

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250110003

引用格式: 黄建飞, 陈晶, 张倩, 等. 基于重组酶聚合酶扩增-CRISPR/Cas12a 的沙门氏菌可视化检测方法的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 122-130.

HUANG JF, CHEN J, ZHANG Q, *et al.* Establishment of visual detection method for *Salmonella* based on recombinase polymerase amplification-CRISPR/Cas12a [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 122-130. (in Chinese with English abstract).

基于重组酶聚合酶扩增-CRISPR/Cas12a 的沙门氏菌可视化检测方法的建立

黄建飞, 陈晶*, 张倩, 肖承荣, 吴燕蕙, 赖心田

(深圳市计量质量检测研究院, 深圳 518131)

摘要: **目的** 建立基于重组酶聚合酶扩增-CRISPR/Cas12a 的沙门氏菌可视化检测方法。**方法** 本研究将重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术与成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 12a (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a, CRISPR/Cas12a)系统相结合, 以沙门氏菌 *invA* 作为目标基因, 设计并合成 RPA 引物和 CRISPR 引导 RNA (CRISPR-derived RNA, crRNA), 通过荧光法和试纸条两种方法读取结果。对优化的 RPA-CRISPR/Cas12 检测体系进行特异性和灵敏度实验, 并应用于食品样本检测。**结果** 本研究成功研制纳米金核酸试纸条, 建立的 RPA-CRISPR/Cas12a 体系可在 1.5 h 内特异性完成沙门氏菌的检测, 灵敏度为 80 CFU/mL。利用此方法对 21 个食品样本进行检测, 荧光法、试纸条法与国家标准法检测结果完全一致, 沙门氏菌检出率为 4.8%。**结论** 本研究建立的沙门氏菌 RPA-CRISPR/Cas12a 可视化检测方法具有高特异性和灵敏度, 在沙门氏菌的现场快速检测方面具有应用价值。

关键词: 沙门氏菌; 成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 12a; 试纸条; 重组酶聚合酶扩增; 可视化检测

Establishment of visual detection method for *Salmonella* based on recombinase polymerase amplification-CRISPR/Cas12a

HUANG Jian-Fei, CHEN Jing*, ZHANG Qian, XIAO Cheng-Rong, WU Yan-Hui, LAI Xin-Tian

(Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, Shenzhen 518131, China)

ABSTRACT: Objective To establish a visual detection method of *Salmonella* based on recombinant enzyme polymerase amplification-CRISPR/Cas12a. **Methods** In this study, recombinase polymerase amplification (PRA) was combined with clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a (CRISPR/Cas12a) system. RPA primers and CRISPR-derived RNA (crRNA) were designed and synthesized based on the target *invA* gene

收稿日期: 2025-01-10

基金项目: 深圳市科创计划资助项目(KCXFZ20211020165404007)

第一作者: 黄建飞(1988—), 男, 中级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: huangjianfei1988@163.com

*通信作者: 陈晶(1976—), 女, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: 59420435@qq.com

of *Salmonella*. Fluorescence and test strip methods were employed to read the results. The optimized RPA-CRISPR/Cas12 detection system were evaluated for specificity and sensitivity, and was applied to the detection of food samples. **Results** Nano gold test strip base on nucleic acid were developed. The established RPA-CRISPR/Cas12 detection method could specifically detecting *Salmonella* with a sensitivity of 80 CFU/mL within 1.5 h. Used this method to detect 21 kinds of food samples, the results from fluorescence and test strip read were consistent, with a *Salmonella* detection rate of 4.8%, which was completely consistent with the results of the national standard method. **Conclusion** The *Salmonella* RPA-CRISPR/Cas12a visual detection method established in this study has high specificity and sensitivity and is valuable for on-site rapid detection of *Salmonella*.

KEY WORDS: *Salmonella*; clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a; test strip; recombinase polymerase amplification; visual detection

0 引言

沙门氏菌是一种革兰氏阴性肠杆菌, 生存能力强, 营养需求低, 广泛存在于自然环境中。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)公布的数据显示, 沙门氏菌是全球范围内食源性疾病爆发的主要诱因, 全球每年有超过 1 亿人感染, 对人类健康构成重大威胁, 常见的临床表现有发热、腹痛、腹泻、发烧、恶心、呕吐等, 严重的会导致休克死亡^[1-3]。美国疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)估计沙门氏菌每年造成约 135 万人感染, 26500 人住院, 420 人死亡^[4]。2023 年欧盟报告了 77486 例人类感染沙门氏菌病例, 发病率约为每 10 万人中有 18 例, 沙门氏菌是欧盟第二大食源性致病菌, 仅次于弯曲杆菌^[5]。YUE 等^[6]研究评估中国非伤寒沙门氏菌的发病率为每 10 万人 626.6 例。因此, 沙门氏菌是食源性致病菌的重点监控对象, 对其进行准确、快速检测是预防和控制沙门氏菌病的有效手段。

目前, 实验室主要通过传统的生化分离法检测食品中的沙门氏菌, 耗时长, 需要 4~7 d, 不适合沙门氏菌的快速检测。随着技术的发展, 开发出各种食源性致病菌快速检测技术, 如免疫学、分子生物学、生物传感器等技术。基于核酸水平的分子生物学方法因具有灵敏度高、特异性强、快速等优点被广泛用于沙门氏菌的检测, 如聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[7]、多重 PCR^[8]、荧光定量 PCR^[9]、数字 PCR (digital PCR, dPCR)^[10]等。PCR 技术需要昂贵的仪器, 不适合缺少设备的基层实验室以及现场检测。基于核酸检测的等温扩增技术如重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)^[11]和环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[12]是在等温条件下工作的方法, 不需要价格昂贵的仪器, 对现场检测具有重要的意义, 但扩增产物需要后续凝胶电泳进行分析, 难以真正实现快速检测。因此, 需要开发更简单、更方便和更少依赖仪器的技术来实现在现场条件下进行沙门氏菌的即时诊断。

