CRISPR/Cas12a 体系、反应温度及 RPA 扩增时间进行优化。引物浓度优化设置 4 组不同浓度的引物组（每组分别设置阴性对照组），进行三次重复实验，测量各组荧光信号强度。CRISPR/Cas12a 体系优化设置不同 Cas12a/crRNA 比例（1∶1、1∶2、2∶1）、不同 Cas12a 浓度（30、50、70、100 nM）、不同 ssDNA 探针浓度（100、200、300 nM）条件（每组分别设置阴性对照组），进行三次重复实验，测量各组荧光信号强度。RPA 反应温度为 37℃～42℃，因此反应温度优化设置 37℃、39℃、42℃三个不同反应温度（每组分别设置阴性对照组），进行三次重复实验，测量各组荧光信号强度。RPA 扩增时间优化设置 0、2、4、6、8、10 和 12 min，7 组 RPA 扩增时间条件（每组分别设置阴性对照组），进行三次重复实验，测量各组荧光信号强度。

1.4.6　OTRRC-LFIA 反应体系制备与结果判断　按照 1.4.4 配制 35 μl RT-RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系，37℃孵育 15 min，实现 RPA 扩增。随后瞬时离心，并充分混合 RPA 扩增产物与 CRIPSR/Cas12a，干式恒温器 37℃孵育 10 min。反应完成后，体系中加入 25 μl DEPC- 处理水进行稀释，样品垫端朝下插入侧向层析试纸条（液面不可超过 Max 线），常温下放置 5 min 后取出，试纸条平放于桌面判读结果。阴性：质控线有条带，检测线无条带。阳性：检测线和质控线均有条带。无效：质控线无条带。

1.4.7　灵敏度及特异性分析

1.4.7.1　以质粒为模板的灵敏度检测　以 2.8×10^4、2.8×10^3、2.8×10^2、2.8×10^1、2.8×10^0、2.8×10^{-1} copies/μl 的标准质粒为模板，按照建立的 OTRRC 法标准流程制备反应体系，分析 OTRRC-FD 和 OTRRC-LFIA 以甲型 H1N1 流感病毒质粒为模板的灵敏度。

1.4.7.2　以假病毒为模板的灵敏度检测　将免核酸提取释放剂 QuickExtract DNA Extraction Solution 与假病毒各 200 μl，等体积混匀，离心后放置于干式恒温器 95℃条件下孵育 5min 以释放病毒 RNA，得到 1.71×10^{-1}、1.71×10^0、1.71×10^1 copies/μl 3 个浓度的甲型 H1N1 流感假病毒 RNA。按照建立的 OTRRC 法标准流程制备反应体系，分析 OTRRC-FD 和 OTRRC-LFIA 以甲型 H1N1 流感病毒假病毒为模板的灵敏度。

1.4.7.3　特异性分析　分别对甲型 H1N1 流感以及引起相同或相似临床症状的呼吸道感染病毒的 4 个病原体（IAV-H1N1、SARS-CoV-2、IBV-Victoria 系、RSV）的假病毒模板（10^2 copies/μl）进行测量，阴性组以 DEPC 处理水代替假病毒。按照建立的 OTRRC 法标准流程制备反应体系，分析 OTRRC-FD 和 OTRRC-LFIA 的特异性。

1.5　临床样本验证　以 20 例甲型 H1N1 流感病毒、5 例新型冠状病毒、5 例乙型流感病毒 Victoria 系和 5 例呼吸道合胞病毒临床样本，采用 OTRRC-FD 法与 OTRRC-LFIA 法进行测定，并评价与核酸检测金标准 RT-qPCR 检测结果的一致性。

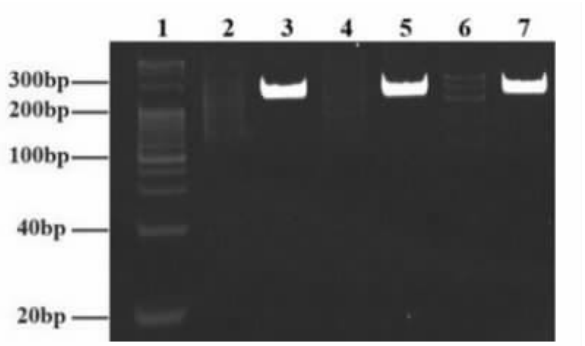
1.6　数据处理和统计分析　实验中每组均进行 3 次独立重复实验，荧光强度稳定时（10 min 时）的荧光信号平均值 ± 3 倍标准差，误差线代表三次重复实验的

