DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250916004
引用格式: 余婷婷, 宋可凡, 刘杰, 等. 基于氟化物核糖开关转录反应体系和 CRISPR/Cas12a 检测南极磷虾中氟含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(4): 300–306.
YU TT, SONG KF, LIU J, *et al*. Detection of fluoride content in *Euphausia superba* based on fluoride riboswitch transcription system and CRISPR/Cas12a [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(4): 300–306. (in Chinese with English abstract).

基于氟化物核糖开关转录反应体系和 CRISPR/Cas12a 检测南极磷虾中氟含量

余婷婷[1], 宋可凡[2], 刘　杰[1], 吴云华[2*]

[1. 国家市场监督管理总局重点实验室(动物源性食品中重点化学危害物检测技术), 武汉　430070;
2. 中南民族大学生命科学学院, 武汉　430074]

摘　要: 目的　建立氟化物核糖开关转录反应体系以及成簇的规律间隔的短回文重复序列/Cas12a 蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 12a, CRISPR/Cas12a)检测氟含量的方法。**方法**　本研究利用氟化物核糖开关在有氟或无氟下转录全长或非全长 RNA 并与 CRISPR/Cas12a 系统相结合, 通过荧光法读取实验结果。对优化的 CRISPR/Cas12a 检测体系进行选择性和干扰性分析实验, 并用于南极磷虾氟含量的检测。**结果**　本研究成功建立了基于氟化物核糖开关转录反应体系 CRISPR/Cas12a 荧光检测方法, 可在 1.5 h 内完成对样品的检测, 检测结果与国家标准方法氟离子选择电极法基本保持一致。**结论**　本研究建立的基于氟化物核糖开关转录反应和 CRISPR/Cas12a 的南极磷虾中氟含量检测方法具有高特异性和准确性, 在氟含量的检测方面具有应用价值。

关键词: 氟化物核糖开关; 成簇的规律间隔的短回文重复序列/Cas12a 蛋白; 氟含量检测; 南极磷虾

Detection of fluoride content in *Euphausia superba* based on fluoride riboswitch transcription system and CRISPR/Cas12a

YU Ting-Ting[1], SONG Ke-Fan[2], LIU Jie[1], WU Yun-Hua[2*]

(1. *Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food*, *State Administration for Market Regulation*, *Wuhan* 430070, *China*; 2. *College of Life Science*, *South-Central Minzu University*, *Wuhan* 430074, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method to detect fluoride content based on the fluoride riboswitch transcription system and clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 12a (CRISPR/Cas12a). **Methods**　The system utilized fluoride riboswitch to regulate transcription of full-length or truncated RNA in the presence/absence of fluoride, which was then detected by CRISPR/Cas12a-mediated fluorescence signal. Selectivity and interference analyses were conducted to optimize CRISPR/Cas12a detection

收稿日期: 2025-09-16
基金项目: 国家市场监督管理总局重点实验室(动物源性食品中重点化学危害物检测技术)开放课题基金资助项目(KF-202305)
第一作者: 余婷婷(1985—), 女, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测分析。E-mail: 271377735@qq.com
***通信作者:** 吴云华(1971—), 女, 教授, 主要研究方向为生物医学分析。E-mail: wuyunhua@mail.scuec.edu.cn

system, and the method was applied to measure fluoride content in *Euphausia superba*. **Results** This study successfully established a fluorescence detection method based on a fluoride riboswitch transcription reaction system and CRISPR/Cas12a, which completed sample detection within 1.5 h with the results consistent with those obtained by the national standard fluoride ion-selective electrode method. **Conclusion** The fluoride detection method established in this study for *Euphausia superba* based on a fluoride riboswitch transcription reaction system and CRISPR/Cas12a, demonstrates high specificity and accuracy, showing potential for fluoride content analysis.

KEY WORDS: fluoride riboswitch; clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 12a; fluoride content detection; *Euphausia superba*

0　引　言

磷虾是一种甲壳类浮游动物, 在全球海洋中均有分布。全球海洋中共有 86 种磷虾[1], 南极磷虾(*Euphausia superba*)一般是指南极大磷虾。体长一般为 5.5~6.0 cm, 具有庞大的生物量, 被认为是地球上数量最大、也是最后一个动物蛋白库[2–3]。每年的收获量为 20~30 万 t[4], 南极磷虾的营养价值颇高, 蛋白质含量丰富, 还含有全部人体所需要的氨基酸[5–6]。不仅拥有庞大的数量, 并且具有诱人的开发和利用前景。然而南极磷虾具有富集氟的特性, 经过检测, 南极磷虾整虾的氟含量为 2400 mg/kg[7], 如此高的氟含量对南极磷虾的可食用造成了十分严重的困扰, 因此磷虾的食用价值一直未曾获得有效的开发, 因而对于南极磷虾中氟含量的检测尤为重要, 对其进行精准, 快速检测是我们有效利用南极磷虾资源的有效手段。