成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein, CRISPR-Cas)系统是古细菌和细菌长期进化形成的免疫防疫系统, 具有高效特异序列识别及切割活性, 基因编辑功能强大, 为食源性致病菌的快速、特异、精准检测提供了一种新的技术, 根据 Cas 效应蛋白类型的不同可将 CRISPR-Cas 分为两类^[13]。Cas13 和 Cas12a 属于第二类, 两者相同之处是它们都具有非特异性切割活性, 不同之处是 Cas12a 在 crRNA 的引导下识别靶标 DNA, 激发非特异性切割 ssDNA 的活性, 而 Cas13 在 CRISPR 引导 RNA (CRISPR-derived RNA, crRNA)的引导下识别靶标 RNA, 激发非特异性切割单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA)的活性, 这种不加区分的切割能力使 CRISPR-Cas 成为信号放大和输出的重要工具, 例如以荧光团和淬灭剂标记的 ssDNA 作为报告。虽然 CRISPR-Cas 系统可以利用反式裂解活性方法信号, 但其灵敏度不足以直接检测出致病菌, 结合 RPA 可构建一种高特异性、高灵敏度的方法, 目前基于 RPA 和 CRISPR-Cas 技术结合的系统在检测核酸方面具有巨大的潜力。CHEN 等^[14]将 CRISPR-Cas12a 与 RPA 相结合, 开发了一种基于 CRISPR 的诊断方法, 简称为 DETECTR 系统。该技术应可应用于人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV)检测, 能够有效区分 HPV16 和 HPV18 人乳头瘤病毒。GOOTENBERG 等^[15]将 CRISPR-Cas13a 与 RPA 相结合, 利用荧光探针作为信号输出, 建立了 SHERLOCK 系统。近年来, 研究者将 RPA 与 CRISPR/Cas12a 结合实现目的基因进行双重特异性识别, 极大地提高检测特异性和灵敏度, 在细菌、病毒、支原体、转基因生物、寄生虫等检测领域具有广阔的前景^[16]。

本研究采用 RPA 与 CRISPR-Cas12 技术相结合开发出沙门氏菌的快速检测方法, 特异性基因经过 RPA 扩增后, Cas12a 蛋白在 crRNA 介导下特异性结合扩增产物, 通过荧光和侧流层析试纸条两种方法进行结果判读, 优化建立的 RPA/CRISPR-Cas12a 检测体系, 为食品中沙门氏菌的快速可视化检测提供新的技术。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鸡爪、牛肉、猪肉脯、鸡蛋、鸭肉、方便面、鸡腿、牛奶等检测样品来自深圳市商场。

DNA 片段纯化试剂盒、细菌基因组提取试剂盒(型号: 9763)、DNA Marker[宝日医生物技术(北京)有限公司]; 聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)背板、结合垫、样品垫、吸收垫、硝酸纤维素膜(德国 Millipore 公司); RPA 基础扩增试剂盒(英国 TwistDX 公司); EnGen Lab Cas12a(美国 NEB 公司); 营养肉汤培养基(北京陆桥技术有限公司); 牛血清蛋白、氯金酸、链霉亲和素(美国 Sigma 公司); 实验用菌株见表 1; 实验用核酸序列见表 2[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 仪器与设备

BAX Q7 全自动病原微生物检测系统(美国 DuPont 公司); GelDoc XR+凝胶成像系统、Powerpac Universal 电泳仪、C1000 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司); XYZ3060 胶体金试纸条三维喷金划膜仪(美国 Biodot 公司); HGS201 可编程切条机(杭州峰航科技有限公司); LA2-6A1 生物安全柜(新加坡 Esco 公司); INE600 培养箱(德国 Memmert 公司)。

1.3 RPA 引物和 crRNA 的设计与筛选

根据 RPA 引物设计原则, 以沙门氏菌 *invA* 基因(GenBank 号: AE014613.1)设计特异性扩增引物, 选取 RPA 扩增结果特异性强且条带明亮引物所在的基因序列区域设计 crRNA。根据不同实验方法设计 ssDNA, 荧光法 5'端标记 FAM 荧光基团, 3'端标记 BHQ1 淬灭剂, 试纸条法两端无修饰。

表 1 实验用菌株
Table 1 Strains used in the study

序号	菌株名称	菌株编号	序号	菌株名称	菌株编号
1	肠炎沙门氏菌	CMCC(B)50335	9	蜡样芽胞杆菌	ATCC2
2	鼠伤寒沙门氏菌	ATCC14028	10	枯草芽胞杆菌	ATCC9372
3	大肠埃希氏菌 O157	ATCC43895	11	弗氏柠檬酸杆菌	ATCC43864
4	单核细胞增生李斯特氏菌	CICC21662	12	肺炎克雷伯氏菌	ATCC4352
5	福氏志贺氏菌	CICC21534	13	普通变形杆菌	ATCC6380
6	副溶血性弧菌	CICC21617	14	大肠埃希氏菌	ATCC25922
7	金黄色葡萄球菌	ATCC6538	15	粘质沙雷氏菌	ATCC14041
8	唐菖蒲伯克霍尔德氏菌	CICC10574			

注: 1. CMCC(B)编号菌株来源于中国医学菌种保藏管理中心; 2. CICC 编号菌株来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心; 3. ATCC 编号菌株来源于美国模式菌种收集中心。

表 2 实验用核酸序列
Table 2 DNA sequence used in the study

名称	序列(5'-3')
RPA1-F	AGTGCTCGTTTACGACCTGAATTACTGATTCTGGT
RPA1-R	TTAACAGTACCGCAGGAAACGTTGAAAACTGAG
RPA2-F	TCTGGGTAACGCATGAAGAGGGGGAGAAAC
RPA2-R	GATATACGTTGTACCGTGGCATGTCTGAGCACTTC
RPA3-F	GCATTGTGGGCGCCAAGAGAAAAAGATGTCATTA
RPA3-R	CGGGTCAAGGCTGAGGAAGGTAAGTCCAGAG
RPA4-F	GTCATTCCATTACCTACCTATCTGGTTGATTTC
RPA4-R	GCATCGGCTTCAATCAAGATAAGACGACTGGT
RPA5-F	ATGCCGGTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAATTC
RPA5-R	CGCGCAGCATCCGCATCAATAATACCGGCCTTCA
crRNA1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUCGUUAAUACAAAGGUUCA
RPA6-F	GCTCGCATTGTGGGCGCCAAGAGAAAAAGATG
RPA6-R	TCCGGGTCAAGGCTGAGGAAGGTAAGTCCAGAG
crRNA2	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCCAUAAAUUCGCCAAUGGCG
FB-ssDNA	AGTACCGATAGATACAGAC
FQ-ssDNA	FAM-AGTACCGATAGATACAGAC-BHQ
AP	SH-TTTTTTTTGTCTGTAT
TCP	CTATCGGTAAGTACTATACA-Biotin
CCP	Biotin-ATACAGAC