标准差。使用 SPSS 25.0 进行数据处理及统计学分析，进行 t 检验和单因素方差分析分析各实验组与阴性对照组间差异的统计学意义；配对 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法分析检测方法与“金标准”RT-qPCR 检出率是否存在差异，检验水准 α=0.05，差异具有统计学意义，并使用 Origin 2021 作图。

2　结　果

2.1　RPA 引物筛选　RPA 扩增引物筛选电泳结果见图 2。甲型 H1N1 流感病毒的三对候选 RPA 引物实验组（F1R1、F2R2、F3R3）均成功扩增出与预期靶标片段大小相符的目的条带（图 2 泳道 3、5、7），F2R2 候选引物阴性对照组无非特异性扩增条带。因此，选择 F2R2 引物对为 RPA 引物。

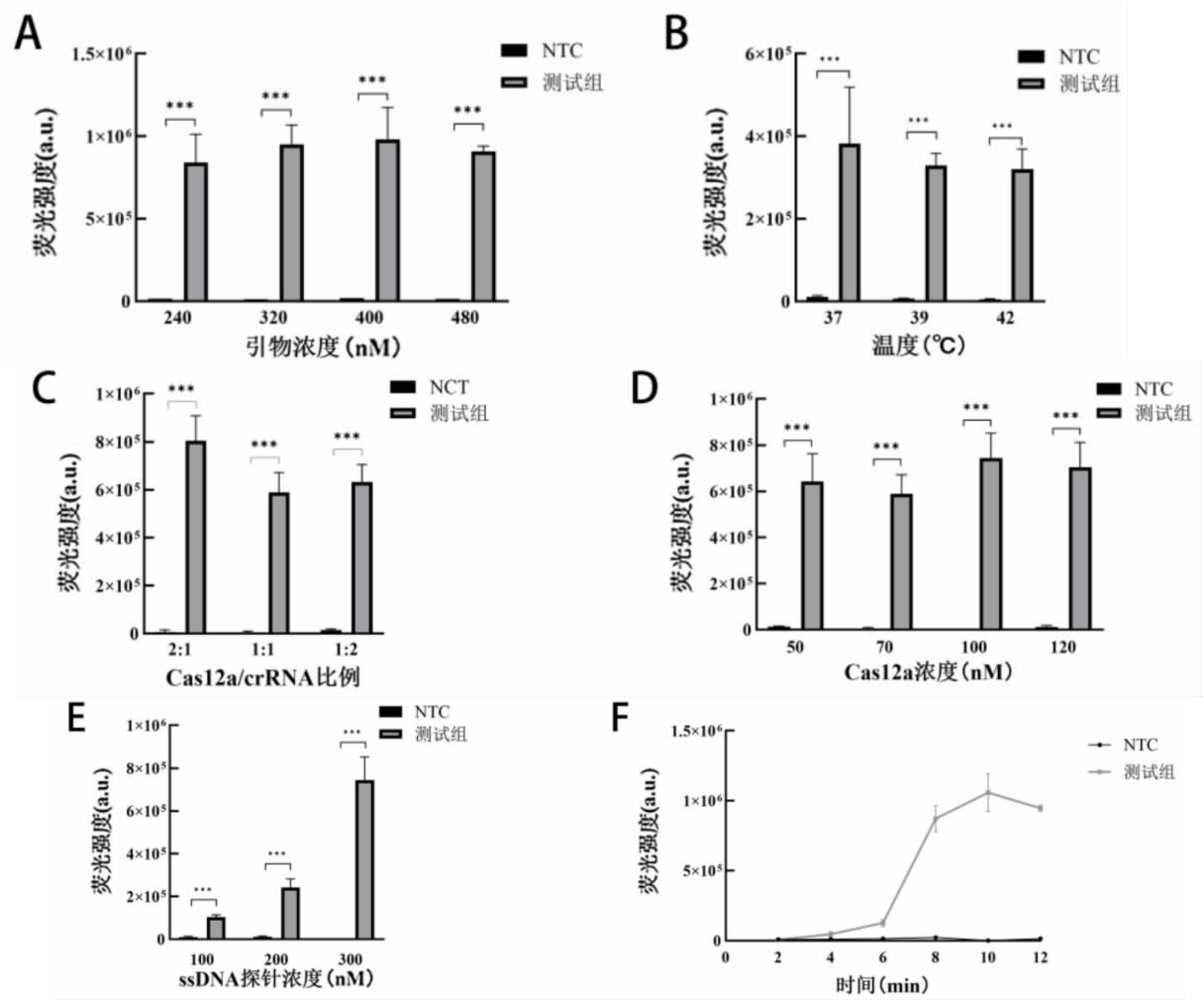
2.2　条件优化　条件优化结果如图 3 所示。RPA 引物浓度为 480 nM 时最佳，见图 3A；体系最优反应温度为 42℃，见图 3B；Cas12a 与 crRNA 比例为 2:1 时最优，见图 3C；ssDNA 荧光探针最优浓度为 300 nM，见图 3D；Cas12a 浓度为 100 nM 时均为最佳，见图 3E；荧光值 10 min 左右增长到平台期，10 min 为 RPA 扩增效率最佳的时间，见图 3F。