目前, 实验室主要通过离子选择电极法(ion-selective electrode, ISE)[8]、离子色谱法(ion chromatography, IC)[9]和分光光度法[10]等测定样品中的氟含量, 但上述方法都各有优缺点, 并不能完全适用于对南极磷虾中氟含量的检测要求。其中氟 ISE 是实验室中最常用的检测方法, 有操作简单方便、成本低等优点, 但是检测结果对于环境的要求较为苛刻, 温度变化或是搅拌速度都会对实验结果造成影响[11]。IC 具有检测灵敏度高、选择性好、检出限低等优点, 但由于其对样品的前处理要求严格且检测成本高昂, 并不适用于大多数实验室的常规检测。而氟试剂分光光度比色法虽然操作和处理样品均较为简单, 但是南极磷虾中富含大量的虾青素会干扰吸光值的读数从而影响最后的实验结果。近年来, 基于成簇的规律间隔的短回文重复序列/Cas 蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein, CRISPR/Cas)系统的生物传感技术已成为食品安全的高效工具, 尤其在食品重金属离子检测相关领域表现突出[12]。

近年来在细菌和古细菌中发现了一系列氟化物核糖开关[13–15], 因为氟离子比其他化学物质有更小的离子半径, 以及氟离子独特的形成氢键的能力, 使得氟化物核糖开关对氟离子具有高选择性[16–17]。通过对核糖开关的晶体结构研究表明, 该核糖开关可折叠形成三维结构, 并与 3 个镁离子配位, 这种构象仅能结合一个氟离子。在无氟化物存在的情况下, 配体自由的氟化物核糖开关会短暂进入一个低占比且短寿命的激发构象态, 该状态通过解旋一个保守的关键碱基对来触发转录终止[18]。当氟离子存在时, 这种过程被变构抑制, 从而激活转录。此外, 氟化物核糖开关能够根据氟离子浓度调控体外转录的过程, 生成全长 RNA, 当氟离子浓度升高时, 全长 RNA 转录产物的数量随之增加[19]。MA 等[20]报道了利用氟化物核糖开关转录调控与 CRISPR/Cas13a 串联的选择性氟化物传感器。将这种高选择性的氟离子调控转录过程转化为荧光计可检测的信号, 但是非特异性剪切可能带来背景信号问题, 且需要 RNA 提取步骤较复杂, 而且该体系需要加入价格昂贵的大肠杆菌 RNA 聚合酶, 本研究采用了 CRISPR/Cas12 系统, 加入大肠杆菌细胞提取物替代大肠杆菌 RNA 聚合酶, 该系统以单链 DNA 作为反式切割底物, 在 Cas12a 荧光传感器中, 作为反式切割底物[21–26]的单链 DNA 两端会分别修饰荧光和猝灭基团[27], 作为报告探针。当 Cas12a 蛋白-成簇的规律间隔的短回文重复序列 RNA (Cas12a protein-clustered regularly interspaced short palindromic repeats RNA, Cas12a-crRNA)被成功转录后, 反式切割活性会对上述荧光报告探针进行反式切割[28–29], 进而促使荧光和猝灭基团分离, 最终产生荧光信号。

本研究基于氟化物核糖开关对氟离子的高选择性和独特转录模式, 结合 CRISPR/Cas12 技术的反式切割特性, 开发了一种用于氟离子检测新方法。具体而言, 构建了含有氟化物核糖开关的转录模板, 在不同氟离子浓度环境下, 该模板可转录生成不同浓度的全长 RNA; 随后, 利用 Cas12a 蛋白对产生的全长 RNA 进行识别并介导反式切割反应, 产生可检测的绿色荧光信号。优化并建立了基于氟化物核糖开关与 Cas12a 转录反应的检测体系, 获得了不同氟离子浓度下荧光信号强度的变化关系, 并成功应用于南极磷虾氟含量的检测。基于氟化物核糖开关对氟离子的高选择性, 本研究所建立的检测体系有望为食品中氟含量的检测提供新思路和新技术, 具有应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南极磷虾购自辽宁省大连海洋渔业基团公司。

DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒(美国 AXYGEN 公司); DNA Marker(中国 Takara 公司); NTPmix(中国碧云天生物技术公司); 氯化钠、无水碳酸钠(纯度≥99.8%)、六水合氯化镁、氟化钠(NaF)(纯度≥98.0%)、溴化钠、无水碘化钠、无水硫酸钠、无水碳酸钠、二水合磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、硝酸钠、三水合乙酸钠、无水硫酸钙、硝酸钾(纯度≥99.0%)、氯化钾(纯度≥99.5%)、氯化钙(纯度≥96.0%)、氯霉素、酵母提取物、胰蛋白胨(纯度≥98.0%)、谷氨酸镁、谷氨酸钾、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、醋酸(纯度≥99.0%)(国药集团化学试剂有限公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