1.4 基因组提取

将表 1 中 2 株沙门氏菌和 13 株非沙门氏菌分别接种到营养肉汤培养基中, 37 °C 培养 24 h, 用细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组, 置于 -20 °C 保存。对于灵敏度检测实验, 采用水煮法提取菌株基因组, 取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 8000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清; 加入 100 μ L 无菌水, 将细菌重悬于无菌水中, 100 °C 加热 10 min, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清保存于 -20 °C 备用。

1.5 纳米金核酸试纸条的制备

纳米金粒子(gold nanoparticles, AuNPs)根据 LI 等^[17]建立的方法制备, 利用冷冻法将 DNA 连接在 AuNPs 上。取 100 μ L AuNPs 与 20 μ L AP 探针(100 μ mol/L)混合, -80 °C 冷冻 15 min, 取出后室温解冻, 10000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 45 μ L AuNP-DNA 复溶液复溶(20 nmol/L Na₃PO₄+5% BSA+0.25% Tween-20+10%蔗糖), 制备 AuNP-AP。

试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬 5 部分组成, 其中样品垫和结合垫根据张倩^[18]建立的方法进行处理。将 20 μ L 链霉亲和素(streptavidin, SA)分别与 20 μ L TCP 探针(100 μ mol/L)和 20 μ L CCP 探针(100 μ mol/L)混合并孵育 1 h, 然后用划线器以 1 μ L/cm 的速度分别将 SA-TCP 和 SA-CCP 混合物喷洒在硝酸纤维素膜上, 形成测试线 TL 和质控线 CL。37 °C 烘箱中干燥 1 h, 将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫按照顺序组装在和 PVC 背衬上, 使用可编程切条器将其切割成宽度为 3 mm 的成品备用。

1.6 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系建立和优化

RPA 扩增体系(50 μ L): 将 29.5 μ L Twist Amp 再水化液、11.2 μ L 无菌水、上下游引物(10 μ mol/L)各 2.4 μ L 加入至离心管中, 混合后加入到 RPA 酶冻干粉中, 充分溶解后加入 2 μ L 样品 DNA, 再加入 2.5 μ L 醋酸镁(280 mmol/L), 混匀后放入恒温反应器中, 39 °C 加热 20 min。RPA 反应结束后, 采用胶回收试剂盒回收扩增产物, 取 5 μ L 进行电泳。

CRISPR-Cas12 荧光检测体系(20 μ L): 2 μ L NEBuffer 2.1 (10 \times), 2 μ L Cas12a (1 μ mol/L), 2 μ L crRNA (1 μ mol/L), 2.5 μ L RPA 扩增产物, 0.8 μ L 荧光报告分子 FQ-ssDNA (5 μ mol/L), 用无菌水补足至 20 μ L, 将配制好的体系离心混匀, 转移到全自动病原微生物检测系统中, 反应温度 37 °C, 每隔 1 min 采集一次荧光, 测量实时荧光曲线。

CRISPR-Cas12a 试纸条检测体系(100 μ L): 2 μ L NEBuffer 2.1 (10 \times), 2 μ L Cas 12a (1 μ mol/L), 2 μ L crRNA (1 μ mol/L), 2.5 μ L RPA 扩增产物, 2 μ L 试纸条报告分子 FB-ssDNA (5 μ mol/L), 用无菌水补足至 20 μ L, 将配制好的体系离心混匀放入便携式恒温反应器中, 于 37 °C 孵育 30 min。反应完毕后加入 80 μ L 缓冲液(4 \times SSC+1% BSA+0.05% Tween 20), 混匀后把试纸条的样品端浸于溶液中, 其中 2.5 μ L AuNP-AP 预先滴到试纸条的结合垫上,

观察控制条带和检测条带的强弱。

CRISPR-Cas12a 荧光检测体系优化: 对 Cas12a 和 crRNA 的浓度比例进行优化, 保持体系中 Cas12a 的浓度为 100 nmol/L, crRNA 的浓度为 50、100、150 和 200 nmol/L, 使其 Cas12a:crRNA 比例为 1:0.5、1:1、1:2 和 1:3 共计 4 个比例, 其他件不变, 以无菌水为阴性对照, 观察荧光强度变化情况。对 Cas12a 和 crRNA 的浓度进行优化, 设置 CRISPR 体系中 Cas12a 与 crRNA 的浓度分别为: ① 50 nmol/L 和 50 nmol/L; ② 100 nmol/L 和 100 nmol/L; ③ 150 nmol/L 和 150 nmol/L; ④ 200 nmol/L 和 200 nmol/L, 其他条件不变, 以无菌水为阴性对照, 观察荧光强度变化情况。

CRISPR-Cas12a 试纸条检测体系优化: 针对试纸条报告分子浓度进行优化, 保持体系中 Cas12a 和 crRNA 的浓度为 100 nmol/L, 加入 5 个试纸条报告分子浓度, 使其在 100 μ L 检测体系(20 μ L 反应体系+80 μ L 缓冲液)中终浓度分别为 50、100、150、200 和 300 nmol/L, 其他条件保持不变, 以无菌水为阴性对照, 观察不同条件下控制条带和检测条带的强弱。

1.7 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性

选取表 1 中的 15 株菌株进行 RPA-CRISPR/Cas12a 检测方法的特异性实验。将提取的基因组作为 RPA 模板, 扩增结束后后将 RPA 产物加入到优化的 CRISPR/Cas12a 检测体系中, 通过荧光和试纸条两种方法判读检测结果。

