

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241206006

引用格式: 张勇, 华迪明, 邓锐杰, 等. 基于串联 CRISPR-Cas13a 的食品包装病原微生物污染免扩增分子检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(15): 94–100.

ZHANG Y, HUA DM, DENG RJ, *et al.* Amplification-free molecular detection of pathogenic microbial contamination in food packaging based on tandem CRISPR-Cas13a [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(15): 94–100. (in Chinese with English abstract).

# 基于串联 CRISPR-Cas13a 的食品包装病原 微生物污染免扩增分子检测

张勇, 华迪明, 邓锐杰, 高鸿\*

(四川大学轻工科学与工程学院, 成都 610065)

**摘要: 目的** 开发一款基于串联规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白 13a (CRISPR-associated protein 13a, Cas13a)组成的 CRISPR-Cas13a 快速、灵敏的食品包装病原微生物检测技术。**方法** 利用 CRISPR-Cas13a 技术的特异识别和信号放大特性, 同时基于对病原 RNA 多靶点识别的串联设计, 通过一个病原 RNA 分子激活多个 Cas13a, 反式切割反应体系中的 RNA 信号报告分子并伴随荧光信号产生, 协同提升信号放大效率, 从而实现对病原体的灵敏检测。**结果** 该方法对病原微生物及 RNA 的检出限分别为 800 copies/mL 和 18.7 pmol/L, 能够在较短时间内完成病原 RNA 检测, 同时能够准确区分不同病原微生物。测试新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)假病毒污染的食品包装样品显示, 方法测定的回收率在 89.71%~102.56%。**结论** 本研究提供了一种快速、经济且操作简便的食品包装病原微生物污染检测方法, 具备较好的准确性。对食源途径风险微生物的监控具有潜在应用价值。

**关键词:** 病原微生物; 规律间隔成簇短回文重复序列相关蛋白 13a; 免扩增检测; 食品包装; 食品安全

## Amplification-free molecular detection of pathogenic microbial contamination in food packaging based on tandem CRISPR-Cas13a

ZHANG Yong, HUA Di-Ming, DENG Rui-Jie, GAO Hong\*

(College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a rapid and sensitive detection technology for pathogenic microorganisms in food packaging based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein 13a (Cas13a) system. **Methods** The method leveraged the specific recognition and signal amplification characteristics of the CRISPR-Cas13a technology. Multiple guide RNAs were designed to target

收稿日期: 2024-12-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1103000)

第一作者: 张勇(1995—), 男, 博士研究生, 主要研究方向为食品安全分子检测。E-mail: zhangyong9523@qq.com

\*通信作者: 高鸿(1973—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为食品质量与安全、食品营养与功能。E-mail: gao523@hotmail.com

different sites on pathogenic RNA, enabling a single RNA molecule to activate multiple Cas13a enzymes simultaneously. This cascade triggered *trans*-cleavage of RNA reporter molecules in the reaction mixture, generating a detectable fluorescent signal. The tandem design synergistically enhanced signal amplification efficiency, thereby improving detection sensitivity. **Results** The limits of detection of this method for pathogenic and RNA were 800 copies/mL and 18.7 pmol/L, respectively, and the detection could be completed in a short time, accurately distinguishing different pathogens. Testing food packaging samples contaminated with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pseudovirus showed recovery rates ranging from 89.71% to 102.56%. **Conclusion** This study presents a rapid, cost-effective and easy-to-operate method for detecting pathogenic microbial contamination on food packaging surfaces, indicating high accuracy, offering potential application value for monitoring microbial risks in foodborne transmission pathways.

**KEY WORDS:** pathogenic microorganisms; clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 13a; amplification-free detection; food packaging; food safety

## 0 引 言

食品包装易受到病原微生物污染, 成为潜在的食品安全隐患<sup>[1-2]</sup>。病原微生物不仅广泛存在于环境中, 而且由于其快速传播的特性, 可能在运输、存储和销售过程中污染食品包装, 进而对消费者的健康构成威胁<sup>[3-4]</sup>。食品包装等环境中的病原微生物污染问题已被多次报道, 引发了公众对食品安全的担忧<sup>[5-6]</sup>。在中国的部分冷链运输过程中, 已检测到病原微生物, 而美国和欧洲的研究也发现类似情况<sup>[7-10]</sup>。这些复杂样本中病原微生物浓度通常较低, 且背景干扰较大, 进一步增加了检测的难度<sup>[11-12]</sup>。随着消费者对食品安全要求的不断提高, 如何有效监控和检测食品包装表面潜在的微生物污染已成为亟待解决的问题<sup>[13-14]</sup>。因此, 迫切需要开发快速、灵敏、经济且操作简便的检测技术, 以确保食品包装的安全性<sup>[15-17]</sup>。