GeneGenius 凝胶成像分析仪(英国 Syngene 公司); DYY-6D 电泳仪电源、DYCZ-25D 垂直电泳仪、DYCP-31DN 水平电泳仪(北京六一生物科技有限公司); SpectraMax iD5 多功能酶标仪[MolecularDevices 美国分子仪器(上海)有限公司]; SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); BS423S 分析天平(精度 0.001 g, 北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.3 无细胞提取物的制备

无细胞提取物的制备根据 THAVARAJAH 等[14]的方案制备, 将 Rosetta2 细胞划线接种于氯霉素琼脂平板过夜, 随后挑取单菌落转移至含抗生素的 30 mL LB 培养基中 37 ℃培养 16 h。取 20 mL 培养物接种至 1 L 2 倍的酵母提取物和胰蛋白胨加磷酸钾(2×yeast extract and tryptone buffered potassium phosphate, 2×YT+P)培养基中培养。将菌液在 37 ℃、200 r/min 条件下培养至对数生长期(OD_{600}=3.0±0.2)。随后将培养物均分为两份, 于 4 ℃、5000 *g* 条件下离心 15 min 收集细胞。细胞沉淀用 25 mL 洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris, 14 mmol/L 谷氨酸镁, 60 mmol/L 谷氨酸钾, 2 mmol/L DTT, 醋酸调节 pH 至 7.7)洗涤 3 次, 每次洗涤后在 4 ℃、5000 *g* 条件下离心 10 min。第 4 次离心条件为 4 ℃、7000 *g* 离心 10 min, 沉淀物按 1 mL 洗涤缓冲液每克沉淀的比例重悬, 超声裂解至悬浮液变成棕色且黏度降低, 转移至 1.5 mL 离心管中。

将样品置于 37 ℃、200 r/min 条件下带盖振荡 80 min。提取液在 4 ℃、12000 *g* 下再次离心 10 min, 取上清液。将上清置于 10 kDa 透析袋中, 在 4 ℃条件下不交换透析液透析 3 h。透析后的提取液从透析袋中取出, 在 4 ℃、12000 *g* 下再次离心 10 min。取上清液分装后, 于–80 ℃保存备用。

1.4 CRISPR/Cas12a 检测体系建立和优化

CRISPR/Cas12a 转录反应荧光检测体系(20 μL): 4 μL T7 buffer 3 (5X), 2 μL DTT (10.0 mmol/L), 0.8 μL BSA (5.0 mg/mL), 0.2 μL Cas12a 的双链 DNA 靶标 DNT-1 (0.1 μmol/L), 0.16 μL Cas12a 蛋白反式切割底物 (0.1 mmol/L), 2 μL 模板 DNA (50.0 nmol/L), 0.4 μL Cas12a (5.0 μmol/L), 0.4 μL 4 种三磷酸核苷酸底物(nucleoside triphosphates, NTPs) (10.0 mmol/L), 5 μL 无细胞提取物, 0.5 μL NaF, 用无菌水补足至 20 μL。将配制好的体系离心混匀, 转移到酶标仪中, 反应温度 37 ℃, 每隔 30 s 采集一次荧光, 测量实时荧光曲线。

CRISPR/Cas12a 转录反应荧光检测体系优化: 对无细胞提取物的添加量进行优化, 保持体系中的其他组分浓度不变, 改变无细胞提取物的添加量为 0、1、3、5 μL, 体系均用无菌水补齐, 观察荧光强度的变化情况。对 DNA 模板的种类以及浓度优化, 设置 CRISPR 反应体系中的模板分别为 Anderson 启动子单核糖开关、λ_{PR} 启动子单核糖开关、λ_{PR} 启动子双核糖开关、λ_{PR} 启动子四核糖开关, 分别添加浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0 nmol/L, 其他条件保持不变, 以无菌水作为阴性对照, 观察何种模板的何种浓度下的 NaF 激活具有最好的效果。