1.8 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系灵敏度

将鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 接种到营养肉汤培养基中, 37 °C 培养 18 h, 对菌悬液进行 10 倍梯度稀释(稀释梯度 10⁻¹~10⁻⁶), 同时对各梯度进行平板计数。吸取 1 mL 各梯度菌液提取基因组 DNA, 取 2 μ L DNA 作为模板进行 RPA-CRISPR/Cas12a 检测, 确定方法的灵敏度, 通过荧光和试纸条两种方法判读检测结果。

1.9 实际样品检测

在市场随机购买 21 份市售样品为检测样本, 分别取 25 g 样品, 加入盛有 225 mL BPW 增菌液的无菌袋中, 36 °C 培养 18 h, 取 1 mL 增菌液, 采用水煮法提取基因组 DNA, 用本研究所建立的方法进行检测; 同时使用 GB 4789.4—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验沙门氏菌检验》进行检测, 对 2 种方法的检测结果进行对比分析, 进一步验证所建立方法的准确性和实际应用效果。

1.10 数据处理

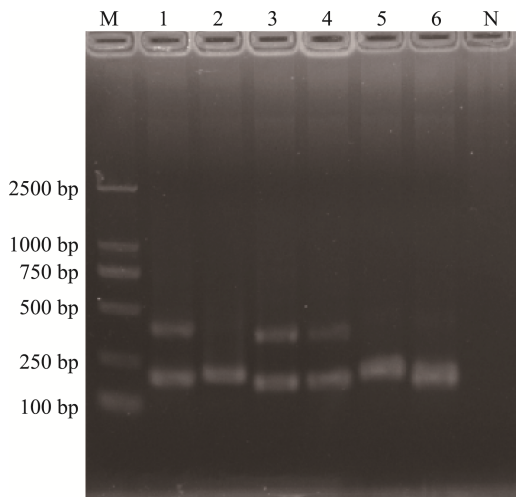
本研究的所有图像均采用 SmartDraw 7 进行处理, 采用 Excel 2019 进行表格制作。

2 结果与分析

2.1 RPA 引物与 crRNA 的筛选

设计的 6 对引物分别为 RPA1-F/R、RPA2-F/R、

RPA3-F/R、RPA4-F/R、RPA5-F/R 和 RPA6-F/R, 对应目标片段长度为 196、220、195、200、229 和 201 bp。结果显示(图 1), 6 对引物都能扩增出与目的条带大小相符的 DNA 片段, 其中 RPA5 和 RPA6 引物的扩增产物单一且条带明亮, 扩增效率最高; RPA1、RPA3 和 RPA4 引物的扩增产物存在非特异性扩增条带, RPA2 扩增产物单一但条带亮度不够。根据 RPA5 和 RPA6 引物所在的序列设计 crRNA1 和 crRNA2, 将 RPA 引物与 crRNA 搭配: RPA5-crRNA1 和 RPA6-crRNA2 进行检测, 结果显示 RPA5-crRNA1 起峰时间和荧光曲线均优于 RPA6-crRNA2(图 2), 因此, 本研究选取 RPA5-crRNA1 作为后续实验。



注: M. DNA Marker; 1. RPA1产物; 2. RPA2产物; 3. RPA3产物; 4. RPA4产物; 5. RPA5产物; 6. RPA6产物; N. 阴性对照。

图1 RPA扩增结果

Fig.1 Results of PRA amplification

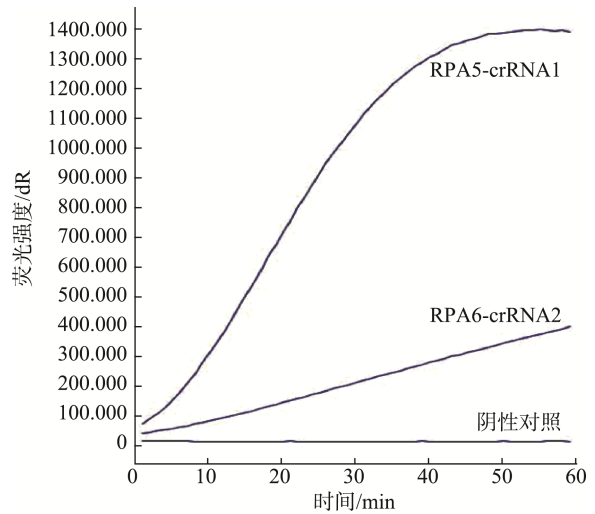


图2 RPA引物与crRNA搭配的筛选

Fig.2 Screening of RPA primers with crRNA

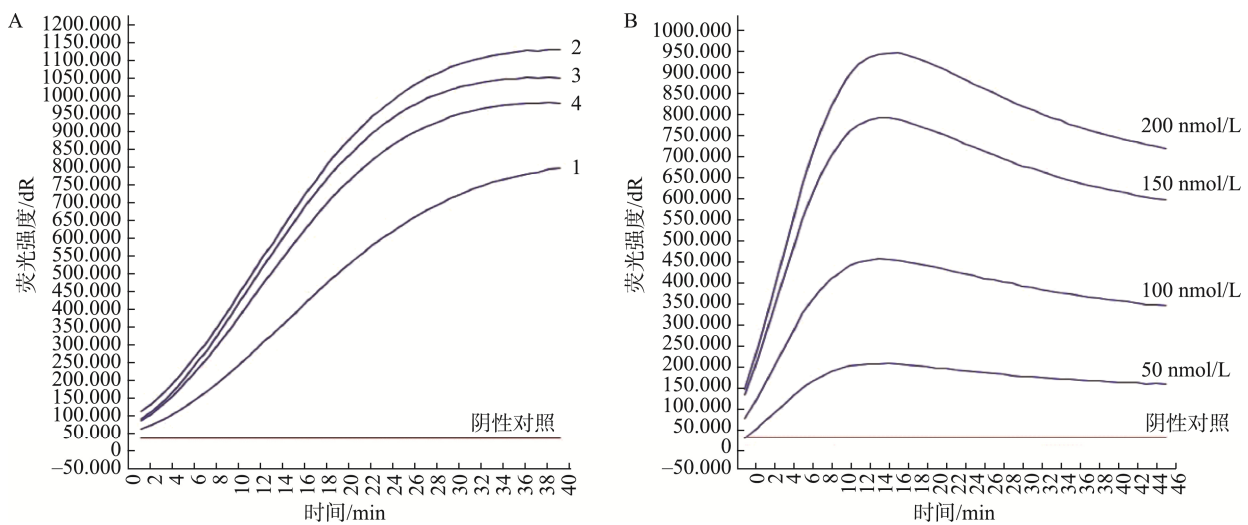
2.2 CRISPR-Cas12a 检测体系优化

2.2.1 Cas12a 和 crRNA 的浓度比例优化

反应体系中 Cas12a 和 crRNA 的浓度比例对 CRISPR-Cas12a 荧光检测强度的实验结果(图 3A)显示, Cas12a:crRNA=1:0.5 下荧光强度较低, Cas12a:crRNA=1:1 下荧光强度较高, 产生的荧光信号最为明显, 本研究选取 Cas12a 和 crRNA 的浓度比为 1:1 用于后续实验。