核酸检测技术因其高灵敏度和特异性, 已成为病原微生物分子诊断的“金标准”<sup>[18-20]</sup>。典型的核酸检测包括逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)或等温扩增技术(如环介导等温扩增)来检测病原微生物 RNA, 并结合实时荧光监测进行病原微生物定量<sup>[21-22]</sup>。然而, 现有核酸检测技术在环境样本中的应用仍面临一些挑战: 一方面, 传统检测方法依赖于复杂的化学修饰和昂贵的仪器设备, 这限制了其在资源有限环境中的广泛应用; 另一方面, 逆转录步骤的高误差率也影响了检测的可靠性<sup>[23-24]</sup>。此外, 这些方法在处理复杂背景干扰较大的环境样本时, 常常难以实现快速和高灵敏度的检测, 尤其是在病原微生物浓度较低的情况下<sup>[25]</sup>。

近年来, 规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)组成的

CRISPR-Cas 系统的应用显著提高了核酸检测的灵敏度和特异性<sup>[26-27]</sup>。特别是 CRISPR-Cas13a 技术, 已被证明能够通过特异识别 RNA 靶标并释放荧光信号, 实现对病原微生物的快速检测<sup>[27]</sup>。与传统的 RT-PCR 方法相比, CRISPR-Cas13a 技术具有更高的灵敏度和特异性, 并且不依赖于复杂的扩增步骤, 降低了操作的难度和成本<sup>[28-29]</sup>。然而, 尽管 CRISPR-Cas13a 系统在多种应用中已取得重要进展, 但现有研究多集中于单一靶标的检测, 而对于复杂样本中的多重靶标识别和信号放大仍存在一定局限<sup>[30-31]</sup>。因此本研究基于 CRISPR-Cas13a 技术的特异识别和信号放大特性, 开发了一种无需核酸扩增的多个串联 CRISPR-Cas13a 方法, 用于灵敏检测食品包装中的病原微生物污染, 也为食品安全风险监控提供了新的研究思路和技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

Cas13a 质粒(#172488, 美国 Addgene 公司); LB 肉汤培养基、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、卡那霉素、氯霉素、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)[分析纯, 生工生物工程(上海)股份有限公司]; 双蒸水(double distilled water, ddH<sub>2</sub>O)(分析纯, 美国康宁公司); PCR 预混液[分析纯, 东洋纺(上海)生物科技有限公司]; NaCl、KCl、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(n-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethane sulfonic acid, HEPES)、咪唑、甘油(分析纯, 美国 Sigma 公司); T7 RNA 聚合酶(20 U/ $\mu$ L)、核苷三磷酸(nucleoside triphosphate, NTP)混合物(25 mmol/L)(美国赛默飞世尔科技公司); 病毒样品释放剂(MFSP-CoV2-10, 北京聚合美生物科技有限公司); U<sub>5</sub> reporter[分析纯, 序列: FAM-5'-UUUUU-3'-BHQ1], 宝生物工程(大连)有限公司]。

用于 crRNA 体外转录的 DNA 模板购自擎科生物工程股份有限公司, 其中引物序列详见表 1。

表 1 用于 crRNA 体外转录的 DNA 模板引物序列  
Table 1 DNA template primer sequence for *in vitro* transcription of crRNA

引物名称	序列(5'-3')
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
crRNA1-DNA	ACGTTTGGTGGACCCCTCAGAGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA2-DNA	TAACCAGAATGGAGAACGCAGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA3-DNA	GATCAAAAACAACGTCGGCCCGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA4-DNA	TGCGTCTTGGTTCACCGCTCGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA5-DNA	GACCTTAAATTCCTCGAGGGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA6-DNA	TAGCAGTCCAGATGACCAAAGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA7-DNA	TACCAGACGAATTCGTGGTGGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA8-DNA	GAAAGATCTCAGTCCAAGATTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA9-DNA	TAGGAAGTGGCCAGAAGCTGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA
crRNA10-DNA	TCATATGGGTTGCAACTGAGTTTTAGTCCCCTTCATTTTTGGGGTGGTCTACCCTATAGTGAGTCGTATTA

## 1.2 设备与仪器

ProFlex 恒温孵育仪(美国赛默飞世尔科技公司); ZQZY-AF8 大量组合式全温振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司); CL5R 大容量低速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司); SCIENTZ-IIID 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); GMJ-50L 立式高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械有限公司); HiTrap Ni-NTA 柱(美国 GE Healthcare 公司); 50 kDa 超滤装置(美国 MILLIPORE 公司); Unique AutoPure 蛋白纯化仪(苏州英赛斯智能科技有限公司); Synergy H1 荧光微孔板读取仪、Take3 附件(美国 BioTek 公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 蛋白的表达纯化

