

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250306004

引用格式: 郑雨婷, 张行雨, 王诗琪, 等. 环介导等温扩增-CRISPR/Cas12b 可视化检测志贺氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(16): 131-139.

ZHENG YT, ZHANG XY, WANG SQ, *et al.* Visual detection of *Shigella* by loop-mediated isothermal amplification -CRISPR/Cas12b assay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(16): 131-139. (in Chinese with English abstract).

环介导等温扩增-CRISPR/Cas12b 可视化 检测志贺氏菌

郑雨婷^{1,2}, 张行雨^{1,2}, 王诗琪², 王佳玲², 张笑莹², 廖洪艳^{1,2}, 刘雪兰^{1*}, 胡青海^{2*}

(1. 安徽农业大学动物医学院, 合肥 230026; 2. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241)

摘要: 目的 将环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)和成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白12b [clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated protein 12b, CRISPR/Cas12b]相结合, 建立一种针对志贺氏菌的快速、可视化的检测方法。**方法** 根据志贺氏菌保守的侵袭质粒抗原H基因 *ipaH7* 序列, 设计并筛选LAMP引物, 建立LAMP检测志贺氏菌的方法。然后根据LAMP扩增片段的靶序列设计sgRNA, 并筛选能特异性识别并激发Cas12b切割的sgRNA, 最终建立了LAMP-CRISPR/Cas12b快速检测志贺氏菌的方法, 并进行了特异性和灵敏度评价。**结果** 筛选出一组针对志贺氏菌 *ipaH7* 的LAMP扩增引物和sgRNA, 建立了LAMP-CRISPR/Cas12b 二步法检测志贺氏菌的方法, 可在1 h内完成检测, 最低检出限为 1.1×10^1 CFU/mL 纯培养菌和 1.1×10^1 CFU/g 加标的猪肉样品, 且与其他病原体无交叉反应。**结论** 本研究成功建立了一种快速、灵敏、可视化的检测方法, 可实现对食品中志贺氏菌的精准检测。

关键词: 志贺氏菌; 食源性致病菌; 核酸检测; 环介导等温扩增

Visual detection of *Shigella* by loop-mediated isothermal amplification - CRISPR/Cas12b assay

ZHENG Yu-Ting^{1,2}, ZHANG Xing-Yu^{1,2}, WANG Shi-Qi², WANG Jia-Ling², ZHANG Xiao-Ying²,
LIAO Hong-Yan^{1,2}, LIU Xue-Lan^{1*}, HU Qing-Hai^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Anhui Agricultural University, Hefei 230026, China;
2. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

ABSTRACT: Objective To develop a rapid and visual method for detecting *Shigella* by combining loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated protein 12b (CRISPR/Cas12b). **Methods** Based on the conserved invasion plasmid antigen H gene *ipaH7* sequence of

收稿日期: 2025-03-06

基金项目: 上海市科技创新项目(21N31900900)

第一作者: 郑雨婷(2000—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食源性致病菌检测新技术。E-mail: z200003@126.com

*通信作者: 刘雪兰(1973—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为兽医微生物学。E-mail: liuxuelan203@163.com

胡青海(1971—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为病原细菌学。E-mail: hqh123@163.com

Shigella, LAMP primers were designed and screened to establish a LAMP method for detection of *Shigella*. The candidate sgRNAs were designed based on the target DNA sequence of LAMP amplified fragment, and then the sgRNA, which could specifically recognize and stimulate Cas12b cleavage, was screened. Finally, a rapid detection method for detecting *Shigella* was developed by combining LAMP with CRISPR/Cas12b, and the specificity and sensitivity were evaluated. **Results** A set of LAMP primers and sgRNA targeting *Shigella ipaH7* were screened, and a LAMP CRISPR/Cas12b detection method was established. The detection could be completed within 1 hour with the lowest limit of detection of 1.1×10^1 CFU/mL for pure culture and 1.1×10^1 CFU/g for spiked pork samples, and no cross reactivity with other pathogens. **Conclusion** This study successfully establishes a rapid, sensitive and visual detection method for *Shigella*, which can achieve accurate detecting *Shigella* in food samples.

KEY WORDS: *Shigella*; food-borne pathogens; nucleic acid detection; loop-mediated isothermal amplification

0 引言

志贺氏菌是一种兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌,属肠杆菌科^[1],主要引起细菌性痢疾,占全球人腹泻病例的 5% 至 15%^[2]。该菌不仅感染人类,也会感染多种幼龄动物,严重危害畜牧养殖业^[3]。作为水源性和食源性致病菌^[4],经饮水和食物传播是人感染志贺氏菌的主要途径。由于极低的剂量就可感染^[5],我国志贺氏菌感染时有发生,部分地区的菌群耐药率高,并具有多重广谱耐药性^[6-8],给志贺氏菌感染的治疗带来难度。被志贺氏菌污染的食物在高温、酸性、真空等环境下依然具有感染性^[9]。这意味着普通加热和食品包装无法杜绝志贺氏菌的传播,对食品安全和人与畜禽的健康造成潜在威胁。

志贺氏菌根据生化反应与血清学试验分为痢疾志贺氏菌(A 群)、福氏志贺氏菌(B 群)、鲍氏志贺氏菌(C 群)和宋内氏志贺氏菌(D 群)4 个群^[10],我国流行的主要是 B 群(福氏)和 D 群(宋内)。侵袭质粒抗原 H 基因(*invasive plasmid antigen H gene, ipaH*)是志贺氏菌的毒力基因之一,在侵袭性大质粒与染色体上都存在,不随传代而丢失,且在 4 个群的细菌中都存在^[11],因此常作为志贺氏菌的检测靶标。

目前基于细菌培养的方法仍然是检测志贺氏菌的金标准,如现行的 GB 4789.5—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》,但其对志贺氏菌的检测耗时较长,不能迅速查找传染源,以及切断志贺氏菌食物中毒的传播途径,并且需在专业的实验室中进行,过程复杂,并有杂菌污染的风险^[12]。因此,建立快速、精准检测志贺氏菌的方法对于防控关口迁移、避免人们发生志贺氏菌食物中毒尤为重要。基于检测病原核酸的分子生物学检测方法相对国标法具有操作简便、检测时间短、特异性高、重复性好、准确度高的优点,但是需要特定仪器,成本较高。相比于其他检测方法,等温扩增技术因具有操作简单、快速、灵敏度高、不需要昂贵的仪器设备(有恒温金属浴或恒温水浴锅即可)等优点成为发展潜力巨大的检测方法,