2.2.2 Cas12a 和 crRNA 浓度优化

反应体系中 Cas12a 和 crRNA 浓度对荧光强度的实验结果(图 3B)显示, 荧光信号随着 Cas12a 与 crRNA 浓度的增加而增强, 在 Cas12a 和 crRNA 分别为 100 nmol/L 时效果已非常明显, 能满足实验要求, 故以 Cas12a 和 crRNA 浓度分别为 100 nmol/L 和 100 nmol/L 进行后续实验。



注: A. Cas12a和crRNA的浓度比例对荧光强度的影响; B. Cas12a和crRNA的浓度对荧光强度的影响; 1. Cas12a:crRNA=1:0.5; 2. Cas12a:crRNA=1:1; 3. Cas12a:crRNA=1:2; 4. Cas12a:crRNA=1:3。

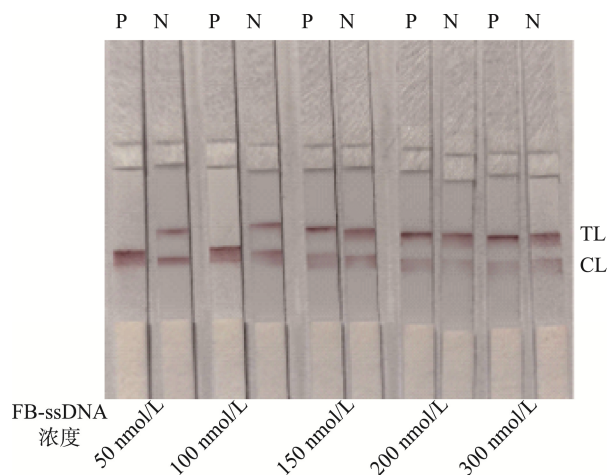
图3 CRISPR-Cas12a荧光检测体系优化

Fig.3 Optimization of CRISPR-Cas12a fluorescence detection system

2.2.3 试纸条报告分子浓度进行优化

试纸条检测是基于 Cas12a 反式切割活性切割体系中的 FB-ssDNA, 当有沙门氏菌存在时, 其 RPA 产物会激活 Cas12a 的反式切割活性, 导致 FB-ssDNA 被切断, 从而使 AuNP-AP 不能通过 FB-ssDNA 连接到 TL 上, 即 TL 上不显红色。当不存在沙门氏菌时, 不能激活 Cas12a 的反式切割活性, 体系中的 FB-ssDNA 完整存在, 其 3'端可以与 AuNP-AP 互补配对形成稳定的双链, 其 5'端可以与 TL 上的 TCP 探针互补配对, 从而引导 AuNP-AP 探针结合到 TL 上, TL 显红色。如果只出现 CL 线, 说明体系中的 FB-ssDNA 被完全切割, 判为存在目标产物; 如果同时出现 CL 线和 TL 线且样本 TL 线比对照组颜色浅, 说明 FB-ssDNA 部分被切割, 判为存在目标产物; 如果同时出现 CL 线和 TL 线且样本 TL 线跟对照组颜色强度相近, 说明 FB-ssDNA 未被切割, 判为不存在目标产物。

CRISPR-Cas12a 试纸条报告分子浓度优化结果(图 4)显示, 随着 FB-ssDNA 浓度的增加, 阴性对照和阳性组的 TL 线都逐渐变红, 其中浓度在 150 nmol/L 以上时阳性组不能完全切割, 浓度为 50 nmol/L 时试纸条 TL 线较淡, 容易出现假阳性结果, 最终选择浓度为 100 nmol/L 作为试纸条报告分子最优浓度。



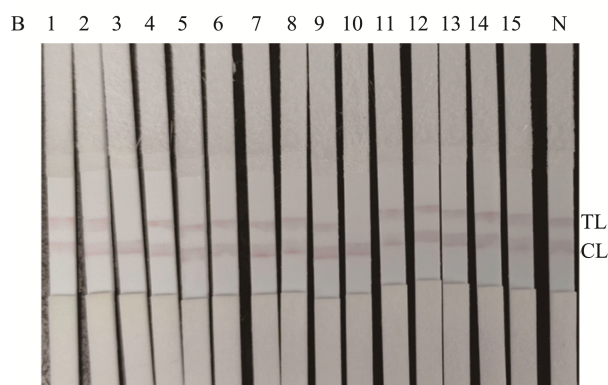
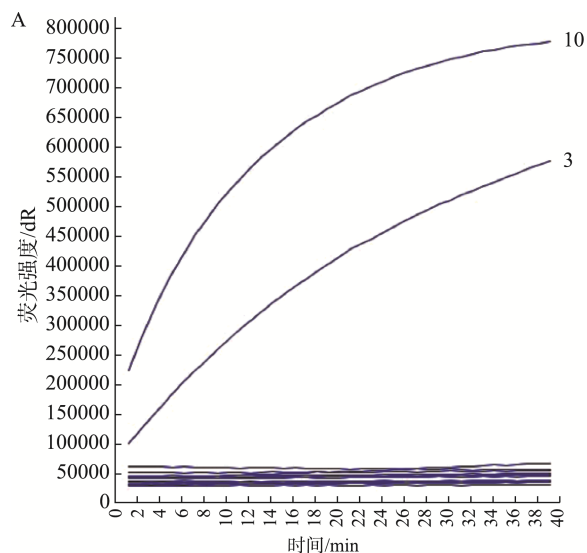
注: N. 阴性对照, 下同; P. 阳性组。