注：泳道 1 为 20bp DNA Ladder；泳道 2/3 为 F1R1 NTC 组、扩增组；泳道 4/5 为 F2R2 NTC 组、扩增组；泳道 6/7 为 F3R3 NTC 组、扩增组。

图 2　引物筛选结果（12%Native-PAGE 电泳）

Figure 2　Primer screening results (12% Native-PAGE electrophoresis)



注：A 为 RPA 引物浓度优化结果；B 为反应温度优化结果；C 为 Cas12a 与 crRNA 比例优化结果；D 为 ssDNA 荧光探针浓度优化结果；E 为 Cas12a 浓度优化结果；F 为 RPA 扩增时间优化结果；*** 表示 P<0.001，** 表示 P<0.001，* 表示 P<0.05，差异有统计学意义；ns 表示 P>0.05，差异不具有统计学意义。

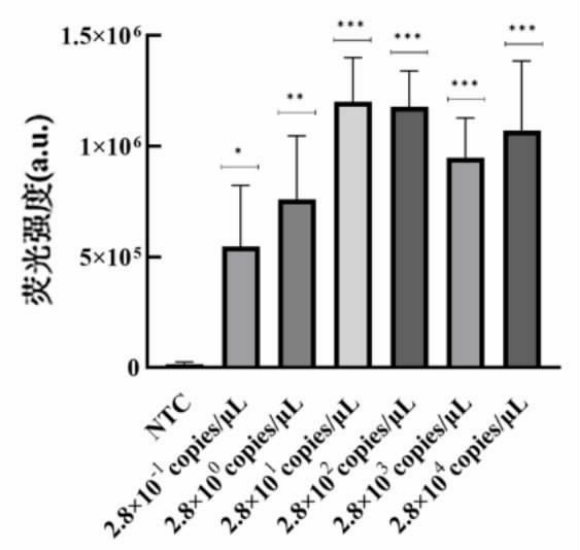
图 3　条件优化结果

Figure 3　Conditional optimization results

2.3　灵敏度检测及特异性分析

2.3.1　以质粒为模板的灵敏度检测

2.3.1.1　OTRRC-FD 法　以质粒为模板进行灵敏度分析。低至 2.8×10^{-1} copies/μl 甲型 H1N1 流感病毒可被优化后 OTRRC-FD 法所检测，见图 4；低至 2.8×10^{1} copies/μl 甲型 H1N1 流感病毒可被优化后 OTRRC-LFIA 法所检测，见图 5。



注：*** 表示 $P<0.001$；** 表示 $P<0.001$；* 表示 $P<0.05$；差异有统计学意义；ns 表示 $P>0.05$；差异不具有统计学意义。