其中环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal nucleic acid amplification, LAMP)^[13]和重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)的扩增效率高,使其具有较高的检测灵敏度,可以在短时间内检出个位数的细菌拷贝^[14]。LAMP 反应步骤简单便捷,其中 Bst DNA 聚合酶能够在 60~65 °C 等温环境下 40~60 min 完成反应,大幅度缩短了检测用时^[15],且不需要昂贵的仪器、试剂也相对便宜。但是 LAMP 容易出现交叉污染和非特异性扩增,如 LAMP 内侧引物上游内部引物 FIP 和下游内部引物 BIP 易形成引物二聚体^[16],从而造成 LAMP 检测常出现假阳性结果^[17],从而限制了此技术在临床检测上的应用。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 and associated protein, CRISPR/Cas)技术可特异性地识别并切割靶 DNA,具有特异性强的优点^[18],将 LAMP 或 RPA^[19]和 CRISPR/Cas 技术相结合则可以避免 LAMP 或 RPA 检测过程中出现的非特异性扩增,大大提升了检测的特异性强和可靠性。

本研究选择保守性的 *ipaH7* 作为志贺氏菌的检测靶基因,将 LAMP 技术与 CRISPR/Cas12b 技术相结合,建立的 LAMP-CRISPR/Cas12b 技术既可兼具 LAMP 的扩增效率高和 CRISPR 技术特异性强的优点,同时可使检测可视化,为临床上志贺氏菌的检测提供方法依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

Q5®高保真 DNA 聚合酶、Bst 3.0 DNA 聚合酶、HiScribe™ T7 快速高效 RNA 合成试剂盒(美国 NEB 公司); RNA 纯化与浓缩-5 试剂盒(美国 Zymo 公司); 无核酸酶水(美国 Invitrogen 公司); 蓝色通用型染料法定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)检测试剂盒(南京诺唯赞生物公司); 2×Es Taq MasterMix (Dye)(江苏康为世纪生物公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物公司); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,

PBS)(上海圣尔生物科技有限公司); 胰蛋白酶大豆琼脂 (tryptic soybean agar, TSA) 细菌培养基(美国 BD 公司); 菌株来源如表 1。

新鲜猪肉购买于上海某超市。

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

序号	菌株名称	菌株编号
1	宋内志贺氏菌(<i>Shigella sonnei</i>)	CMCC(B)51592
2	福氏志贺氏菌(<i>Shigella flexneri</i>)	CMCC(B)51572
3	痢疾志贺氏菌(<i>Shigella dysenteriae</i>)	CMCC(B)51105
4	肠出血性大肠杆菌 O157:H7 (<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i> O157:H7)	ATCC 43889
5	鼠伤寒沙门菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	ATCC 14028
6	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 29213
7	单核增生李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	F2365
8	小肠结肠炎耶尔森菌(<i>Yersinia enterocolitica</i>)	ATCC 23715
9	副溶血性弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	ATCC 17802
10	空肠弯曲菌(<i>Campylobacter jejuni</i>)	CJFX01
11	产气荚膜梭菌(<i>Clostridium perfringens</i>)	SH01

注: CMCC(B)编号菌株来源于中国医学菌种保藏管理中心; ATCC 编号菌株来源于美国模式菌种收集中心; 其他编号菌株由本实验室分离鉴定或保存。

1.2 仪器与设备

ABI 7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪(美国 ABI 公司); T100 型 PCR 仪(美国 Biorad 公司); DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技公司); DKT200-2A 型恒温金属浴(杭州米欧仪器公司); Stomacher®80 Biomaster 均质器、带滤网的均质袋(英国 Seward 公司); Gel Doc™ EZ Imager 凝胶成像系统(美国 Biorad 公司)。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取

本研究采用水煮法提取菌株基因组。将表 1 中 3 株志贺氏菌和 8 株非志贺氏菌分别接种到 TSA 等固体培养平板培养 24 h, 然后用灭菌的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 冲洗。取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 10000 g 离心 5 min, 弃上清, 沉淀的菌体用 100 μL 无菌水重悬, 100 °C 加热 10 min, 再次 10000 g 离心 5 min, 取上清保存于 -40 °C 备用。

1.4 志贺氏菌 LAMP 检测方法的建立

根据志贺氏菌 *ipaH7* 基因(NC_004337.2)的 DNA 序列, 采用在线软件 PrimerExplorerV5 (<https://primerexplorer.jp/e/>) 设计 LAMP 引物组, 由生工生物股份有限公司合成。以宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株基因组 DNA 作为模板, 同时以双重蒸馏水(double distilled water, ddH₂O)作为空白对

照模板, 将引物组加入体系进行 LAMP 引物组的筛选。LAMP 反应体系为: 0.5 μL F3 (10 μmol/L)、0.5 μL B3 (10 μmol/L)、4.0 μL FIP (10 μmol/L)、4.0 μL BIP (10 μmol/L)、2.0 μL MgSO₄ (100 mmol/L)、2.5 μL 10×等温扩增缓冲液 II、3.5 μL dNTPs (10 mmol/L)、1.0 μL Bst 3.0 DNA 聚合酶 (8000 U/mL)、2.0 μL 模板 DNA, 无核酸酶水补至 25.0 μL。

反应体系混匀后, 加入 20 μL 液体石蜡进行封闭, 以防止反应液体蒸发和产物逸散形成气溶胶。反应管置恒温金属浴 65 °C 反应 40 min, 然后 85 °C 孵育 5 min 使 Bst 3.0 DNA 聚合酶失活。反应产物采用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 用紫外凝胶成像分析仪分析结果。

1.5 LAMP 检测方法的特异性和灵敏度分析

特异性分析: 采用菌液煮沸法分别提取表 1 中各菌株的基因组 DNA 作为检测的模板, 用 ddH₂O 为空白对照。

灵敏度分析: 将新鲜培养的宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株菌液经 10000 g 离心 3 min, 沉淀的菌体用灭菌 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 重悬, 然后用 PBS 进行 10 倍梯度稀释, 使菌液浓度为 1.1×10⁸~1.1×10⁰ CFU/mL, 取以上浓度梯度菌液各 1 mL 采用煮沸法提取基因组 DNA, 进行 LAMP 检测, 以 ddH₂O 作为空白模板对照。