1.5 CRISPR/Cas12a 检测体系选择性和干扰性分析

选取具有效果最好的 DNA 模板进行 CRISPR/Cas12a 转录反应荧光检测体系的特异性实验。Cas12a 反应混合体系与上述 1.4 相同。对反应体系的选择性分析, 将反应体系中的 NaF 更换为 0.2 mmol/L 氯化钠、0.2 mmol/L 溴化钠、0.2 mmol/L 碘化钠、0.2 mmol/L 碳酸钠、0.2 mmol/L 硫酸钠、0.2 mmol/L 磷酸二氢钠、0.2 mmol/L 磷酸氢二钠、0.2 mmol/L 硝酸钠、0.2 mmol/L 乙酸钠、50.0 μmol/L 常见阴离子混合物(氯化钠、硝酸钠、碳酸钠、硫酸钠)和 18.0 μmol/L 阴离子混合物(氯化钠、溴化钠、碘化钠、碳酸钠、硫酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硝酸钠、乙酸钠)。其他条件保持不变, 以无菌水作为阴性对照, 0.2 mmol/L NaF 作为阳性对照, 检测添加不同阴离子的激活效果。对反应体系的干扰性分析, 在含有 0.2 mmol/L NaF 的不同样品中添加不同的常见干扰物, 添加 0.1 mmol/L 氯化钠、0.1 mmol/L 氯化钾、0.1 mmol/L 氯化镁、0.1 mmol/L 氯化钙、25.0 μmol/L 常见阳离子混合物(12.5 μmol/L 碳酸钠、25.0 μmol/L 硝酸钾、25.0 μmol/L 氯化镁、25.0 μmol/L 硫酸钙)。其他条件保持不变, 以无菌水作为阴性对照, 0.3 mmol/L NaF 作为阳性对照, 检测常见阳离子的干扰效果。

1.6 南极磷虾样品的处理与氟含量的测定

将南极磷虾样品解冻, 用镊子在放大镜下将虾壳与虾肉分离开, 头胸部与腹尾部。外壳用蒸馏水冲洗数次, 除去残留在壳上的虾肉。将处理好的样品分别装入烧杯中,

放入烘箱 70 ℃烘干, 用粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 于通风橱内保存。称取 1.00 g 粉碎过 40 目筛的试样, 置于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 盐酸(1:11, *V*:*V*)。密闭浸取提取 1 h(不时轻轻摇动), 应尽量避免试样黏于管壁上。5000 *g* 离心 10 min 后取上清, 过 0.45 μm 滤膜, 滤液平均分成 2 份。向其中一份上清液中加入 25 mL 总离子强度缓冲剂, 转移至 50 mL 容量瓶中加水至刻度, 混匀, 用于氟 ISE 检测氟含量。向另一份上清液中加入 25 mL 蒸馏水, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 转移至 50 mL 容量瓶中, 蒸馏水定容至刻度, 用于 Cas12a 转录反应体系的检测。

1.7　数据处理

本研究的所有图均采用 Origin 2021 处理, 表格采用 Microsoft Word 2023 制作, 每次实验均测得 3 次平行数据, 对每组的 3 个数据进行标准偏差计算, 运用 IBM SPSS Statistics 27 进行数据显著性分析。

2　结果与分析

2.1　氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系检测体系优化

2.1.1　无细胞提取物的浓度优化

在反应体系中添加不同量的无细胞提取物, 结果如图 1 所示, 不添加无细胞提取物的阴性对照组没有荧光信号, 添加了无细胞提取物的实验组随着添加量的增加反应的荧光值也随之升高。但无细胞提取物添加 3 μL 和 5 μL, 反应的荧光值增加变化不大, 考虑到反应的总体系是 20 μL, 没有继续增加无细胞提取物添加体积, 本研究最终选取 5 μL 无细胞提取物进行后续实验。

2.1.2　λ_{PR} 启动子单核糖开关 DNA 模板的浓度优化

反应体系添加不同终浓度的模板, 反应所测的荧光信号如图 2 所示, 终浓度为 5.0 nmol/L 的模板具有更快的反应速率已经更高的荧光强度, 且如图 3 所示, 选取了反应时间为 1 h 时的荧光强度并减去空白值, 5.0 nmol/L 的模板具有更良好的线性以及更大的响应, 因此后续选择此浓度进行后续实验。