将 Cas13a 质粒转化至 TSsetta DE3 感受态细胞中, 并接种至 LB 培养基中, 于 37 °C 振荡培养。当培养物 600 nm 波长处的光密度(optical density at 600 nm wavelength, OD<sub>600</sub>)达到 0.6~0.8 后, 加入终浓度为 500 μmol/L 的 IPTG 以诱导蛋白表达。诱导后, 将培养温度降低至 16 °C, 继续培养 16 h。收集诱导后的细胞, 使用裂解缓冲液(50 mmol/L HEPES, pH 7.0, 500 mmol/L KCl, 10%甘油)重悬并裂解细胞。将裂解产物在 4 °C、10000 r/min 条件下离心 30 min, 收集上清液。将上清液与 HiTrap Ni-NTA 柱于 16 °C 下孵育 30 min 后, 用含 1 mol/L KCl 及 25 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液洗涤 3 次。随后, 通过咪唑梯度(50、200、200、500 mmol/L)洗脱蛋白, 并收集各级洗脱液。将收集的含蛋白洗脱液经 50 kDa 超滤装置浓缩至 1 mL 以内。随后使用 Unique AutoPure 蛋白纯化仪系统, 将浓缩后的蛋白液依次通过阳离子交换柱和分子筛柱进行进一步纯化。最终, 通过 Synergy H1 荧光微孔板读取仪及 Take3 附件测定总蛋白浓度。

### 1.3.2 crRNA 的体外转录

将 4 μL DNA 模板(10 μmol/L)、4 μL T7 promoter (10 μmol/L)、4 μL T7 RNA 聚合酶缓冲液和 25.5 μL H<sub>2</sub>O 混合, 于 90 °C 退火 5 min 后, 在室温下平衡 30 min。向平衡好的混合物中加入 0.5 μL T7 RNA 聚合酶(20 U/μL)和 2 μL NTP 混合物(每种核苷酸: 腺嘌呤核苷三磷酸、鸟嘌呤核苷三磷酸、胞嘧啶核苷三磷酸和尿嘧啶核苷三磷酸的浓度均为 10 mmol/L), 在 37 °C 下反应过夜以获得 crRNA 的转录产物。最终通过 Synergy H1 及 Take3 附件测定 crRNA 浓度。

### 1.3.3 靶标 RNA 的检测

利用病毒样品释放剂从病原微生物中提取 RNA 基因, 或通过体外转录获得 RNA 基因。将 40 μL 反应体系用于病原微生物 RNA 检测, 其中包括: 4 μL 靶标 RNA 样品、4 μL U<sub>5</sub> reporter (4 μmol/L)、4 μL crRNA (10 μL)、0.2 μL LbuCas13a (10 μmol/L)、4 μL 10×Cas13a 缓冲液、20 mmol/L HEPES (pH 6.8)、50 mmol/L KCl、5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、100 μg/mL 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、0.01% 聚乙二醇单辛基苯基醚(Igepal CA630)、2% (V/V)甘油、以及 23.8 μL H<sub>2</sub>O。混合物在 37 °C 孵育 30 min 后, 被用来进行荧光分析以检测病原微生物 RNA。荧光分析时使用 Synergy H1, 激发波长设置为 480 nm, 发射波长范围设置为 510~600 nm。

### 1.3.4 特异性选择能力测试

为了验证该方法对于靶标 RNA[新型冠状病毒 N 基因(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 n gene, SARS-CoV-2 N gene)]的检测特异性, 选择了新型冠状病毒 E 基因(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 e gene, SARS-CoV-2 E gene)、中东呼吸综合征冠状病毒 N 基因(middle east respiratory syndrome n gene, MERS N gene)和核糖核酸酶 P (ribonuclease P, Rnase P)作为干扰与靶标 RNA 的输出荧光进行对比测试。选择性测试共选择了 3 个浓度, 分别为 20、50、100 pmol/L。荧光检测参照 1.3.3 步骤。

### 1.3.5 食品包装样品中假病毒加标回收检测

在食品包装表面(直径约 3 cm 的区域)喷洒 200  $\mu\text{L}$  含 500、1000、2000 和 5000 copies SARS-CoV-2 假病毒的溶液, 模拟 SARS-CoV-2 病毒的污染。随后使用 300  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液收集食品包装表面的 SARS-CoV-2 假病毒, 随后利用病毒样品释放剂提取 RNA, 同时将相同浓度的 SARS-CoV-2 假病毒的溶液直接利用病毒样品释放剂提取 RNA。将提取出来的 RNA 按照 1.3.3 步骤进行荧光检测, 并计算 RNA 浓度。将用本方法检测所得回收的靶标 RNA 浓度除以对应真实添加的靶标 RNA 浓度, 从而获得检测回收率。

### 1.4 数据处理

本研究涉及的所有试验均重复测定 3 次, 采用 Microsoft Excel 2019 软件进行数据处理及平均值和标准偏差等相关运算, 采用 OriginPro 8.0 和 Microsoft Power Point 2019 软件进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 串联 CRISPR-Cas13a 检测病原微生物原理及验证