1.6 sgRNA 制备

根据筛选出的 LAMP 扩增片段 DNA 序列, 采用 CRISPOR 软件(<http://crispor.tefor.net/>)设计 sgRNA 序列。以携带 T7 启动子和 Cas12b DR 序列的质粒 pUC57-T7-DR^[20]为模板, 用 PCR 扩增 T7-DR-sgRNA DNA 片段, PCR 产物用试剂盒纯化后作为转录的模板。采用 HiScribe™ T7 快速高效 RNA 合成试剂盒在体外 37 °C 条件下反应 16 h 转录得到 sgRNA。反应结束后, 再使用 RNA 纯化与浓缩-5 试剂盒对体外转录的产物进行 DNA 消化和过柱纯化。纯化后的 sgRNA 测定浓度后进行分装, 置 -80 °C 保存备用。

1.7 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测方法的建立与优化

采用 LAMP 产物作为模板进行 CRISPR 切割反应以筛选 sgRNA。CRISPR 反应体系包含 2.0 μL 10×AapCas12b 反应缓冲液、0.5 μL AapCas12b 蛋白(2 μmol/L)、50 nmol/L AapCas12b sgRNA、2.0 μL LAMP 产物、0.5 μL ssDNA-FQ (标记荧光报告基团的单链 DNA, 10 μmol/L), 无核酸酶水补至 20.0 μL。在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪中 60 °C 反应 40 min, 每 1 min 读取一次荧光数值。比较 sgRNA 到加入体系后的荧光信号强度值, 选择强度值最高的相应的 sgRNA 用于 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测。

筛选出 sgRNA 后, 尝试建立一步法(即在同一反应体系中加入 LAMP 扩增和 CRISPR/Cas12b 系统的试剂), 或二步法(即先 LAMP 扩增, 然后取 LAMP 产物进行 CRISPR 切割) LAMP-CRISPR/Cas12b 反应体系检测志贺氏菌。对于

二步法, 进行 CRISPR 切割时间的优化, 以缩短总体检测时间。最终建立的检测反应在荧光 PCR 仪中进行, 根据荧光曲线来判定检测的结果。此外, 检测反应也可以在恒温金属浴或恒温水浴锅中进行, 反应完成后, 将反应管置于手持紫外灯下观察结果, 出现蓝绿色荧光的判为阳性。

1.8 LAMP-CRISPR/Cas12b 的特异性分析

以提取的各种食源性致病菌基因组 DNA 为模板, 无核酸酶水作空白模板对照, 采用本研究建立的 LAMP-CRISPR/Cas12b 二步法反应体系进行特异性检测, 反应在荧光 PCR 仪中进行, 根据荧光曲线来判定检测的结果。

1.9 LAMP-CRISPR/Cas12b 的灵敏度分析

用灭菌 PBS 重悬新鲜培养的宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株, 再用 PBS 10 倍倍比稀释至 1.1×10^4 、 1.1×10^3 、 1.1×10^2 、 1.1×10^1 和 1.1×10^0 CFU/mL, 取以上浓度的菌液各 1 mL 用煮沸法提取基因组 DNA, 进行 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测, 以无核酸酶水作空白对照。反应在荧光 PCR 仪中进行, 根据荧光曲线来判定检测的结果。

LAMP-CRISPR/Cas12b 与常规 PCR 和 qPCR 检测志贺氏菌的灵敏度比较: 根据志贺氏菌 *ipaH7* 基因的 DNA 序列, 采用 Premier3 (<https://primer3.ut.ee/>) 在线软件设计常规 PCR 引物(*ipaH7*-F: 5'-AGCGTACTGAGGCGG TAAGA-3'; *ipaH7*-R: 5'-TCCTAGGTAAAGGGGGCAGT-3'); 采用 Primer express 3.0 (Applied Biosystems, USA) 软件设计 qPCR 引物(*ipaH7*-q-F: 5'-TTCGCGCCATATCAGAGTCA-3'; *ipaH7*-q-R: 5'-CCGACGATCTGCTCAGGAA-3')。引物均由上海生工生物股份有限公司合成。将新鲜培养的宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株用灭菌 PBS 重悬, 再用 PBS 10 倍比稀释至 1.1×10^6 、 1.1×10^5 、 1.1×10^4 、 1.1×10^3 、 1.1×10^2 、 1.1×10^1 和 1.1×10^0 CFU/mL, 取以上浓度梯度菌液各 1 mL, 采用煮沸法提取基因组 DNA 作为检测模板, 用 2×Taq MasterMix (Dye) 进行常规 PCR 检测; 用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 qPCR 检测。

此外, 新鲜猪肉采用涂布 TSA 平板和 LAMP-CRISPR/cas12b 检测志贺氏菌为阴性。然后在每 10 g 猪肉(置带滤网的均质袋, Seward)中加入 1 mL 宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 菌液至 1.1×10^3 、 1.1×10^2 、 1.1×10^1 和 1.1×10^0 CFU/g, 再各加入 89 mL TSB, 置 Seward 拍打器中拍打匀浆; 同时设立无加标的猪肉作为对照。再各取 10 mL 匀浆滤过液先 200 g 低速离心 5 min 除去大的组织块, 上清再 10000 g 离心 5 min, 沉淀用 10 μL 重悬, 采用煮沸法提取基因组 DNA, 用 LAMP-CRISPR/cas12b 检测各样品中的志贺氏菌。

1.10 LAMP-CRISPR/cas12b 的重复性性试验

将新鲜培养的宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 菌液 10000 g 离心 5 min, 沉淀用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 重悬至本研究建立的 LAMP-CRISPR/cas12b 方法检出限

1.1×10^1 CFU/mL, 然后分装到 5 支 1.5 mL 试管中, 每管 1 mL 菌液, 采用煮沸法提取基因组 DNA。然后采用建立的 LAMP-CRISPR/cas12b 方法进行检测提取的基因组 DNA。同时设立无核酸酶水作为空白对照。此重复性实验在不同的日期进行 3 次。