图4 试纸条报告分子浓度优化

Fig.4 Optimization of lateral flow strips reporter concentration

2.3 RPA-Cas12a 检测方法的特异性实验

荧光检测法和测流层析试纸条检测结果(图 5)显示, 本研究建立的 RPA-CRISPR/Cas12a 检测方法能够检测出沙门氏菌, 荧光检测法结果(图 5A)显示沙门氏菌出现明显的荧光信号, 其他菌株则无明显荧光信号。侧流层析试纸条检测结果(图 5B)显示, 沙门氏菌只出现质控线, 未出现检测线, 其他菌株同时出现质控线和检测线, 且样品检测线跟阴性对照检测线颜色强度接近, 表现为阴性。结果表明本检测体系中的引物与其他病原核酸无交叉反应, 特异性强。



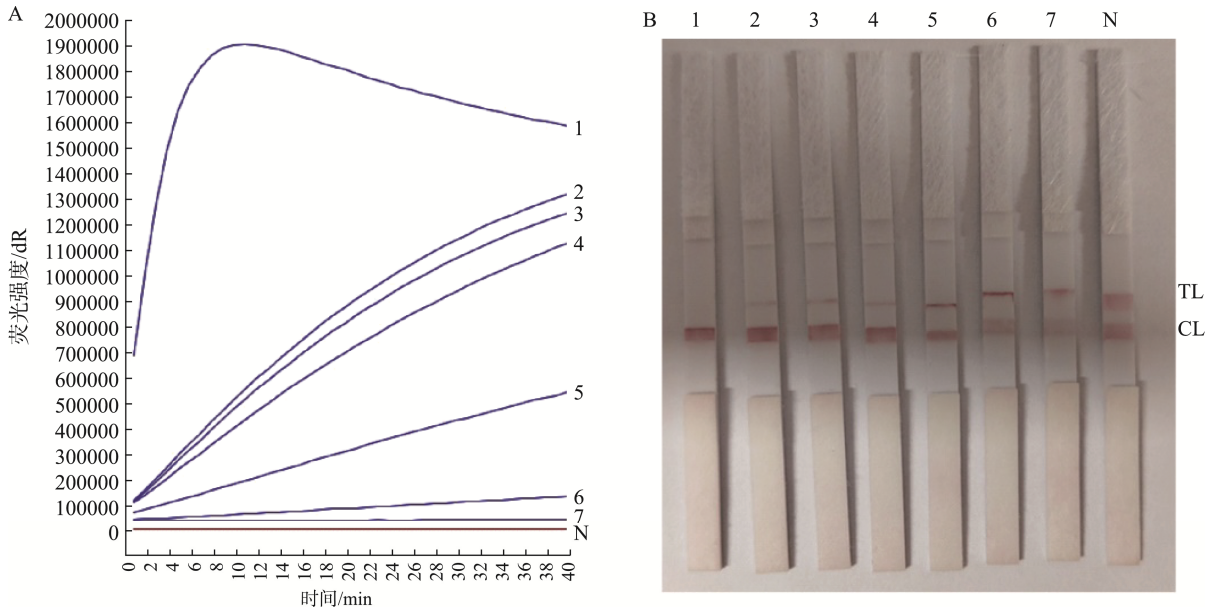
注: A. 荧光检测法; B. 试纸条检测法, 下同; 1. 大肠埃希氏菌O157; 2. 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌; 3. 鼠伤寒沙门氏菌; 4. 福氏志贺氏菌; 5. 大肠埃希氏菌; 6. 普通变形杆菌; 7. 枯草芽胞杆菌; 8. 蜡样芽胞杆菌; 9. 金黄色葡萄球菌; 10. 肠炎沙门氏菌; 11. 单核细胞增生李斯特氏菌; 12. 副溶血性弧菌; 13. 弗氏柠檬酸杆菌; 14. 肺炎克雷伯氏菌; 15. 粘质沙雷氏菌。

图5 RPA/CRISPR-Cas12a检测方法的特异性

Fig.5 Specificity of RPA/CRISPR-Cas12a detection method

2.4 RPA-Cas12a 检测方法的灵敏度实验

菌落计数测定菌株沙门氏菌菌悬液的初始浓度为 8×10^6 CFU/mL, 10 倍梯度稀释对应的各稀释度菌悬液浓度理论上分别为 8×10^5 、 8×10^4 、 8×10^3 、 8×10^2 、80 和 8 CFU/mL。用优化的 RPA/CRISPR-Cas12a 荧光法检测时, 梯度为 80 CFU/mL 能生可被检测的荧光信号, 8 CFU/mL 无法检测到荧光信号(图 6A), 表明 RPA/CRISPR-Cas12a 荧光法的灵敏度为 80 CFU/mL。试纸条结果(图 6B)显示随着菌量浓度的增加, TL 红色逐渐变淡, 与阴性相比, 其相对颜色强度变化越来越明显, 当浓度为 80 CFU/mL 时与阴性对比 TL 条带有弱的检测带, 表明 CRISPR-Cas12a 试纸条的灵敏度为 80 CFU/mL, 与 RPA/CRISPR-Cas12a 荧光法灵敏度一致。



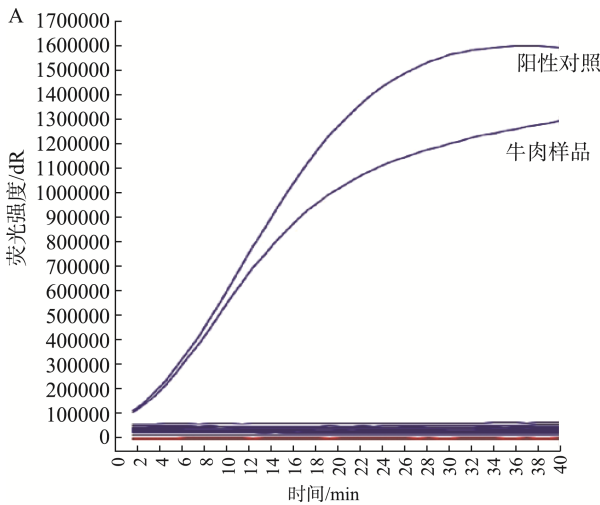
注: 1. 8.0×10⁶ CFU/mL; 2. 8.0×10⁵ CFU/mL; 3. 8.0×10⁴ CFU/mL;
4. 8.0×10³ CFU/mL; 5. 8.0×10²CFU/mL; 6. 80 CFU/mL;7. 8 CFU/mL。