本研究利用了 CRISPR-Cas13a 系统的特异识别与信号放大特性, 通过病原 RNA 多靶点识别的串联设计, 实现对目标 RNA 的高灵敏检测。检测原理如图 1 所示, Cas13a 通过 crRNA 特异性结合靶标 RNA 序列, 激活 Cas13a 的核酸酶活性, 进而切割体系中的 RNA 信号报告分子, 导致荧光信号的释放。信号报告分子是将荧光基团和荧光淬灭基团偶连起来的短 RNA 序列, 这些报告分子在未被切割时保持背景荧光信号。Cas13a 在与 crRNA 配对, 并精确识别靶标 RNA 后, 其核酸酶活性被激活, 进而切割信号报告分子。此过程中, 报告分子中包含的荧光基团和淬灭基团之间的距离会发生变化, 导致荧光信号的释放。该系统的核心创新在于多靶点串联设计: 当靶标 RNA 分子存在时, 多个 Cas13a 被同时激活, 这导致一系列连续的反式切割反应, 显著放大了荧光信号的强度。这种反应链条效应有效提高了检测的灵敏度, 可以捕捉到极低浓度的靶标 RNA 分子。而在靶标 RNA 缺失的情况下, 报告分子未经切割, 荧光信号始终维持在背景水平, 从而确保了检测的特异性和准确性。实验表明, 使用单个位点时信噪比为 4.3, 而采用 10 个位点设计时, 信噪比提升至 10.7, 验证了多靶点设计在信号放大和非扩增检测中的显著优势。

### 2.2 实验条件优化与反应效率分析

作为串联 CRISPR-Cas13a 检测的关键条件, 结合位点数、Cas13a 浓度和信号报告分子的浓度被本研究进行了系统优化。研究发现, 增加结合位点数显著增强了靶标 RNA 存在时的荧光信号, 而在靶标 RNA 缺失时, 荧光信号几乎无明显变化(如图 2A)。随着结合位点数的增加, 靶

标 RNA 响应的信噪比从 4.3 上升至 9.1。然而, 由于结合位点数的增加需要更多种类的转录 crRNA, 导致检测成本显著提升。综合考虑检测效果与成本因素, 最终选择 10 个位点用于靶标 RNA 检测。在优化 Cas13a 浓度时, 设定不同浓度梯度的 Cas13a 蛋白对靶标 RNA 进行检测(如图 2B)。结果表明, 当 Cas13a 浓度为 100 nmol/L 时, 信噪比达到最大值, 表现出最佳检测效果。信号报告分子的浓度同样是影响实验结果的关键因素。通过比较 5 种终浓度(100、200、400、800、1000 nmol/L)的信号报告分子, 发现当信号报告分子浓度为 400 nmol/L 时, 能够产生最高的信号响应(如图 2C)。因此, 在综合考虑灵敏性和检测效率的前提下, 最终选择 400 nmol/L 的信号报告分子作为最优浓度。

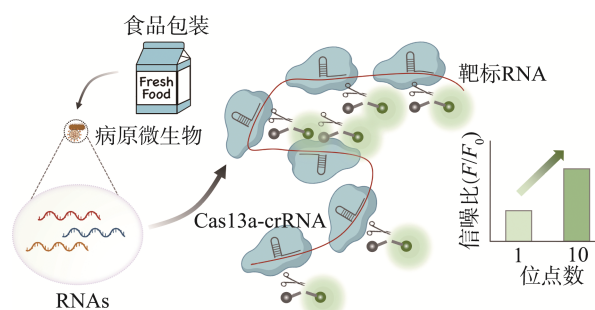
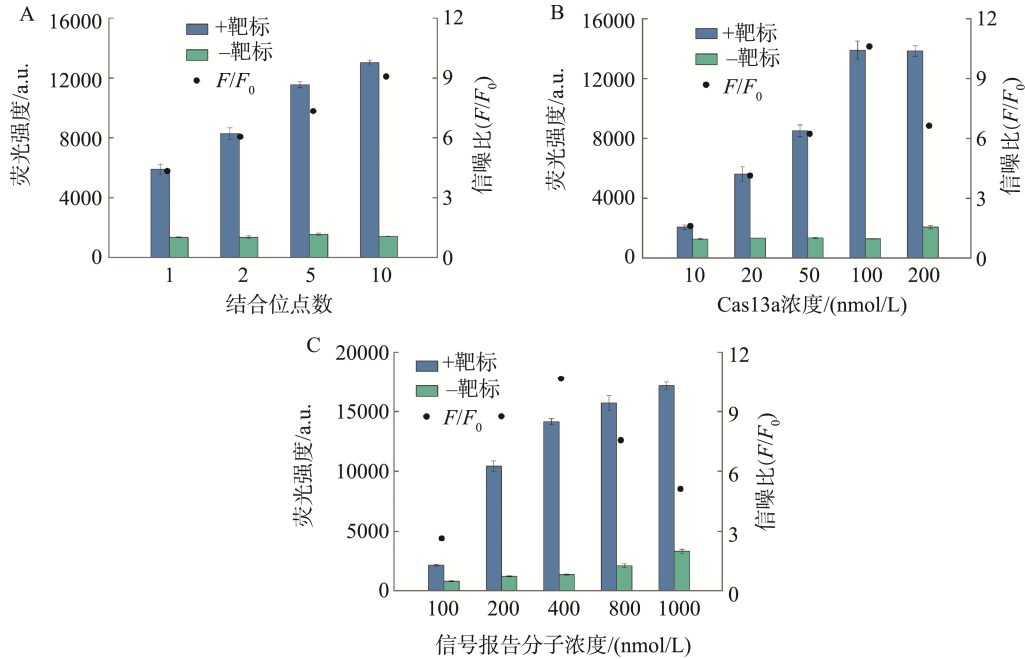