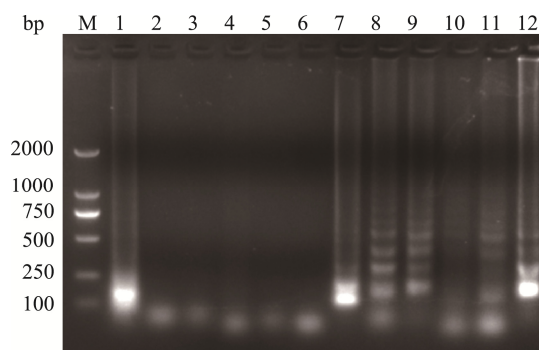
1.11 数据处理

本研究采用 Graphad Prism version 9.0.0 进行荧光曲线作图; 图像处理采用 Windows 10 中的画图软件; 文中的表格制作采用 Office 2016 绘制。

2 结果与分析

2.1 建立 LAMP 检测志贺氏菌的方法

选择宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株基因组作为阳性模板, 无核酸酶水作为空白模板对照, 进行 LAMP 引物筛选, 扩增结果见图 1。结果可见, 以志贺氏菌基因组 DNA 为模板, 采用 *ipaH7*-1~*ipaH7*-6 引物组进行 LAMP 扩增时均出现梯状条带, 而以无核酸酶水为模板时 *ipaH7*-2~*ipaH7*-6 引物组扩增时均无梯状条带。其中, *ipaH7*-3 引物组扩增的梯状条带明显且引物二聚体较少。因此, 选择 *ipaH7*-3 (F3: GGTTACCGGAAGAAGACAGC, B3: TTTTCAG GTAAATCAGTAAGGAT, FIP: AGGTCCAGTTTATGCCCC TTTACTGAGGCGGTAAGAAGAC, BIP: CGCTTTCCTCG CTACCTGTAGGTTAATTTATTACAGCTCACATCA) 作为 LAMP 检测引物。



注: M: DNA marker DS2000; 泳道 1~6: 以无核酸酶水为模版, 分别用引物组 *ipaH7*-1~*ipaH7*-6 进行 LAMP 检测的结果; 泳道 7~12: 以宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株基因组 DNA 作为模板, 分别用引物组 *ipaH7*-1~*ipaH7*-6 进行 LAMP 检测的结果。

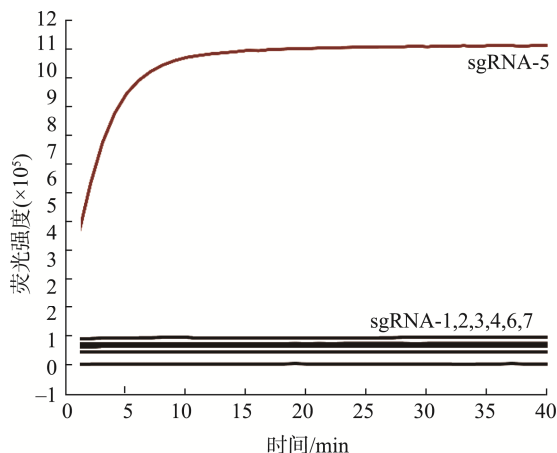
图 1 LAMP 引物组的筛选

Fig.1 Screening of LAMP primer sets

2.2 sgRNA 筛选

根据 LAMP 扩增的 DNA 片段序列设计 7 条 sgRNA, 先用 PCR 扩增获得相应 DNA 片段后, 进行体外转录并对产物进行纯化, 测定 RNA 的量后加入 CRISPR 切割体系中, 测定 sgRNA 能否识别靶 DNA 序列并激发 Cas12b 的侧链切割活性。结果表明, 加入 sgRNA-5 的反应管出现荧光,

而加入其余 sgRNA 的反应管未出现明显的荧光(图 2)。因此, 本研究选择 sgRNA-5 (GUCUAGAGGACAGAAUUUUUCAACGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAGCCCGUUGAACUUCAAGCGAAGUGGCACUAAUGCAAGCAGGGAGUACAGGU)进行下一步的实验。



注: 1~7. sgRNA1~sgRNA7。

图 2 基于 LAMP 扩增片段的 sgRNA 筛选

Fig.2 Screening of sgRNA based on LAMP amplification fragments

2.3 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测志贺氏菌方法的建立

以宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株基因组 DNA 为模板, 在同一反应体系中加入 LAMP 扩增和 CRISPR/Cas12b 切割的试剂进行一步法反应。结果表明, 加入志贺氏菌基因组 DNA 与无核酸酶水的反应管荧光强度值接近, 未出现荧光强度值升高的曲线。而且, 调整反应体系中的 AapCas12b、sgRNA 和 ssDNA-FQ 浓度后, 还是如此, 可见本研究筛选出来的 sgRNA-5 不能用于目前的一步法反应体系。此外, 多组 LAMP 引物与 sgRNA, 均未能成功建立一步法检测反应体系, 这可能与本研究所采用的 LAMP 扩增体系和 CRISPR/Cas12b 切割体系不兼容, 如 LAMP 反应缓冲液等不能同时满足这两个反应体系等因素导致。最终,