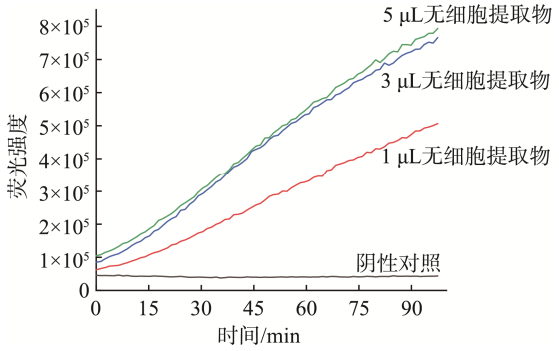
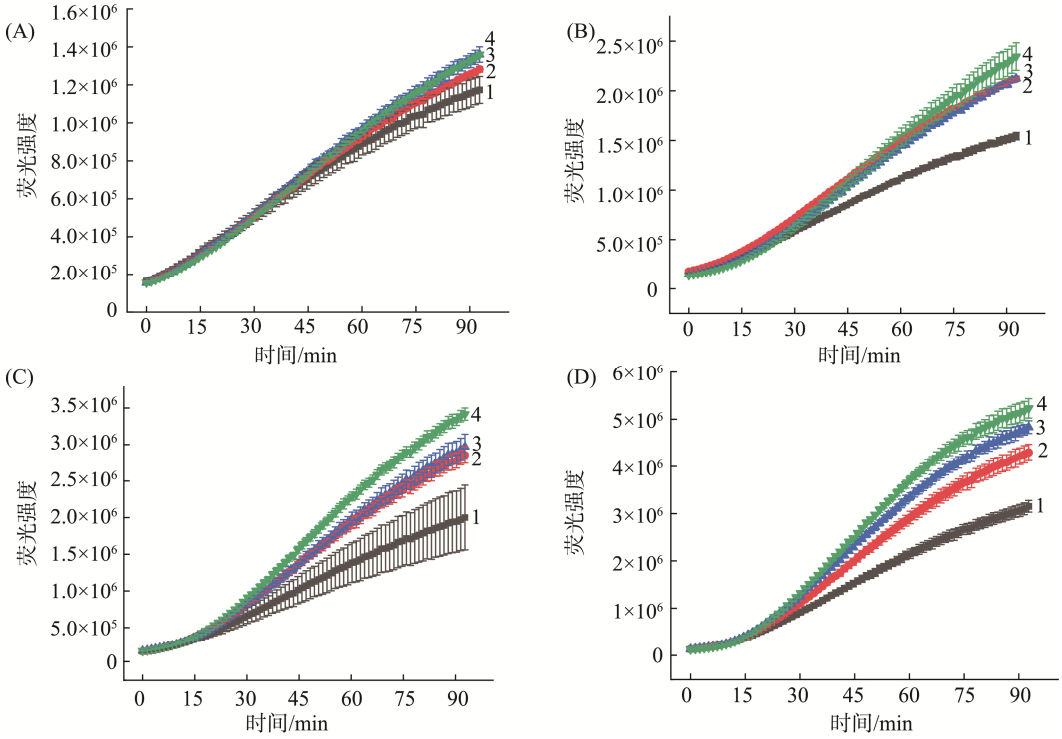


图 1　无细胞提取物添加量的筛选

Fig.1　Optimization of the addition amount of cell-free extracts



注: 图(A)~(D)分别为 λ_{PR} 启动子单核糖开关模板 0.1、0.5、1.0、5.0 nmol/L。1. 0 mmol/L NaF; 2. 0.1 mmol/L NaF; 3. 0.2 mmol/L NaF; 4. 0.5 mmol/L NaF。

图 2　不同 DNA 模板浓度下的动态荧光强度

Fig.2　Dynamic fluorescence intensity at different DNA template concentrations

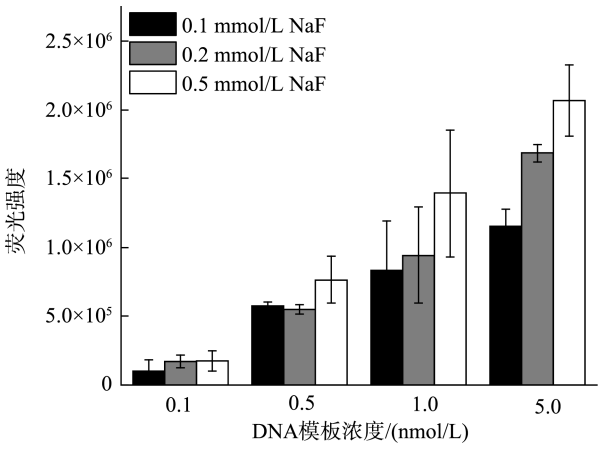


图 3 不同 DNA 模板浓度和不同 NaF 浓度下的荧光强度变化

Fig.3 Fluorescence intensity changes at different DNA template concentrations and different NaF concentrations

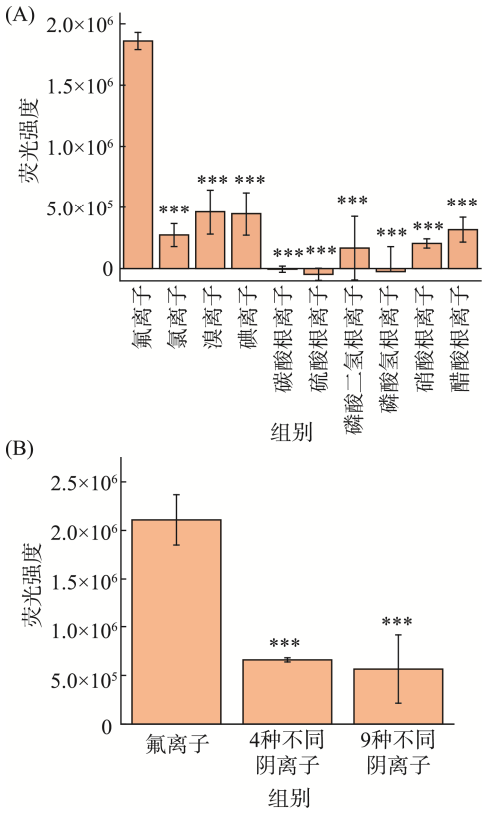
2.2 氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系选择性和干扰性分析