图1 串联CRISPR-Cas13a检测靶标RNA的原理示意图及荧光信噪比图

Fig.1 Schematic diagram of the principle of tandem CRISPR-Cas13a for detecting target RNA and the graph of fluorescence signal-to-noise ratio

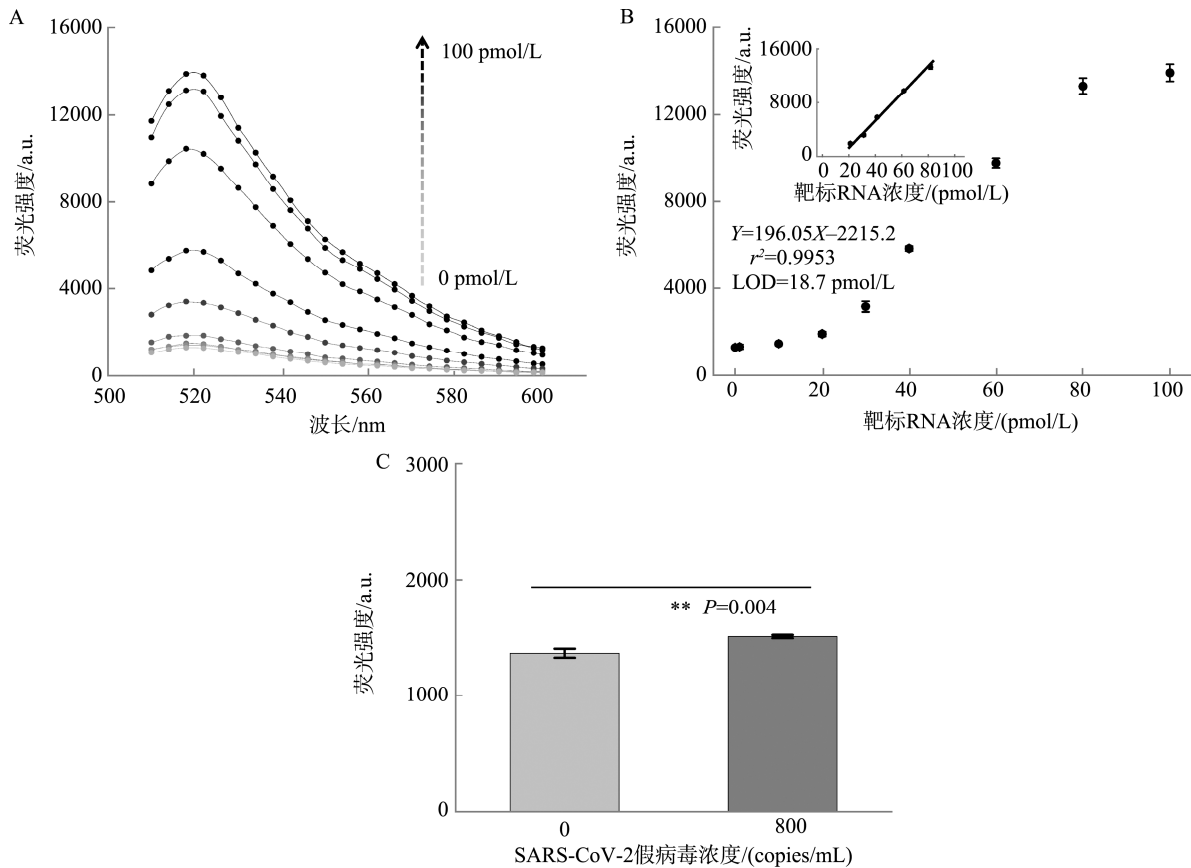
### 2.3 靶标的定量与定性检测

在最优实验条件下, 采用不同摩尔浓度梯度的靶标 RNA 标准溶液(0、1、10、20、30、40、60、80 和 100 pmol/L), 建立了用于靶标 RNA 定量分析的标准曲线。如图 3A 所示, 随着靶标 RNA 浓度的增加, 荧光强度逐步增强。在靶标 RNA 浓度为 20~80 pmol/L 的范围内, 荧光强度与靶标 RNA 浓度呈现良好的线性关系, 标准曲线方程为  $Y=196.05X-2215.2$ ,  $r^2=0.9953$ , 其中  $X$  和  $Y$  分别代表靶标 RNA 浓度和荧光强度。经计算, 检出限(limit of detection, LOD)为 18.7 pmol/L(如图 3B)。为了进一步测试该方法的实际检测能力, 使用含 SARS-CoV-2 假病毒的 RNA 提取液。如图 3C 所示, 与未添加 SARS-CoV-2 假病毒背景组相比, SARS-CoV-2 假病毒浓度为 800 copies/mL 的实验组已经出现了显著性差异。该检测能力优于大部分国际卫生组织和相关研究机构对于 SARS-CoV-2 LOD 的要求(1000 copies/mL 左右)<sup>[32]</sup>。上述结果表明, 该方法可作为一种快速、有效的靶标 RNA 定量分析工具。值得注意的是, 本方法通过一步混读传感策略即可完成靶标 RNA 的检测, 无需涉及烦琐的分离步骤。因此, 该方法在病原微生物的现场监测中展现出广阔的应用前景。



注: A. 不同结合位点数对靶标RNA的荧光响应; B. 不同Cas13a浓度对靶标RNA的荧光响应; C. 不同信号报告分子浓度对靶标RNA的荧光响应。  
图2 实验条件优化与反应效率分析( $n=3$ )

Fig.2 Optimization of experimental conditions and analysis of reaction efficiency ( $n=3$ )