本研究选择两步检测法。

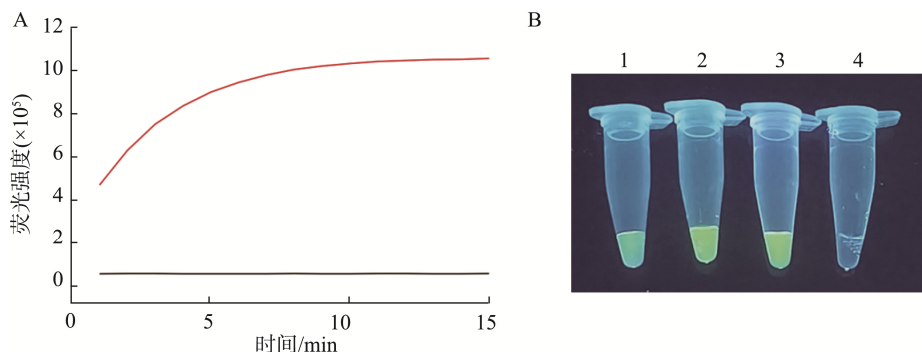
分别以志贺氏菌基因组 DNA 和无核酸酶水为模板, 先进行 LAMP 扩增后, 再取 2 μ L LAMP 产物进行 CRISPR/Cas12b 切割反应。结果表明, 以志贺氏菌基因组 DNA 为模板时, 最终反应管出现较高的荧光强度曲线, 反应管置紫外灯下也出现明显的蓝绿色荧光; 而以无核酸酶水为模板时, 未出现明显升高的荧光强度曲线, 将反应管置紫外灯下也未出现明显的蓝绿色荧光。这表明, LAMP-CRISPR/Cas12b 二步法可以检测志贺氏菌。此外, 当以 LAMP-CRISPR/Cas12b 二步法检测 1×10^2 CFU/mL 志贺氏菌提取的基因组 DNA 时, 第二步 CRISPR/Cas12b 反应时间在 10 min 或 15 min 时, 在紫外灯下可观察到反应管内的荧光明显亮于反应 5 min 时的反应产物(图 3)。这说明 CRISPR/Cas12b 反应只需要 10~15 min 即可完成, 从而使整个检测流程的总时间控制在 1 h 以内。

2.4 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测的特异性分析

分别以不同细菌的基因组 DNA 和无核酸酶水为模板, 分别在荧光定量 PCR 仪和恒温金属浴中进行 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测。结果表明, 检测在荧光定量 PCR 仪中进行(图 4A), 或先在恒温金属浴中完成反应, 再在紫外灯下观察结果(图 4B), 得到的结果一致。以 3 种志贺氏菌基因组 DNA 为模板时, LAMP-CRISPR/Cas12b 反应出现荧光曲线, 而以其他 7 种细菌的基因组 DNA 和无核酸酶水为模板时, LAMP-CRISPR/Cas12b 反应产物无荧光信号。

2.5 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测的灵敏度分析

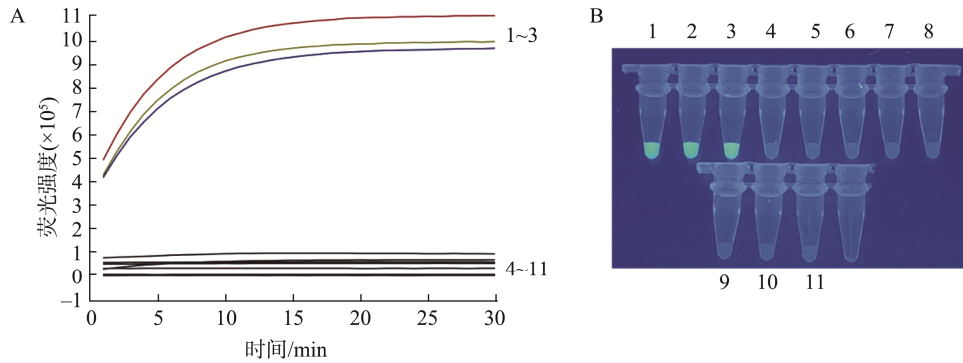
以 10 倍倍比稀释的宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株基因组 DNA 为模板, 进行 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测。结果表明, 以志贺氏菌菌液浓度为 $1.1 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^1$ CFU/mL 提取的基因组 DNA 作为检测模板时, LAMP-CRISPR/Cas12b 反应过程中出现了较高的荧光曲线, 而以 1.1×10^0 CFU/mL 志贺氏菌的基因组 DNA 和无核酸酶水为模板检测时, 反应体系中均未出现明显的荧光(图 5A 和 5B)。而且, 本研究建



注: A 中红色曲线为志贺氏菌基因组 DNA 为模板, 黑色为无核酸酶水为模板。B 中 1~3 分别是反应时间为 5、10、15 min 时反应产物在紫外灯下的荧光强度; 4 为空白模板对照。

图 3 LAMP-CRISPR/Cas12b 二步法检测中 CRISPR 切割时间的优化

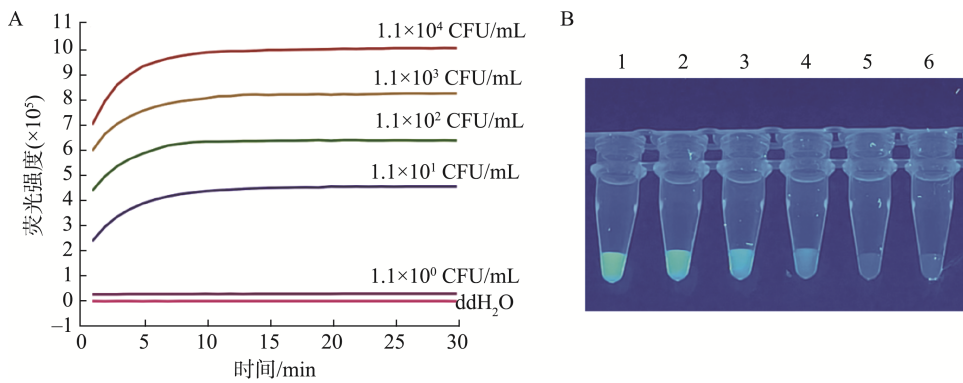
Fig.3 Optimization of the reaction time of CRISPR cleavage in two-step CRISPR/Cas12b detection



注: 1~11 依次为宋内志贺氏菌、福氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7、鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、小肠结肠炎耶尔森菌、副溶血性弧菌、产气荚膜梭菌基因组 DNA 和无核酸酶水作为模板时的检测结果。

图 4 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测志贺氏菌的特异性分析

Fig.4 Specificity of LAMP-CRISPR/Cas12b testing for detecting *Shigella*



注: 1~5 表示菌液浓度分别为 1.1×10^4 、 1.1×10^3 、 1.1×10^2 、 1.1×10^1 、 1.1×10^0 CFU/mL 宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株提取的基因组 DNA 为模板时检测结果; 6 是无核酸酶水做空白对照的检测结果。