图 4　以质粒为模板的 OTRRC-FD 法灵敏度分析

Figure 4　Sensitivity analysis of OTRRC-FD with a plasmid as template



注：图中红色箭头所指为肉眼可观察的检测线最低浓度。

图 5　以质粒为模板的 OTRRC-LFIA 法灵敏度分析

Figure 5　Sensitivity analysis of the OTRRC-LFIA with a plasmid as template

2.3.1.2　以假病毒为模板的灵敏度检测和特异性分析　以假病毒为模板分析 OTRRC 法灵敏度。低至 1.71×10^{0} copies/μl 的甲型 H1N1 流感病毒 RNA 可被荧光法所检测，结果见图 6。同时，本研究构建方法仅检测到目标病原体（甲型 H1N1 流感病毒反应终点荧光信号强烈），其他三种病毒检测荧光信号值与阴性组荧光信号值的差异无统计学意义，结果见图 7。

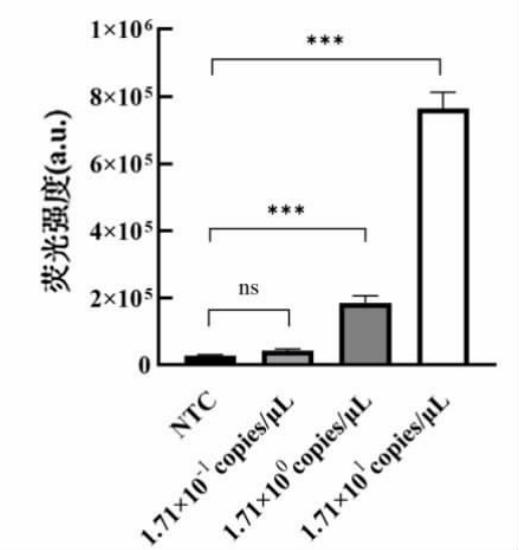


图 6　以假病毒粒为模板的 OTRRC-FD 法灵敏度分析

Figure 6　Sensitivity analysis of OTRRC-FD using pseudoviruses as templates

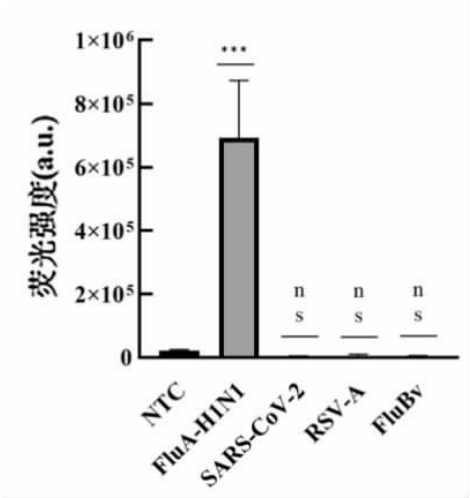
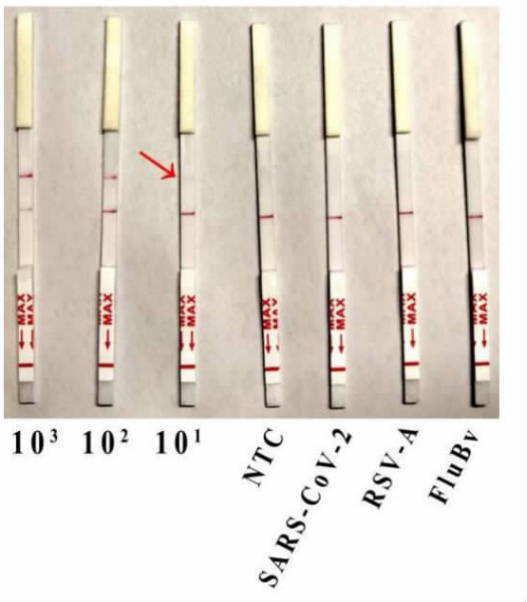


图 7　以假病毒为模板的 OTRRC-FD 法特异性分析

Figure 7　Specificity analysis of OTRRC-FD using pseudoviruses as templates

采用 OTRRC-LFIA 法检测方法灵敏度，低至 10^{1} copies/μl 的甲型 H1N1 流感假病毒可被检测。并且，本研究建立的甲型 H1N1 流感病毒 OTRRC-LFIA 法特异性良好，与其他非目标呼吸道症感染病毒无交叉反应。结果见图 8。