注: A. 不同浓度靶标RNA对荧光光谱的影响; B. 靶标RNA浓度与荧光强度的关系(内部: 靶标RNA浓度与荧光强度呈线性关系); C. SARS-CoV-2假病毒浓度与荧光强度的关系。 \*\* $P<0.01$ , 使用双尾学生 $t$ 检验确定。

图3 不同浓度靶标对荧光响应的影响( $n=3$ )

Fig.3 Effects of different concentrations of target on fluorescence response ( $n=3$ )

## 2.4 特异性选择能力

为验证本方法在病原微生物检测中的特异性选择能力, 本研究设计了针对 SARS-CoV-2 E gene、MERS N gene 以及 SARS-CoV-2 核酸检测的内源性内参 Rnase P 的检测实验, 并测试了在 3 种不同浓度(20、50、100 pmol/L)下的荧光响应强度, 以进一步评估其检测选择性和抗干扰能力。实验结果如图 4 所示, 在相同浓度条件下, 靶标 RNA (SARS-CoV-2 N gene)引起的特征荧光信号显著高于其他干扰物质所导致的荧光信号。具体而言, 对于 SARS-CoV-2 E gene 检测, 其荧光信号变化幅度明显超越了 MERS N gene 及内参 Rnase P 的荧光响应值, 干扰影响被有效抑制。这表明, 本方法能够准确区分靶标 RNA 与其他干扰核酸, 展现出卓越的特异性检测能力。此外, 不同浓度实验中, 靶标 RNA 的荧光信号变化幅度随着浓度的增加而呈现良好的正相关性, 而干扰物质的信号变化幅度无明显规律性或增强趋势。这一结果清晰地表明, 该检测方法对靶标 RNA 具有卓越的选择性特异性。同时, 这也进一步证明该方法在分析复杂实际样品方面具有广泛的应用潜力。

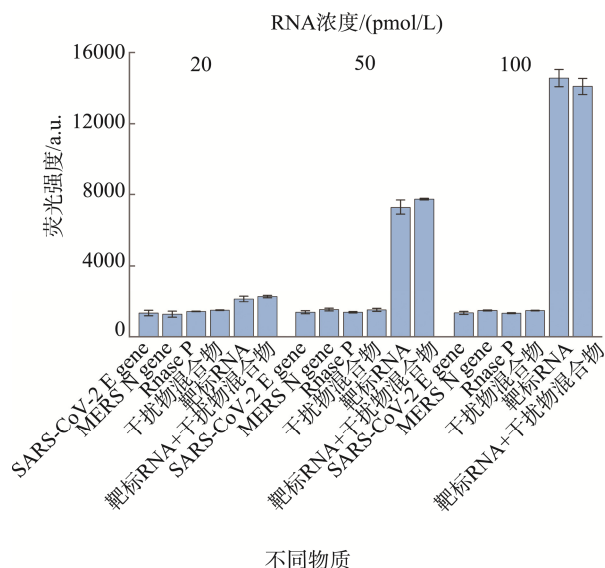


图4 不同RNA对检测体系荧光响应的影响( $n=3$ )

Fig.4 Effects of different RNA on fluorescence response of detection system ( $n=3$ )

## 2.5 食品包装病原微生物污染分析

为评估本方法在实际环境中检测病原微生物的可行性, 本研究综合考虑食品包装病原微生物污染的特性。食品包装表面由于其材质复杂、易受环境影响, 相较于其他环境, 其病原微生物污染不仅更难监测, 还对疾病的传播存在更高的潜在风险。因此, 本研究选择食品包装表面的 SARS-CoV-2 假病毒作为测试对象, 模拟病毒污染并开展实际样品的回收率实验。在食品包装表面喷洒含有不同浓度 SARS-CoV-2 假病毒的溶液, 适当涂布后使用洗涤缓冲