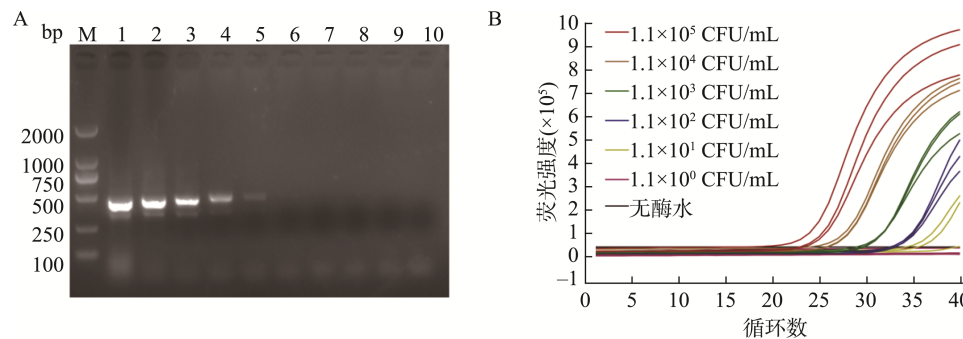
图 5 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测志贺氏菌的灵敏度

Fig.5 Sensitivity of LAMP-CRISPR/Cas12b testing for detecting *Shigella*

立的 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测志贺氏菌的方法, 在荧光定量 PCR 仪中检测(图 5A)和在恒温金属浴中反应后, 再在紫外灯下观察(图 5B), 两种方法的检测灵敏度均为 1.1×10^1 CFU/mL。

以 10 倍连续倍比稀释的宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株基因组 DNA 为模板, 进行常规 PCR 检测时, 反应

结束后, 用凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。当菌液浓度在 1.1×10^3 CFU/mL 及以下时, 反应产物无可见扩增条带(图 6A)。由此可知 PCR 检出限为 1.1×10^4 CFU/mL。分别以 $1.1 \times 10^0 \sim 1.1 \times 10^5$ CFU/mL 的宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株基因组 DNA 为模板, 进行 qPCR 检测。当菌液浓度在 1.1×10^1 CFU/mL 时, 有一管无荧光, 另一管检测的循环数



注: A. M: DNA marker DS2000; 泳道 1~9 分别为菌液浓度分别为 1.1×10^8 、 1.1×10^7 、 1.1×10^6 、 1.1×10^5 、 1.1×10^4 、 1.1×10^3 、 1.1×10^2 、 1.1×10^1 和 1.1×10^0 CFU/mL 宋内志贺氏菌提取的基因组 DNA 为模板时的常规 PCR 检测结果; 10: 无核酸酶水作为模板时的常规 PCR 扩增结果;

B.宋内志贺氏菌 CMCC(B)51592 株提取的基因组 DNA 为模板时的 qPCR 扩增结果。

图 6 常规 PCR 和 qPCR 检测志贺氏菌的灵敏度

Fig.6 Sensitivity of conventional PCR and qPCR for detecting *Shigella*

值大于 36(图 6B), 故荧光定量 PCR 检测志贺氏菌的灵敏度 1.1×10^2 CFU/mL。可见本研究建立的 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测方法的灵敏度比常规 PCR 方法高 1000 倍, 比荧光定量 PCR 方法高 10 倍。

本研究进一步测定了 LAMP-CRISPR/Cas12b 二步法对模拟样品, 即猪肉加标志贺氏菌的检测灵敏度, 结果表明其检出限为 1.1×10^1 CFU/g (图 7)。

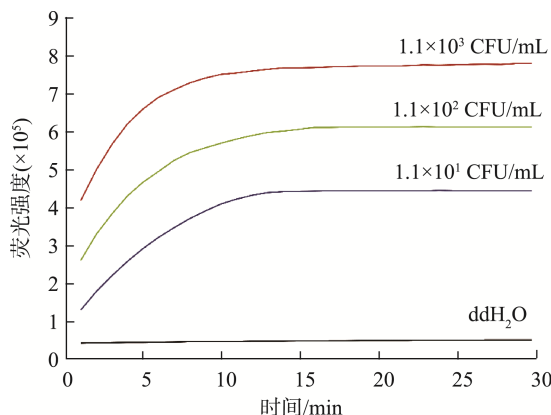
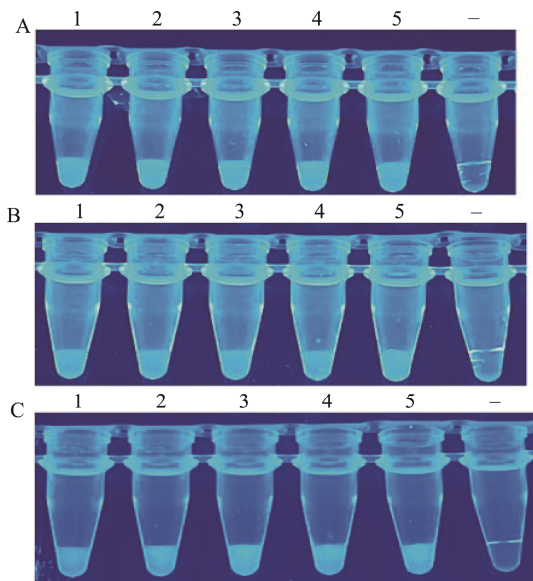


图 7 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测猪肉加标志贺氏菌的灵敏度
Fig.7 Sensitivity of LAMP-CRISPR/Cas12b testing for detecting *Shigella* in spiked pork samples

2.6 LAMP-CRISPR/Cas12b 方法的重复性试验结果

在 3 个不同的时间点采用 LAMP-CRISPR/Cas12b 两步法检测细菌浓度为检出限(1.1×10^1 CFU/mL)的志贺氏菌菌液提取的基因组 DNA, 结果表明 3 个时间点检测的 5 管重复菌液样品均检测为阳性(图 8), 表明本研究建立的检测方法具有较好的重复性。



注: A、B 和 C 表示不同时间点的检测结果。

图 8 LAMP-CRISPR/Cas12b 两步法检测志贺氏菌的重复性试验结果
Fig.8 Repeatability test results of two-step LAMP-CRISPR/Cas12b assay for detecting *Shigella*