2.2.1 氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系选择性分析

本研究的反应检测体系也通过了在 0.2 mmol/L 的浓度下在氟离子或其他潜在干扰物存在下进行选择性分析。反应结果如图 4(A)所示，除氟离子外，添加其他阴离子没有明显的激活响应，而且在氟离子存在的情况下荧光信号显著高于其他阴离子(P<0.001)。此外，考虑到真实的样品中可能含有的是阴离子的混合物而并非单一的阴离子，于是本研究也在各种阴离子的混合物条件下，例如常见的 4 种不同的常见阴离子以及 9 种不同的阴离子混合物进行测试，测试结果如图 4(B)所示，与单独的氟离子存在的情况下相比，阴离子混合物的混合物对体系的激活响应较弱(P<0.001)。

2.2.2 氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系干扰性分析

在真实样品中，使用氟化物核糖开关检测体系还可能受到常见的一些阳离子的干扰。因此，对这些干扰物进行了分析。为了研究常见阳离子的干扰，本研究在 0.2 mmol/L 氟离子的浓度下添加不同的浓度为 0.1 mmol/L 的阳离子，以无菌水作为阴性对照组进行了实验。不同组别的离子组成见表 1，结果如图 5 所示。添加了不同种类的阳离子，其中添加了 0.1 mmol/L 的钙离子，导致荧光值明显偏低，因为钙离子与氟离子形成了氟化钙沉淀从而影响了氟离子对反应体系的激活效果，而低浓度的钙离子对体系的影响小，其他的阳离子不管是在高浓度和低浓度条件下，都不影响氟离子对反应体系的激活效果，表明了反应体系具有较好的稳定性。



注: ***表示与氟离子相比差异强极显著(P<0.001)。

图 4 氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系选择性分析结果

Fig.4 Results of selectivity analysis of fluoride riboswitch transcription-CRISPR/Cas12a system

表 1 不同组别离子的组成

Table 1 Ions' composition in different groups

组别	氟离子	钠离子	钾离子	镁离子	钙离子	阴离子混合物
1	+	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
3	+	-	+	-	-	-
4	+	-	-	+	-	-
5	+	-	-	-	+	-
6	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+

注: +表示添加了此种类型的离子; -表示没有添加此种类型的离子; 阴离子混合物(氯化钠、硝酸钠、碳酸钠、硫酸钠)。

2.3 南极磷虾的样品氟含量检测

采用本研究中建立的基于氟化物核糖开关转录反应体系检测氟含量的方法，绘制出标准曲线 Y=–789589.59881X+2586382.92029 (r^2=0.99)，线性范围为 0.006~1.200 mmol/L，检出限 0.001 mmol/L。对于氟离子含量 0.1 mmol/L 的标准品重复测定 7 次，相对标准偏差为

9.8%, 在空白溶液中加入 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L 的氟离子, 回收率分别为 98.2%和 93.1%。在此, 对本研究中建立的基于氟化物核糖开关转录反应体系检测氟含量的方法和氟 ISE、IC 以及分光光度法进行了比较(表 2), 本研究建立的方法具有较宽的线性范围和较低的检出限, 且整个反应过程可在 1.5 h 内完成。

采用本研究中建立的基于氟化物核糖开关转录反应体系检测南极磷虾氟含量, 结果与国家标准方法氟 ISE 法检测的南极磷虾氟含量结果基本一致, 其中虾肉和虾壳的氟含量检测相对标准偏差分别为 11.2%和 11.5%, 而全虾的相对标准偏差为 25.8%(表 3), 分析原因可能是全虾中的成分过于复杂在一定程度上干扰了反应体系的进行, 导致结果偏小。表明可以使用本研究中所建立的方法用于南极磷虾中氟含量的检测。

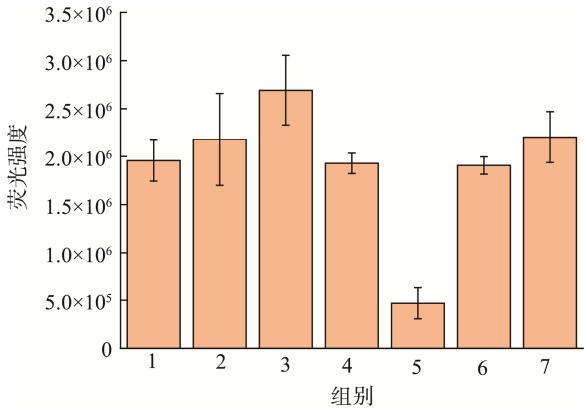


图 5　氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系干扰性分析结果

Fig.5　Results of interference analysis of fluoride riboswitch transcription-CRISPR/Cas12a system