液回收病毒样本, 并结合 RNA 提取和荧光检测进行回收率计算。实验结果(如图 5 所示)显示, 本方法在不同病毒浓度下的检测回收率范围为 89.71%~102.56%, 证明了其在复杂环境样本中对靶标 RNA 检测的高效性与可靠性。同时, 本方法具有检测迅速、无需核酸扩增和操作简单等优势, 为病原微生物的现场快速检测提供了一种高效、便捷且可行的技术手段。综上, 结合实验验证结果, 本研究表明该方法可广泛应用于食品包装等复杂环境中的病原微生物监测。

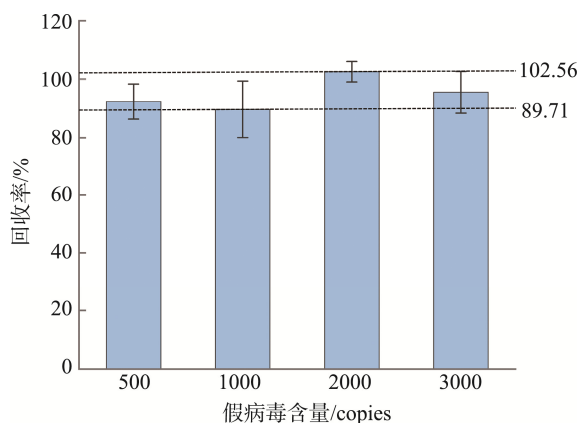


图5 食品包装上假病毒加标回收检测结果( $n=3$ )

Fig.5 Recovery test results of recovery test results of false virus labels on food packaging on food packaging ( $n=3$ )

## 3 结论与讨论

综上所述, 本研究基于 CRISPR-Cas13a 技术的特异性靶标识别和信号放大特性, 设计并开发了一种无需核酸扩增的多个串联 CRISPR-Cas13a 方法, 用于快速检测食品包装中的病原微生物污染。该方法具有以下优势: (1)操作简便, 无需核酸扩增, 检测步骤显著缩短, 能够在较短时间内完成检测; (2)通过串联设计显著提高信号放大效率, 具备高灵敏度(LOD 为 800 copies/mL)和高特异性, 可准确区分不同病原微生物; (3)利用荧光信号输出, 无需复杂仪器设备或昂贵试剂, 降低了检测成本; (4)回收率在 89.71%~102.56%之间, 验证了该方法在复杂食品包装样本中的良好准确性和可靠性。

尽管本方法具有较高的灵敏度和特异性, 但在实际应用中仍然面临一些局限性。首先, 样品预处理过程中需要提取病原微生物的 RNA, 这一过程可能影响检测成本及检测效率。其次, 特异性和灵敏度可能受到样本中杂质、RNA 降解或其他外源性因素的影响, 从而影响最终结果的准确性。因此, 未来的研究应进一步优化 RNA 提取步骤, 降低试剂成本并提高提取效率, 同时在多种环境条件下验证该方法的稳定性和可靠性。

本研究为食品包装病原微生物的快速检测提供了一种高效、经济的新策略, 具有广泛的应用潜力。特别是在冷链物流、食品加工厂等高风险环境中, 快速而简便的检测方

法可以显著提高食品安全监测效率,及时发现污染源,避免食品安全事故的发生。例如,冷链物流环节中的食品包装经常与多个接触面接触,容易成为病原微生物的传播载体,因此快速检测方法能有效保障消费者的食品安全。未来的研究可进一步优化该方法,提升对更广泛病原微生物的检测能力,并探索其在其他食品相关样本中的应用,如蔬菜、水果和加工食品等,以进一步推动食品安全监测技术的发展。