3 讨论与结论

高灵敏度检测志贺氏菌一直是科研人员努力的方向。许龙岩等^[21]比较了常规 PCR、实时定量 PCR 和微滴式数字 PCR 的检测灵敏度, 结果表明实时定量 PCR 和微滴式数字 PCR 分别比常规 PCR 高 100 倍和 1000 倍。HE 等^[22]针对 4 种志贺氏菌建立的多重 qPCR, 检测模拟样品时, 最低可以检出人为添加 10 CFU 志贺氏菌的样本。这些方法依然需要 PCR 仪等昂贵仪器。HERNÁNDEZ 等^[23]采用电化学检测志贺氏菌, 理论上的敏感性可以达到 1×10^{-1} CFU/mL, 但是操作复杂, 需要专门的化学实验室和专业技术人员。LIU 等^[24]研发了 H 和 P 扩增-新型压电石英晶体(HPA-SPQC)传感器, 对志贺氏菌的检出限可到达 1 CFU/mL, 但检测时间需要 2 h, 且成本较高, 从而限制其临床应用。

高灵敏度的等温扩增方法, 不需要昂贵的仪器, 且适用于现场检测, 被视为是 PCR 等经典检测方法的替代技术。CHU 等^[25]建立的滚环扩增(rolling circle amplification, RCA), 针对志贺氏菌的检测灵敏度达到了 10^1 CFU/mL。BIAN 等^[26]建立的 RPA-LFD 方法检出限为 1.46×10^3 CFU/mL, 而 XU 等^[27]建立的 RPA-CRISPR-LFD 方法检出限达到了 5.6×10^2 CFU/mL, 提示结合 CRISPR 可能会提高检测的灵敏度。LAMP 也因其高灵敏度及所需试剂成本较低等已被广泛应用于志贺氏菌的检测^[28-30]。基于 LAMP 的快速诊断测试(rapid LAMP based diagnostic test, RLDT)通过在体系中加入染料来使 LAMP 体系可视化, 其对志贺氏菌检测的灵敏度为 $6 \times 10^3 \sim 10^4$ CFU/g 粪便^[31-32]。SHI 等^[33]建立了一种针对志贺氏菌的比色 LAMP 测定法, 比常规 PCR 检测灵敏 100 倍。如果 LAMP 扩增和 CRISPR 切割在一个反应体系中, 一步法就可完成反应, 则可以简化操作步骤, 且减少了其他因素(如环境中气溶胶)对检测结果的干扰。然而, 本研究通过优化反应体系, 最终还是没有建立起一步法检测志贺氏菌的体系。本研究建立的二步法 LAMP-CRISPR/Cas12b 可视化检测志贺氏菌的方法, 虽然特异性好, 且灵敏度比常规 PCR 和 qPCR 分别高 1000 倍和 10 倍, 检测可在恒温金属浴或恒温水浴锅中完成, 用手持式紫外灯即可观察结果, 可用于现场检测, 但两步法检测存在的劣势是中途开盖可能导致 LAMP 产物的气溶胶扩散, 使后续检测出现假阳性结果。这个问题可以参考一管式 LAMP-CRISPR/Cas12a 方法^[34]进行改进, 即使用液体石蜡使两步体系分离, 在 LAMP 反应结束后再通过离心或倒置进行第二步 CRISPR 反应。

本研究将 LAMP 和 CRISPR/Cas12b 相结合, 建立的 LAMP-CRISPR/Cas12b 二步检测方法, 特异性好, 其灵敏度比常规 PCR 检测方法高 1000 倍, 比 qPCR 方法高 10 倍; 而且反应不需要荧光定量 PCR 仪或 PCR 仪等昂贵的仪器,