图6 RPA/CRISPR-Cas12a 检测方法的灵敏度

Fig.6 Sensitivity of RPA/CRISPR-Cas12a detection method

2.5 样品检测

采用本研究中建立的荧光方法和试纸条法对 21 个样品进行检测, 结果表明荧光方法(图 7)、试纸条法跟国家标准法检测结果一致, 检出 1 份阳性样品(编号 7), 检出率为 4.8%, 表明本研究所建立的方法可用于食品的检测。



注: 1~21. 样品编号。

图7 样品检测结果

Fig.7 Detection results of samples

3 讨论

沙门氏菌是导致食物微生物中毒的重要要因, 目前国内外标准规定 25 g 食品中不得含有沙门氏菌。基于核酸的检测方法因特异性强、灵敏度高而被广泛使用, 常用的靶标有 *invA*^[19]、*fimY*^[20]、*rjbs*^[21]、*sefA*^[22]、*viaB*^[23]、*fliC*^[24] 等, 其中研究最多基因是 *invA*。RPA 是一种等温扩增技术, 不需要复杂仪器即可完成扩增, 但会出现非特异性扩增问题, 该技术对温度波动较为敏感, 最佳反应温度在 37~42 °C。CHEN 等^[25]建立了基于 RPA 荧光探针的沙门氏菌检测方法, 菌液检测灵敏度为 2.2×10³ CFU/mL, 灵敏度有进一步提升空间。随着检测技术的不断革新, CRISPR/Cas 系统由于具有极高的灵敏度与特异性, 在核酸检测领域逐渐显示出巨大优势, 并被誉为 2022 年最受瞩目的 7 项技术之一^[26]。将 RPA 技术跟 CRISPR/Cas 相结合既可以避免 RPA 的非特异性扩增, 又可以提高检测的灵敏度, 在现场检测方面具有巨大的潜力, 基于 CRISPR-Cas 快速检测技术将会是未来分子诊断领域重要研究方向之一。

本研究成功建立 RPA-CRISPR/Cas12a 可视化检测方法, 整个过程可在 1.5 h 内完成。通过筛选 RPA 引物和 crRNA 得到最佳的引物组合 RPA5-crRNA1, 保证了检测方法的特异性和准确性。CRISPR/Cas12a 检测体系中 Cas12a 和 crRNA 的浓度决定了同源重组解离酶 C (recombination uv repair C, RuvC)活性剪切位点的数量和反式裂解的性能, 体系优化结果为 Cas12a 和 crRNA 浓度分别为 100 nmol/L, 浓度比例为 1:1, 基于荧光法检测的菌液灵敏度为 80 CFU/mL。

LIU 等^[27]建立基于 *FimY* 基因 RPA-CRISPR/Cas12a 荧光法检测沙门氏菌, Cas12 和 crRNA 浓度分别为 100 nmol/L, 菌液的检出限为 10^2 CFU/mL。MAO 等^[28]将 RPA 与 CRISPR-LbCas12a 相结合建立一种 RPA-LbCas12a-TTECDs 荧光法检测沙门氏菌, 该方法可在 1 h 特异性检测出 50 CFU/mL 的沙门氏菌。HIGGINSON 等^[23]建立了基于荧光定量 PCR 的鼠伤寒沙门氏菌检测方法, 该方法特异性强, 灵敏度为 7.4×10^2 CFU/mL。本研究基于荧光法检测特异性强、菌液灵敏度为 80 CFU/mL, 较 CHEN 等^[25]建立的 RPA 荧光方法灵敏度提升 2 个数量级, 证实了 RPA 与 CRISPR/Cas 结合可提高检测灵敏度。

侧流层析试纸条是一种纸基平台的生物传感器, 具有快速简单、特异性强、成本低等特点而被广泛用于食品、医疗、环境等领域。目前, 已有商业化的 CRISPR/Cas 专用试纸条用于检测领域, 主要是基于抗体技术, 但价格相对昂贵, 不利于控制成本^[29-30]。本研究将核酸探针技术与纳米金层析技术相结合, 成功研制一种基于核酸探针的侧流层析试纸条, 并应用于核酸检测中。本研究采用建立的 CRISPR/Cas12a 试纸条方法特异性强, 该方法与其他致病菌无交叉反应。灵敏度为菌液灵敏度为 80 CFU/mL。FU 等^[31]分别利用地高辛和生物素修饰肠炎沙门氏菌的特异性上下游引物, RPA 扩增目标产物后利用试纸条检测, 该方法检出限为 91.4 CFU/mL。SN/T5439.1—2022《出口食品中食源性致病菌快速检测方法 PCR-试纸条法》第 1 部分: 沙门氏菌建立 PCR-试纸条法快速检测沙门氏菌, 在上游和下游引物中分别标记地高辛和异硫氰酸, 扩增后跟试纸条上进行结合标准中规定的最低检出限为 10^2 CFU/mL。本研究方法的最低检出限低于该标准, 具有更高的灵敏度, 达到标准检测水平, 可用于沙门氏菌的检测。