注:图中红色箭头所指为肉眼可观察的检测线最低浓度。

图 8　以假病毒为模板的 OTRRC–LFIA 法灵敏度与特异性分析

Figure 8　Sensitivity and specificity analysis of the OTRRC–LFIA using pseudovirus as templates

2.4　临床样本验证　临床样本性能评价结果如图 9 所示,OTRRC–FD 法与 OTRRC–LFIA 法对甲型 H1N1 流感病毒检测真实样本的灵敏度分别为 95% 和 90%;两种方法特异性均为 100%;与 RT–qPCR 一致性分别为 97.19%和 94.56%。

3　讨　论

近年来,等温扩增技术因其无需热循环、反应快速等优势,适用于无需复杂仪器条件下的快速初筛场景,逐渐成为 POCT 领域的重要发展方向[23]。本研究为解决甲型 H1N1 流感病毒核酸检测在简化流程与降低操作风险方面的实际需求,建立了一种基于 RT–RPA 与 CRISPR/Cas12a 的单管式检测策略(OTRRC)。该方法将 RT–RPA 与 CRISPR/Cas12a 体系进行组合,并采用单管式反应,在同一反应管内顺序完成以核酸扩增与特异性识别。其中,运用 RPA 技术实现在恒温条件下即可快速扩增;CRISPR/Cas12a 体系通过 crRNA 引导序列对靶基因的特异性识别,进一步提高了检测特异性,在一定程度上弥补了等温扩增技术可能存在的非特异扩增问题。双重识别机制极大地提高了方法特异性,实验结果也显示该方法与 SARS–CoV–2、IBV–Victoria 系及 RSV 等常见呼吸道病毒无交叉反应。OTRRC–FD 与 OTRRC–LFIA 的最低检出限分别为 2.8×10^{-1} copies/μl 和 10^{1} copies/μl,灵敏度较高。两种方法灵敏度差异可能与终点判读方式有关。然而,尽管 LFIA 灵敏度相对较低,但其无需仪器支持即可达到 10^{1} copies/μl 检测水平,仍具有较好的现场应用价值。