整个检测反应可在 1 h 内完成,大幅提升了检测的便捷性,具有特异性好,灵敏度高、快速和检测结果可视化等优点,为食品中志贺氏菌污染的检测提供了一种新的技术选项。

参考文献

- [1] 徐美余,张瑶,邓征宇,等.一株可裂解动物源性多重耐药志贺氏菌的噬菌体分离鉴定及其生物学特性研究[J].微生物学杂志,2023,43(5):91-100.
XU MY, ZHANG Y, DENG ZY, *et al.* Isolation and biological characterization of a bacteriophage PSF26 that infects multidrug resistant *Shigella* strains with animal origin splitting capability [J]. Journal of Microbiology, 2023, 43(5): 91-100.
- [2] NISA I, QASIM M, YASIN N, *et al.* *Shigella flexneri*: An emerging pathogen [J]. Folia Microbiologica, 2020, 65: 275-291.
- [3] 文英,刘永生.基于 *ipaH* 基因的志贺菌 LAMP 检测方法的建立及应用[J].中国农学通报,2021,37(5):104-110.
WEN Y, LIU YS. *Shigella* LAMP detection method based on *ipaH* gene: Establishment and application [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(5): 104-110.
- [4] PAKBIN B, BRÜCK WM, BRÜCK TB. Molecular mechanisms of *Shigella* pathogenesis recent advances [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2448.
- [5] LU T, DAS S, HOWLADER DR, *et al.* *Shigella* vaccines: The continuing unmet challenge [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(8): 4329.
- [6] 王建.我国宋内志贺菌流行特征、耐药性及变异研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2016.
WANG J. Study on epidemic characteristics, antimicrobial resistance and variation of *Shigella sonnei* in China [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2016.
- [7] 雷高鹏,黄伟峰,吕虹,等.2008—2021年四川省腹泻病例中志贺氏菌分布特征和耐药分析[J].预防医学情报杂志,2023,39(7):820-825.
LEI GP, HUANG WF, LV H, *et al.* Distribution characteristics and drug resistance of *Shigella* isolates from diarrhea patients in Sichuan Province from 2008 to 2021 [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2023, 39(7): 820-825.
- [8] 尹艳珠,杨祖顺,邹颜秋硕,等.云南省2016—2022年志贺氏菌分子分型及耐药性分析[J].昆明医科大学学报,2024,45(7):79-86.
YIN YZ, YANG ZS, ZOUYAN QS, *et al.* Investigation of molecular typing and drug resistance of *Shigella* in Yunnan Province from 2016 to 2022 [J]. Journal of Kunming Medical University, 2024, 45(7): 79-86.
- [9] 王立娟.实时荧光定量 SRCA 技术检测食品中的志贺氏菌的研究[D].保定:河北农业大学,2020.
WANG LJ. Study on real-time fluorescence quantity SRCA technology detection of *Shigella* in food [D]. Baoding: Hebei Agriculture University, 2020.
- [10] 鲁佳琦,张乐,罗中魏,等.食源性志贺氏菌的研究进展[J].食品安全导刊,2020,15:15.
LU JQ, ZHANG L, LUO ZW, *et al.* Research progress on foodborne *Shigella* [J]. China Food Safety Magazine, 2020, 15: 15.
- [11] 文英,何永彩.志贺菌 *ipaH* 基因 PCR 检测方法的建立及应用[J].安徽农业科学,2020,48(21):103-106.
WEN Y, HE YC. Establishment and application of PCR detection method for *ipaH* gene of *Shigella* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(21): 103-106.
- [12] 李静雯,陈尔凝,康福英,等.食品中志贺氏菌快速检测免疫磁分离样品前处理技术研究[J].计量学报,2023,44(3):326-333.
LI JW, CHEN ERN, KANG FY, *et al.* Study on samples pretreatment technology based on immunomagnetic separation for rapid detection of *Shigella* in food [J]. Acta Metrologica Sinica, 2023, 44(3): 326-333.
- [13] 赵雨佳,梁亮,范培蕾,等.环介导等温扩增技术在食品安全领域的应用进展[J].现代食品科技,2025,41(3):387-400.
ZHAO YJ, LIANG L, FAN PL, *et al.* Progress in application of loop mediated isothermal amplification on food safety [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 387-400.
- [14] CHEN S, SCHNABEL G, YUAN H, *et al.* LAMP detection of the genetic element 'Mona' associated with DMI resistance in *Monilinia fructicola* [J]. Pest Management Science, 2019, 75(3): 779-786.
- [15] WONG YP, OTHMAN S, LAU YL, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms [J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(3): 626-643.
- [16] MAO R, WU X, MIAO Q, *et al.* Asymmetric stem-loop-mediated isothermal amplification of nucleic acids for DNA diagnostic assays by simple modification of canonical PCR primers [J]. Frontiers in Bioengineering Biotechnology, 2022, 10: 931770.
- [17] 郭心龙,周勇志,曹杰,等.绵羊无浆体 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法的建立[J].中国兽医学,2025,55(3):330-337.
GUO XL, ZHOU ZY, CAO J, *et al.* Development of LAMP-CRISPR/Cas12a assay for the detection of *Anaplasma ovis* [J]. Chinese Veterinary Science, 2025, 55(3): 330-337.
- [18] 尹佳祺,折小娟,和林洁,等.基于 CRISPR/Cas 的分子诊断技术在病毒检测中的应用[J].检验医学与临床,2024,21(20):3100-3104.
YIN JQ, ZHE XJ, HE LJ, *et al.* Application of CRISPR/Cas-based molecular diagnostic techniques in virus detection [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2024, 21(20): 3100-3104.
- [19] 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.
- [20] WANG SQ, GAO YH, MIAO YQ, *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by one-pot LAMP-CRISPR/Cas12b combined with immunomagnetic beads [J]. Food Control, 2025, 172: 111181.
- [21] 许龙岩,李志勇,王志强,等.PCR 方法检测志贺氏菌的研究[J].检验检疫科学,2003,13(5):28-29.

- XU LY, LI ZY, WANG ZQ, *et al.* Detection of by PCR method [J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2003, 13(5): 28–29.
- [22] HE P, WANG H, YAN Y, *et al.* Development and application of a multiplex fluorescent PCR for *Shigella* detection and species identification [J]. *Journal of Fluorescence*, 2022, 32(2): 707–713.
- [23] HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ O, GUTIÉRREZ-ESCOLANO AL, CANCIO-LONCHES C, *et al.* Multiplex PCR method for the detection of human norovirus, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *Shiga* toxin producing *Escherichia coli* in blackberry, coriander, lettuce and strawberry [J]. *Food Microbiology*, 2022, 102: 103926.
- [24] LIU S, MA J, HE F. A New SPQC Biosensor for the detection of a new target of *Escherichia/Shigella* genera based on a novel method of synthesizing long-range DNA [J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(24): 9826–9833.
- [25] CHU ZH, CHEN JY, ZHANG JZ, *et al.* Cyclic multiple primer generation rolling circle amplification assisted capillary electrophoresis for simultaneous and ultrasensitive detection of multiple pathogenic bacteria [J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 96(4): 1781–1788.
- [26] BIAN Z, LIU W, JIN J, *et al.* Development of a recombinase polymerase amplification assay with lateral flow dipstick (RPA-LFD) for rapid detection of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* [J]. *PLoS One*, 2022, 17(12): e0278869.
- [27] XU J, ZHANG T, LV X, *et al.* An RPA-based CRISPR/Cas12a assay in combination with a lateral flow assay for the rapid detection of *Shigella flexneri* in food samples [J]. *Foods*, 2024, 13(19): 3200.
- [28] MUZEMBO BA, KITAHARA K, OHNO A, *et al.* Rapid diagnostic tests and loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Shigella* species: A systematic review and meta-analysis [J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2024, 17(6): 1065–1078.
- [29] LI S, JI S, ZHU X, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for molecular serotyping of *Shigella flexneri* serotypes 2 and Xv [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(4): 2980–2989.
- [30] WANG Y, WANG Y, LUO L, *et al.* Rapid and sensitive detection of shigella spp. and *Salmonella* spp. by multiple endonuclease restriction real-time loop-mediated isothermal amplification technique [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1400.
- [31] CHAKRABORTY S, CONNOR S, VELAGIC M. Development of a simple, rapid, and sensitive diagnostic assay for enterotoxigenic *E. coli* and *Shigella* spp applicable to endemic countries [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2022, 16(1): e0010180.
- [32] CONNOR S, VELAGIC M, ZHANG X, *et al.* Evaluation of a simple, rapid and field-adapted diagnostic assay for enterotoxigenic *E. coli* and *Shigella* [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2022, 16(2): e0010192.
- [33] SHI Y, XU M, DUAN X, *et al.* WarmStart colorimetric loop-mediated isothermal amplification for the one-tube, contamination-free and visualization detection of *Shigella flexneri* [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2021, 112: 55–62.
- [34] WANG Z, CHEN H, HU A, *et al.* Establishment of LAMP-CRISPR/Cas12a for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and one-pot detection [J]. *Food Microbiology*, 2024, 124: 104622.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)