4 结 论

本研究成功制备基于核酸探针的侧流层析试纸条并建立沙门氏菌 RPA-CRISPR/Cas12a 可视化检测方法。该方法特异性强、灵敏度高、简单快速, 1.5 h 内完成检测, 可利用便携式荧光检测仪或侧流层析试纸条读取结果, 不需要大型设备, 适用于基层检测机构, 有助于向现场检测发展, 具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] SHEN YF, XU LZ, LI YB. Biosensors for rapid detection of *Salmonella* in food: A review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(1): 149–197.
- [2] WNAG ML, ZHANG YL, TIAN FY, *et al.* Overview of rapid detection methods for *Salmonella* in foods: Progress and challenges [J]. *Foods*, 2021, 10: 2402.
- [3] MATI R, SILVIA B, MIHKEL M, *et al.* *Salmonella enterica* prevalence, serotype diversity, antimicrobial resistance and control in the European pork production chain [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2023, 131: 210–219.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* [EB/OL]. (2024-10-03) [2024-10-12]. <https://www.cdc.gov/Salmonella/index.html>
- [5] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union one health 2023 zoonoses report [J]. *EFSA Journal*, 2024, 22(12): e9106.
- [6] YUE M, SONG HH, LI B. Call for issue papers: Food safety in China: Current practices and future needs [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2020, 17(5): 295.
- [7] KHAN AB, SAHIR KH, AHMED M, *et al.* Rapid detection of *Salmonella* in food samples by polymerase chain reaction after a 10h pre-enrichment [J]. *Journal of Food Safety*, 2014, 34(1): 79–86.
- [8] FAHAD K, DEREK P, ZOE D, *et al.* Multiplex PCR assay to detect high risk lineages of *Salmonella typhi* and *Paratyphi A* [J]. *PloS One*, 2022, 17(7): e0267805.
- [9] CHANEY WE, ENGLISHBEY AK, STEPHENS TP, *et al.* Application of a commercial *Salmonella* real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Salmonella enterica* in poultry ceca [J]. *Journal of Food Protection*, 2022, 85(3): 527–533.
- [10] VELEZ FJ, KANDULA N, BLECH-HERMONI Y, *et al.* Digital PCR assay for the specific detection and estimation of *Salmonella* contamination levels in poultry rinse [J]. *Current Research in Food Science*, 2024, 9: 100807.
- [11] CHEN YX, HU YX, LU XN. Polyethersulfone-based microfluidic device integrated with DNA extraction on paper and recombinase polymerase amplification for the detection of *Salmonella enterica* [J]. *ACS Sensors*, 2023, 8(6): 2331–2339.
- [12] GE BL, DOMESLE KJ, YANG QR, *et al.* Multi-laboratory validation of a loop-mediated isothermal amplification method for screening *Salmonella* in animal food [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 562.
- [13] 寇秀颖, 周宝青, 陈玲, 等. CRISPR/Cas 系统在食源性致病菌快速检测新技术中的研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(7): 313–323.
KOU XY, ZHOU BQ, CHEN L, *et al.* Progress in the rapid detection of foodborne pathogens based on CRISPR/Cas [J]. *Food Science*, 2023, 44(7): 313–323.
- [14] 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.
- [15] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, LEE JW, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438–442.
- [16] 王文涛, 赵良, 侯立功, 等. RPA-CRISPR/Cas12a 在病原微生物检测中的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(8): 2785–2796.
WANG WT, ZHAO L, HOU LG, *et al.* Research progress of RPA-CRISPR/Cas12a in the detection of pathogenic microorganisms [J]. *Microbiology China*, 2024, 51(8): 2785–2796.
- [17] 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]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1127: 217–224.
- [18] 张倩. 纸基生物传感集成装置应用于食品真实性现场检测的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2022.
- ZHANG Q. Research on the application of paper-based biosensing integrated device in on-site detection of food authenticity [D]. Beijing: China Agricultural University, 2022.
- [19] LEE SY, OH SW. Point-of-care diagnostic system for viable *Salmonella* species via improved propidium monoazide and recombinase polymerase amplification based nucleic acid later [J]. *Diagnostics*, 2024, 14(8): 831.
- [20] YEH KS, CHEN TH, LIAO CW, *et al.* PCR amplification of the *Salmonella typhimurium fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78(3): 227–234.
- [21] JEON S, EO SK, KIM Y, *et al.* Capillary and microchip gel electrophoresis for simultaneous detection of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* by *rfbS* allele-specific PCR [J]. *Talanta*, 2007, 73(3): 415–419.
- [22] HU LJ, STONES R, BROWN EW, *et al.* DNA sequences and predicted protein structures of *prot6E* and *sefA* gene for *Salmonella* ser. Enteritidis detection [J]. *Food Control*, 2019, 96: 271–280.
- [23] HIGGINSON EE, NKEZE J, PEMALA-BOOTH J, *et al.* Detection of *Salmonella typhi* in bile by quantitative real-time PCR [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(3): e0024922.
- [24] 李丹, 袁梦君, 王旭, 等. 鼠伤寒沙门氏菌 CRISPR/Cas12a 检测方法的建立与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(12): 143–150.
- LI D, YUAN MJ, WANG X, *et al.* Establishment and application of CRISPR/Cas12a assay for the detection of *Salmonella typhimurium* [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(12): 143–150.
- [25] CHEN JP, LIU XQ, CHENJ, *et al.* Development of a rapid test method for *Salmonella enterica* detection based on fluorescence probe-based recombinase polymerase amplification [J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(8): 1791–1798.
- [26] EISENSTEIN M. Seven technologies to watch in 2022 [J]. *Nature*, 2022, 601(7894): 658–661.
- [27] LIU L, ZHAO G, LI XM, *et al.* Development of rapid and easy detection of *Salmonella* in food matrices using RPA-CRISPR/Cas12a method [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 162: 113443.
- [28] MAO X, ZHAO Y, JIANG J, *et al.* Sensitive and high-accuracy detection of *Salmonella* based on CRISPR/Cas12a combined with recombinase polymerase amplification [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2022, 75(4): 899–907.
- [29] 负紫光, 魏勇, 张建, 等. 基于核酸扩增-侧流层析试纸的食源性致病细菌快速检测研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 412–425.
- YUN ZG, WEI Y, ZHANG J, *et al.* Advances in the rapid detection of foodborne pathogens by nucleic acid amplification lateral flow assays [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(5): 412–425.
- [30] 周梦婕, 李小盼, 代荣阳, 等. 免疫层析试纸条检测技术的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(22): 3382–3386.
- ZHOU MJ, LI XP, DAI RY, *et al.* Research progress of immunochromatographic test strip detection technology [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2019, 16(22): 3382–3386.
- [31] FU Q, YUAN L, CAO F, *et al.* Lateral flow strip biosensor based streptavidin-coated gold nanoparticles with recombinase polymerase amplification for the quantitative point-of-care testing of *Salmonella* [J]. *Microchemical Journal*, 2021, 171(3): 106859.

(责任编辑: 安香玉 韩晓红)