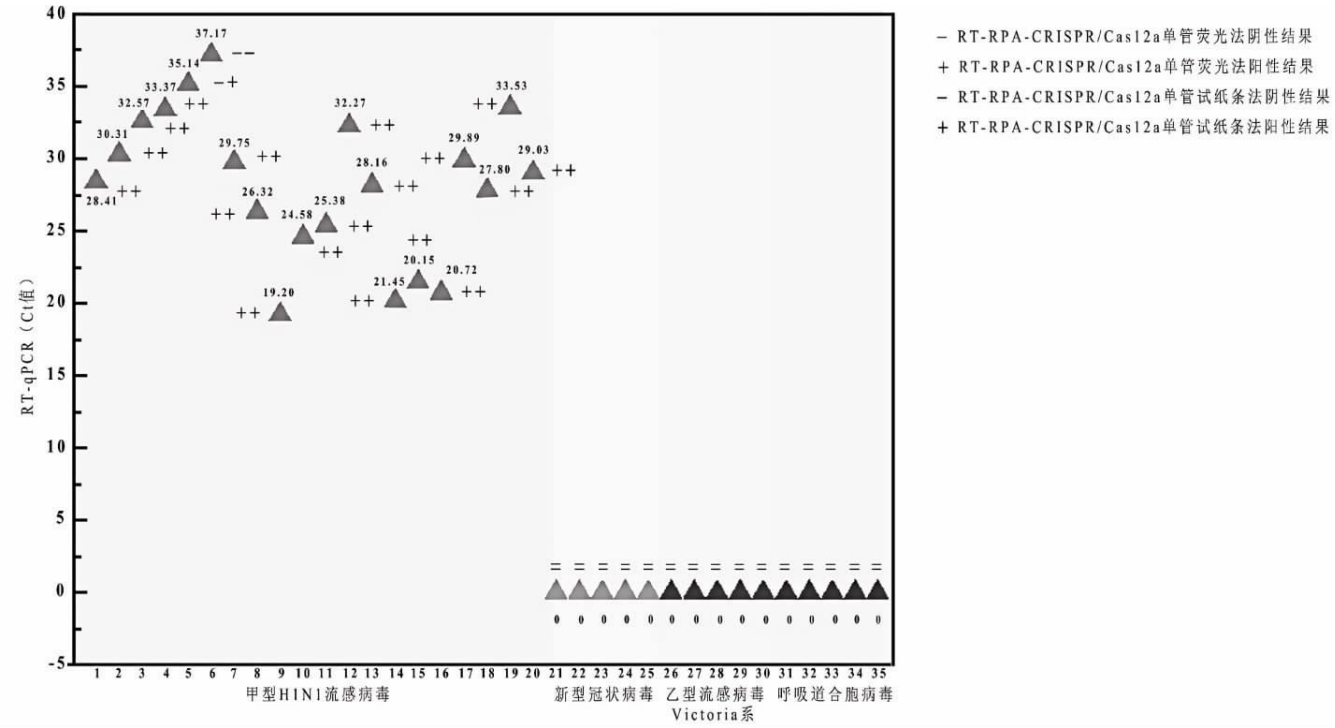


图 9　OTRRC 法与 RT–qPCR 法检测临床样本结果比对图

Figure 9　Comparison of the results of OTRRC and RT–qPCR assay for the detection of clinical samples

与已报道的相关检测方法相比，如 Zhou 等人[24]使用 RPA-CRISPR/Cas12a 试纸法检测 H5 亚型禽流感病毒，1 h 内检测限低至 1.9×10^1 copies/μl；Haach 等人[25]使用一步多重 RT-qPCR 法检测甲型流感病毒，检出限低至 5.09×10^1 copies/μl；Kang 等人[24]应用 RT-LAMP 法检测甲型 H1N1 流感病毒，检出限低至 50 copies/μl。本研究无需热循环设备即可在 30 min 内完成检测，检测限达 10^1 copies/μl，具有较好的现场应用潜力。该检测效率的实现，可能得益于 RPA 在 42℃条件下的高效扩增能力以及单管顺序触发策略有效规避了扩增和切割体系的相互干扰。

与此同时，本研究进一步将 OTRRC 体系与 LFIA 平台相结合，建立 OTRRC-LFIA 方法。与传统的以抗原或抗体为靶标的血清学 LFIA 检测方法不同，该方法基于病毒核酸检测，在一定程度上规避血清学检测的“窗口期”限制，适用于感染早期实现病原识别。此外，LFIA 摆脱了对荧光检测仪器的依赖，拓展了方法在现场筛查和非实验室环境中的应用潜力。在临床样本检测中，OTRRC-FD 与 RT-qPCR 的一致性达到 97.19%，提示该方法在真实样本环境中具有较好的稳定性和可靠性。少数结果有差异的样本可能与病毒载量接近检测限或核酸释放效率存在差异有关，说明在低病毒载量条件下仍需进一步优化反应体系或样本处理策略，以提升检测稳定性。

需要指出的是，流感病毒亚型众多、不同亚型间基因序列存在差异。本研究以甲型 H1N1 流感病毒为验证对象，对 OTRRC 体系进行了方法学构建与性能评估，当前方法主要适用于 H1N1 亚型的快速检测。然而，OTRRC 体系本质上为一种单管整合式检测平台，通过更换 RPA 引物及 crRNA，在理论上可拓展至其他甲型流感病毒亚型或其他 RNA 病毒的检测。同时，本研究在一定程度上简化了检测流程，避免了开盖。但在与 LFIA 平台结合时，滴加试纸条仍需开盖，在特定条件下仍存在扩增产物气溶胶污染的潜在风险。未来可结合微流控芯片、小型化自动化装置及数字化判读技术，以进一步提升体系的自动化水平、降低污染风险，并拓展其在多病原体检测中的应用潜力。此外，本研究临床样本量及病原体种类相对有限，仍需扩大样本规模并开展多亚型、多病原体验证。

利益冲突声明　本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Yunker M, Villafuerte DA, Fall A, et al. Genomic evolution of influenza during the 2023 - 2024 season, the johns hopkins health system[J]. Journal of Clinical Virology, 2024, 174: 105718.

[2] Muawan L, Takada K, Yoshimoto S, et al. Characterization of a (H1N1)pdm09 influenza viruses isolated between 2016 and 2019[J]. Npj Viruses, 2025, 3(1): 42.