#### 参考文献

- [1] AL-TAYYAR NA, YOUSSEF AM, AL-HINDI R. Antimicrobial food packaging based on sustainable bio-based materials for reducing foodborne pathogens: A review [J]. *Food Chemistry*, 2020, 310(1): 125915.
- [2] KAMBOJ S, GUPTA N, BANDRAL JD, *et al.* Food safety and hygiene: A review [J]. *International Journal of Chemical Studies*, 2020, 8(2): 358–368.
- [3] HAVELAAR AH, BRUL S, JONG AD, *et al.* Future challenges to microbial food safety [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 139(1): S79–S94.
- [4] SHENG L, WANG L. The microbial safety of fish and fish products: Recent advances in understanding its significance, contamination sources, and control strategies [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 20(1): 738–786.
- [5] KASZA G, VEFLN N, SCHOLDERER J, *et al.* Conflicting issues of sustainable consumption and food safety: Risky consumer behaviors in reducing food waste and plastic packaging [J]. *Foods*, 2022, 11(21): 3520.
- [6] GALLO M, FERRARA L, CALOGERO A, *et al.* Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety [J]. *Food Research International*, 2020, 137(1): 109414.
- [7] CHEN X, LYU H, ZHANG J, *et al.* National food safety standards related to microbiological contaminants in China: Recent progress and challenges [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2021, 18(8): 528–537.
- [8] REN QS, FANG K, YANG XT, *et al.* Ensuring the quality of meat in cold chain logistics: A comprehensive review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 119(1): 133–151.
- [9] AIYEDUN SO, ONARINDE BA, SWAINSON M, *et al.* Foodborne outbreaks of microbial infection from fresh produce in Europe and North America: A systematic review of data from this millennium [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 56(5): 2215–2223.
- [10] SARNO E, PEZZUTTO D, ROSSI M, *et al.* A review of significant European foodborne outbreaks in the last decade [J]. *Journal of Food Protection*, 2021, 84(12): 2059–2070.
- [11] FERONE M, GOWEN A, FANNING S, *et al.* Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(6): 3106–3129.
- [12] WANG Y, SALAZAR JK. Culture-independent rapid detection methods for bacterial pathogens and toxins in food matrices [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015, 15(1): 183–205.
- [13] THAMES HT, THERADIYIL SA. A review of *Salmonella* and *Campylobacter* in broiler meat: Emerging challenges and food safety measures [J]. *Foods*, 2020, 9(6): 776.
- [14] MAO Z, CHEN R, WANG X, *et al.* CRISPR/Cas12a-based technology: A powerful tool for biosensing in food safety [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 122(1): 211–222.
- [15] QIU M, ZHANG J, PANG L, *et al.* Recent advances on CRISPR/Cas system-enabled portable detection devices for on-site agri-food safety assay [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 129(1): 364–387.
- [16] LIN X, WANG Z, JIA X, *et al.* Stimulus-responsive hydrogels: A potent tool for biosensing in food safety [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2023, 131(1): 91–103.
- [17] TARANNUM N, GAUTAM A, CHAUHAN T, *et al.* Nanomaterial based sensors for detection of food contaminants: A prospect [J]. *Sensing Technology*, 2024, 2(1): 2373196.
- [18] OLIVEIRA BB, VEIGAS B, BAPTISTA PV. Isothermal amplification of nucleic acids: The race for the next “gold standard” [J]. *Frontiers in Sensors*, 2021, 2(1): 752600.
- [19] GERACE E, MANCUSO G, MIDIRI A, *et al.* Recent advances in the use of molecular methods for the diagnosis of bacterial infections [J]. *Pathogens*, 2022, 11(6): 663.
- [20] TRINH TND, LEE NY. Advances in nucleic acid amplification-based microfluidic devices for clinical microbial detection [J]. *Chemosensors*, 2022, 10(4): 123.
- [21] NGOC LTN, LEE YC. Current trends in RNA virus detection via nucleic acid isothermal amplification-based platforms [J]. *Biosensors*, 2024, 14(2): 97.
- [22] SOUII A, M’HADHEB MB, GHARBI J. Nucleic acid-based biotechnologies for food-borne pathogen detection using routine time-intensive culture-based methods and fast molecular diagnostics [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2016, 25(1): 11–20.
- [23] CHAKRABORTY S. Democratizing nucleic acid-based molecular diagnostic tests for infectious diseases at resource-limited settings—from point of care to extreme point of care [J]. *Sensors & Diagnostics*, 2024, 3(4): 536–561.
- [24] STADHOUNDERS R, PAS SD, ANBER J, *et al.* The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5’ nuclease assay [J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2010, 12(1): 109–117.
- [25] NNACHI RC, SUI N, KE B, *et al.* Biosensors for rapid detection of bacterial pathogens in water, food and environment [J]. *Environment International*, 2022, 166(1): 107357.
- [26] CHENG X, LI Y, KOU J, *et al.* Novel non-nucleic acid targets detection strategies based on CRISPR/Cas toolboxes: A review [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 215(1): 114559.
- [27] GAO S, LIU J, LI Z, *et al.* Sensitive detection of foodborne pathogens based on CRISPR-Cas13a [J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(6): 2615–2625.
- [28] SINGH M, BINDAL G, MISRA CS, *et al.* The era of Cas12 and Cas13 CRISPR-based disease diagnosis [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2022, 48(6): 714–729.
- [29] AQUINO-JARQUIN G. Recent progress on rapid SARS-CoV-2/COVID-19 detection by CRISPR-Cas13-based platforms [J]. *Drug Discovery Today*, 2021, 26(8): 2025–2035.
- [30] LI H, XIE Y, CHEN F, *et al.* Amplification-free CRISPR/Cas detection technology: Challenges, strategies, and perspectives [J]. *Chemical Society Reviews*, 2023, 52(1): 361–382.
- [31] WU H, CHEN X, ZHANG M, *et al.* Versatile detection with CRISPR/Cas system from applications to challenges [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 135(1): 116150.
- [32] FUNG B, GOPEZ A, SERVELLITA V, *et al.* Direct comparison of SARS-CoV-2 analytical limits of detection across seven molecular assays [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(9): 1520–1535.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)