表 2　本研究方法与其他氟离子检测方法的比较

Table 2　Comparison of this proposed method with other methods for fluoride detection

方法	线性范围	检出限	参考文献
氟 ISE	0.04~50.00 μg/mL	-	[8]
IC	0.5~50.0 mg/L	0.01 mg/L	[9]
分光光度法	0.050~1.000 mg/L	0.0328 mg/L	[10]
氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系	0.006~1.200 mmol/L	0.001 mmol/L	本方法

注: -表示参考文献中没有检出限的结果。

表 3　氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系检测南极磷虾中氟含量

Table 3　Detection fluoride content in *Euphausia superba* by the fluoride riboswitch transcription-CRISPR/Cas12a system

样品	氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 体系/(mg/kg)	氟 ISE/(mg/kg)	相对标准偏差/%
全虾	714.05±3.87	962.12±1.89	25.8
虾肉	180.51±2.53	203.14±1.63	11.2
虾壳	1995.82±5.76	2254.97±1.45	11.5

3　结　论

南极磷虾中过量的氟是影响其进一步开发的关键原因之一[30]。基于核酸层面的检测技术因其特异性强, 灵敏度高等优点而被广泛使用[31]。氟化物核糖开关是近期被发现的具有高选择性的核酸结构, 通过其与 CRISPR/Cas12 系统相结合提高了对氟离子检测的灵敏性, 也在现场检测方面有巨大的开发潜力。

本研究成功构建基于氟化物核糖开关的 CRISPR/Cas12 体外转录反应体系荧光可视化检测方法, 整个反应过程可在 1.5 h 内完成。优化并建立了基于氟化物核糖开关与 Cas12a 转录反应的检测体系, 同时进行了该体系的选择性和干扰分析, 应用于南极磷虾的氟含量的检测结果较准确。采用无细胞提取物替代大肠杆菌 RNA 聚合酶, 价格相对低廉, 而且不需要大型的仪器设备, 可用于基层或现场的实地检测。但是对于全虾样品, 检测偏差较大, 后续进一步优化复杂样品的前处理步骤, 减少复杂基质样品对氟化物核糖开关转录反应-CRISPR/Cas12a 检测体系的干扰, 以期用于复杂基质样品的检测应用。

参考文献

[1] BAKER AC, BODEN BP, BRINTON E. A practical guide to the euphausiids of the world [M]. London: Natural History Museum Publications, 1990.

[2] 刘慧, 朱国平. 近百年来南极磷虾分布冷热点的时空变动[J]. 应用生态学报, 2020, 31(3): 1015–1022.
LIU H, ZHU GP. Spatial-temporal variation in hotspot and cold spot of *Antarctic krill* distribution in recent 100 years [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(3): 1015–1022.

[3] 刘永新, 李梦龙, 方辉, 等. 南极磷虾的资源概况与生态系统功能[J]. 水产学杂志, 2019, 32(1): 55–60.

LIU YX, LI ML, FANG H, *et al*. Resources status and ecosystem function in *Antarctic krill* [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(1): 55–60.

[4] 王紫一, 赵国庆, 黄洪亮, 等. 南极磷虾渔业兼捕鱼类组成及其分布特征[J]. 海洋渔业, 2025, 47(2): 253–262.
WANG ZY, ZHAO GQ, HUANG HL, *et al*. Composition and distribution characteristics of incidentally caught fish in the *Antarctic krill* fishery [J]. Marine Fisheries, 2025, 47(2): 253–262.

[5] 马娜, 李静, 李桐, 等. 南极磷虾油的营养成分及健康功效研究进展[J]. 食品工业, 2023, 44(7): 332–336.
MA N, LI J, LI T, *et al*. Advance on nutrition and health functions of *Antarctic krill* oil [J]. The Food Industry, 2023, 44(7): 332–336.

[6] 《中国渔业报》报社. 南极磷虾有潜力成为新型优质蛋白质来源[J]. 水产科技情报, 2024, 51(6): 406.
The office of China Fisheries News. *Antarctic krill* has the potential to become a new and high-quality protein source [J]. Fisheries Science & Technology Information, 2024, 51(6): 406.

[7] 刘云姣, 张海燕, 沈晓盛. 南极磷虾中氟的研究进展[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2018, 37(4): 356–361.
LIU YJ, ZHANG HY, SHEN XS. Research progress of fluorine in *Antarctic krill* [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2018, 37(4): 356–361.

[8] 盛晓风, 郭莹莹, 尚德荣, 等. 离子选择电极法测定高氟样品中氟的方法改进[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 285–289.
SHENG XF, GUO YY, SHANG DR, *et al*. Improvement of fluorine-ion selective electrode method for determination of fluorine in high fluoride samples [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(9): 285–289.