[3] Singh P, Sharma K, Bhargava A, et al. Genomic characterization of Influenza A (H1N1)pdm09 and SARS-CoV-2 from Influenza Like Illness (ILI) and Severe Acute Respiratory Illness (SARI) cases reported between July-December, 2022[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 10660.

[4] Hanage WP, Schaffner W. Burden of acute respiratory infections caused by influenza virus, respiratory syncytial virus, and SARS-CoV-2 with consideration of older adults: a narrative review [J]. Infectious Diseases and Therapy, 2025, 14(S1): 5-37.

[5] Tian JH, Liu CY, Wang XL, et al. Comparative analysis of clinical features of lower respiratory tract infection with respiratory syncytial virus and influenza virus in adults: a retrospective study [J]. BMC Pulmonary Medicine, 2023, 23(1): 350.

[6] Crowley AV, Szymanski L, Ballachanda T. Acute liver failure in a patient with minimal comorbidities due to influenza a (H1N1) infection: a case report [J]. SN Comprehensive Clinical Medicine, 2025, 7(1): 24.

[7] Valenzuela-Méndez B, Valenzuela-Sánchez F, Rodríguez-Gutiérrez JF, et al. Host response dysregulations amongst adults hospitalized by influenza A H1N1 virus pneumonia: A prospective multicenter cohort study [J]. Journal of Infection, 2022, 85 (5): 562-569.

[8] Cassedy A, Parle-Mcdermott A, O'kennedy R. Virus detection: a review of the current and emerging molecular and immunological methods[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 637559.

[9] Wei Z, Wang X, Feng H, et al. Isothermal nucleic acid amplification technology for rapid detection of virus [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2022, 43(3): 415-432.

[10] Adedokun G, Sidhu G, Alipanah M, et al. A handheld HIV detection platform using paper-based sample preparation and real-time isothermal amplification[J]. Microsystems & Nanoengineering, 2024, 10(1): 181.

[11] 蔡文凯，郝宗杰，苏业俣，等. 基于环介导等温技术检测人甲流 H1N1 病毒的响应面优化分析 [J]. 中国当代医药，2024，31(16)：116-121.
Cai WK, Hao ZJ, Su YY, et al. Response surface methodology analysis for detecting human H1N1 in-fluenza virus based on loop-mediated isothermal amplification technology[J]. China Modern Medicine, 2024, 31(16): 116-121.(In Chinese)

[12] 任宏伟. 禽类疾病现场检测技术的发展与应用[J]. 家禽科学，2025，47(7)：124-127.
Ren HW. Development and application of on-site detection technologies for poultry diseases [J]. Poultry Science, 2025, 47 (7): 124-127.(In Chinese)

[13] 汪雅婷，朱灿灿，尹雪儿，等. 基于单管式 LAMP-CRISPR/Cas12a 技术的优化及其在甲型流感病毒检测性能的评估[J]. 病毒学报，2025，41(1)：6-15.
Wang YT, Zhu CC, Yin XE, et al. Optimization and performance evaluation of a One-Tube LAMP-CRISPR/Cas12a assay for influenza a virus detection [J]. Chinese Journal of Virology, 2025, 41 (1): 6-15.(In Chinese)

[14] Broughton JP, Deng XD, Yu GX, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. Nature Biotechnology, 2020, 38 (7): 870-874.

（下转第 2073 页）

4184–4190.
Tu XB, Ma SM, Jin XL, et al. Study on the application of blood plate–paper bridge method in Salmonella serotyping [J]. Modern Preventive Medicine, 2024, 51(22): 4184–4190.(In Chinese)

[18] Gebremichael Y, Crandall J, Mukhopadhyay R, et al. Salmonella subpopulations identified from human specimens Express heterogenous phenotypes that are relevant to clinical diagnosis [J]. Microbiol Spectrum, 2023, 11: e01679–22.

[19] 徐秦,许海燕,王彧超,等. 全基因组测序技术鉴定沙门菌血清型的应用分析[J]. 首都公共卫生,2025,19(3):139–142.
Xu Q, Xu HY, Wang YC, et al. Application analysis of whole genome sequencing technology in the identification of Salmonella serotypes [J]. Capital Journal of Public Health, 2025, 19 (3): 139–142. (In Chinese)

[20] 张璐,沈青春,张纯萍,等. 全基因组测序技术对沙门氏菌血清型和耐药性的预测能力分析 [J]. 微生物学报,2021,61(12):4038–4047.
Zhang L, Shen QC, Zhang CP, et al. Predictive analysis of whole genome sequencing for Salmonella serotype and antimicrobial resistance phenotypes [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(12): 4038–4047.(In Chinese)

[21] Uelze L, Borowiak M, Deneke C, et al. Performance and accuracy of four Open–Source tools for in silico serotyping of salmonella spp. based on Whole–Genome Short–Read sequencing data [J]. Applied and Environment Microbiology, 2020, 86(5): e02265–19.

[22] 陈丹妮,韩营营,李杰,等. 基于基因组序列的 3 种沙门菌分子血清分型方法比较研究[J]. 疾病监测,2021,36(5):468–474.
Chen DN, Han YY, Li J, et al. Comprehensive assessment of three molecular serotyping methods of Salmonella based on genomic sequence [J]. Disease Surveillance, 2021, 36 (5): 468–474. (In Chinese)

[23] 董晓根,颜涛,石婧,等. 沙门菌玻片凝集血清分型与多重荧光 PCR 血清分型检测试剂盒方法比较 [J]. 疾病监测,2020,35(9):827–830.
Dong XG, Yan T, Shi J, et al. Comparison of salmonella serotyping methods of slide agglutination and multiple fluorescence PCR serotyping kit [J]. Disease Surveillance, 2020, 35 (9): 827–830.(In Chinese)

收稿日期:2025–11–22

(上接第 2067 页)

[15] Habimana JDD, Huang RQ, Muhoza B, et al. Mechanistic insights of CRISPR/Cas nucleases for programmable targeting and early–stage diagnosis: A review [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 203: 114033.

[16] Dronina J, Samukaite–Bubniene U, Ramanavicius A. Towards application of CRISPR–Cas12a in the design of modern viral DNA detection tools (Review)[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2022, 20 (1): 41.

[17] Yao Z, He K, Wang H, et al. Tuning the dynamic reaction balance of CRISPR/Cas12a and RPA in one pot:a key to Switch nucleic acid quantification[J]. ACS Sens, 2024, 9(7): 3511–3519.

[18] Zhao F, Hu YM, Fan ZL, et al. Rapid and sensitive one–tube detection of mpox virus using RPA–coupled CRISPR–Cas12 assay [J]. Cell Rep Methods, 2023, 3(10): 100620.

[19] Lin CH, Zhou J, Gao NN, et al. Establishing a pulmonary aspergillus fumigatus infection diagnostic platform based on RPA–CRISPR–Cas12a [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(4): 116.

[20] 王雪琪, 何纳. CRISPR 检测技术应用于核酸现场即时检测系统综述[J]. 中华疾病控制杂志,2024,28(11):1344–1348, 1360.
Wang XQ, He N. Systematic review of CRISPR applied to point–of–care nucleic acid detection [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2024, 28(11): 1344–1348, 1360.(In Chinese)

[21] Qian WD, Wang XF, Huang J, et al. Sensitive and rapid RT–RPA–Cas12a–mediated detection method capable of human rhinovirus A and/or C species by targeting VP4 [J]. Virus Research, 2023, 323: 199001.

[22] Cheng M, Tan CW, Xiang B, et al. Chain hybridization–based CRISPR–lateral flow assay enables accurate gene visual detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1270: 341437.

[23] Kang TJ, Lu JM, Yu T, et al. Advances in nucleic acid amplification techniques (NAATs): COVID–19 point–of–care diagnostics as an example[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 206: 114109.

[24] Zhou X, Wang SW, Ma Y, et al. On–Site and visual detection of the H5 subtype avian influenza virus based on RT–RPA and CRISPR/Cas12a[J]. Viruses, 2024, 16(5): 753.

[25] Kang JS, Seo MR. Development of reverse–transcription loop–mediated isothermal amplification assays for point–of–care testing of human influenza virus subtypes H1N1 and H3N2 [J]. Genomics & Informatics, 2022, 20(4): e46.

收稿日期:2025–12–25