[9] ZHAO YL, ZHU LL, SUN Y, *et al*. Determination of fluoride in *Antarctic krill* (*Euphausia superba*) using ion chromatography and its pretreatments selection [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2015, 33(1): 77–82.

[10] 沙鸥, 刘华, 鲍佳琦, 等. 离子液体增敏分光光度法测定南极磷虾中氟含量[J]. 食品研究与开发, 2020(41): 173–177.
SHA OU, LIU H, BAO JQ, *et al*. Determination of fluoride in *Antarctic krill* by ionic liquid sensitization spectrophotometry [J]. Food Research and Development, 2020(41): 173–177.

[11] FERNANDA G. Ion-selective electrode determination of fluoride ion [Z].

[12] HE WC, LIN JY, ZENG QH. Recent advances in the development of food contaminations detection based on functional nucleic acids-CRISPR/Cas system [J]. Microchemical Journal, 2025, 219: 116185.

[13] BOYD MA, THAVARAJAH W, LUCKS JB, *et al*. Robust and tunable performance of a cell-free biosensor encapsulated in lipid vesicles [J]. Science Advances, 2023, 9(1): eadd6605.

[14] THAVARAJAH W, SILVERMAN AD, VEROSLOFF MS, *et al*. Point-of-use detection of environmental fluoride via a cell-free riboswitch-based biosensor [J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 9(1): 10–18.

[15] ARIYARATHNA MR, NISSANKA JP, METHLAL K, *et al*. Simple and cost-effective fluoride riboswitch-based whole-cell biosensor for the determination of fluoride in drinking water [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2025, 197(8): 5552–5562.

[16] BAKER JL, SUDARSAN N, WEINBERG Z, *et al*. Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride [J]. Science, 2012, 335(6065): 233–235.

[17] REN A, RAJASHANKAR KR, PATEL DJ. Fluoride ion encapsulation by Mg^{2+} ions and phosphates in a fluoride riboswitch [J]. Nature, 2012, 486(7401): 85–89.

[18] ZHAO B, GUFFY SL, WILLIAMS B, *et al*. An excited state underlies gene regulation of a transcriptional riboswitch [J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(9): 968–974.

[19] CHAWLA M, CREDENDINO R, POATER A, *et al*. Structural stability, acidity, and halide selectivity of the fluoride riboswitch recognition site [J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(1): 299–306.

[20] MA Y, MOU Q, YAN P, *et al*. A highly sensitive and selective fluoride sensor based on a riboswitch-regulated transcription coupled with CRISPR-Cas13a tandem reaction [J]. Chemical Science, 2021, 12(35): 11740–11747.

[21] SWARTS DC, JINEK M. Mechanistic insights into the cis-and trans-acting DNase activities of Cas12a [J]. Molecular Cell, 2019, 73(3): 589–600.

[22] RUSK N. Spotlight on Cas12 [J]. Nature Methods, 2019, 16(3): 215–216.

[23] STROHKENDL I, SAIFUDDIN FA, RYBARSKI JR, *et al*. Kinetic basis for DNA target specificity of CRISPR-Cas12a [J]. Molecular Cell, 2018, 71(5): 816–824.

[24] MELIAWATI M, SCHILLING C, SCHMID J. Recent advances of Cas12a applications in bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(8): 2981–2990.

[25] LI SY, CHENG QX, LIU JK, *et al*. CRISPR-Cas12a has both cis-and trans-cleavage activities on single-stranded DNA [J]. Cell Research, 2018, 28(4): 491–493.

[26] SWARTS DC, VAN-DER OJ, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a [J]. Molecular Cell, 2017, 66(2): 221–233.

[27] 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: 211–222.

[28] FEI X, LEI C, REN W, *et al*. Regulating the trans-cleavage activity of CRISPR/Cas12a by using an elongation-caged single-stranded DNA activator and the biosensing applications [J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(32): 12169–12176.

[29] HUANG Z, LIU S, PEI X, *et al*. Fluorescence signal-readout of CRISPR/Cas biosensors for nucleic acid detection [J]. Biosensors, 2022, 12(10): 779.

[30] 朱兰兰, 赵彦玲, 赵晓君, 等. 南极磷虾中氟含量的调查分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 55–57.
ZHU LL, ZHAO YL, ZHAO XJ, *et al.* Investigation and analysis of the fluoride content in *Euphausia superba* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(24): 55–57.

[31] 王姗姗, 闫君, 杜彤彤, 等. 基于CRISPR-Cas12a的环介导等温核酸扩增技术在 SARS-CoV-2 病毒检测中的应用(英文)[J]. 武汉大学自然科学学报(英文版), 2024, 29(5): 453–460.
WANG SS, YAN J, DU TT, *et al*. Detection of SARS-CoV-2 and its mutated variants using RT-LAMP-CRISPR-Cas12a platform [J]. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2024, 29(5): 453–460.

(责任编辑: 安香玉 冯东慧)