DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260121005
引用格式: 金晶, 陈大伟, 李兵兵, 等. 等温核酸扩增-CRISPR-Cas12a 技术快速检测牛肉中的 2 种食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(12): 67–74.
JIN J, CHEN DW, LI BB, *et al*. Rapid detection of 2 kinds of foodborne pathogenic bacteria in beef by recombinase aided amplification-CRISPR-Cas12a technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(12): 67–74. (in Chinese with English abstract).

等温核酸扩增-CRISPR-Cas12a 技术快速检测牛肉中的 2 种食源性致病菌

金 晶[1], 陈大伟[2*], 李兵兵[2], 刘 靓[2], 李 栋[1]
(1. 淮安市清江浦区疾病预防控制中心, 淮安 223001; 2. 淮安市疾病预防控制中心, 淮安 223003)

摘 要: 目的 建立双重重组酶介导的等温核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)和成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein, CRISPR-Cas)技术快速检测蜡样芽胞杆菌和单核细胞增生李斯特菌的方法。**方法** 分别以 *gyrB* 基因和溶菌素毒力基因 *hly* 为检测靶标, 设计了 RAA 引物和 crRNA, 分析了其灵敏度和特异性, 同时通过实际样本评估了本方法的阳性检出率。**结果** 双重 RAA/CRISPR-Cas12a 技术可在 37 ℃、40 min 内检出 0.0001 ng/μL 的蜡样芽孢杆菌基因组 DNA 以及 0.001 ng/μL 的单核细胞增生李斯特菌基因组 DNA, 与其他食源性致病菌(沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、产气荚膜梭菌、副溶血性弧菌)无交叉反应。以荧光定量为对照, 对 30 份牛肉样本进行检测, RAA/CRISPR-Cas12a 检出 5 份, 阳性检出率为 100%, 与荧光定量方法一致。**结论** 本研究建立的双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测方法检测速度快, 具有较高的灵敏度和特异性, 可用于检测食品中蜡样芽胞杆菌和单增李斯特菌。

关键词: 蜡样芽胞杆菌; 单增李斯特菌; 双重重组酶介导的等温核酸扩增; 成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白

Rapid detection of 2 kinds of foodborne pathogenic bacteria in beef by recombinase aided amplification-CRISPR-Cas12a technology

JIN Jing[1], CHEN Da-Wei[2*], LI Bing-Bing[2], LIU Liang[2], LI Dong[1]
(1. *Qingjiangpu District Center for Disease Control and Prevention*, *Huai'an* 223001, *China*;
2. *Huai'an Center for Disease Control and Prevention*, *Huai'an* 223003, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a dual recombinase aided amplification (RAA) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein (CRISPR-Cas) technology for the rapid detection of *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Methods** Using the *gyrB* gene and the listeriolysin virulence gene *hly* as detection

收稿日期: 2026-01-21
基金项目: 江苏省预防医学科研课题项目(Ym2023085)
第一作者: 金晶(1991—), 女, 主管技师, 主要研究方向为微生物检验。E-mail: 2396513721@qq.com
***通信作者:** 陈大伟(1991—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为微生物检验。E-mail: 1832324965@qq.com

targets, RAA primers and crRNAs were designed. Their sensitivity and specificity were analyzed and the positive detection rate of this method was evaluated using actual samples. **Results** The dual RAA/CRISPR-Cas12a technology could detect 0.0001 ng/μL of *Bacillus cereus* genomic DNA and 0.001 ng/μL of *Listeria monocytogenes* genomic DNA within 40 minutes at 37 ℃, with no cross-reactivity against other foodborne pathogens (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*). Using real-time polymerase chain reaction as a reference, 30 beef samples were tested. The RAA/CRISPR-Cas12a method detected 5 positive samples, achieving a positive detection rate of 100%, consistent with the real-time polymerase chain reaction method. **Conclusion** The dual RAA/CRISPR-Cas12a detection method established in this study offers rapid detection, high sensitivity, and high specificity, making it suitable for detecting *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* in food.

KEY WORDS: *Bacillus cereus*; *Listeria monocytogenes*; dual recombinase aided amplification; clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein

0 引 言

食源性致病菌是一类能引起食物中毒或以食品为传播媒介的致病微生物，食源性致病菌是导致食品安全问题的重要来源。例如蜡样芽孢杆菌和单核细胞增生李斯特菌。蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)是一种革兰氏阳性、兼性厌氧、能够形成芽胞的细菌，广泛分布于环境中[1]。其污染食品后能够快速进行繁殖，同时产生大量毒素，从而导致人食物中毒[2]。目前已在多种食物中分离出蜡样芽胞杆菌如：蔬菜、肉类、乳制品、米饭以及各类甜品中等[3−5]。呕吐型蜡样芽胞杆菌引起的呕吐症状可导致急性脑病、肝功能衰竭，甚至死亡[6−7]。单核细胞增生李斯特菌[简称单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)]是一种胞内寄生菌，能够引起自然流产、新生儿败血症、脑膜脑炎等疾病，能够污染多种肉类制品[8−9]。与其他主要感染胃肠道的食源性病原体相比，单增生李斯特菌能够穿透血脑屏障和胎盘屏障，增加疾病的严重程度[10]。单增李斯特菌能够耐受低温、低 pH 以及高盐等极端条件，同时具有较高的病死率，因此美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)禁止食品中检出[11]；我国食品安全国家标准也规定肉制品中不得检出单增李斯特菌。为确保公共卫生和食品安全，需要采用快速和简便的方法来检测食源性致病菌。

目前食源性致病菌的常用检测方法主要有病原学检测[12]、免疫学检测[13−14]和分子生物学检测[15−17]。病原学检测主要是培养法，较耗时费力；免疫学检测主要是依赖于抗原抗体的特异性反应，但是单克隆抗体的制备成本较高；分子生物学检测主要是依赖于核酸扩增反应，包括聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)以及等温扩增法，随着对检测时效性以及成本的要求逐渐提高，传统的培养法、免疫法以及 PCR 法由于检测速度以及检测场地等因素限制了其应用，因此需要开发更加便捷高效的方法。

成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein, CRISPR-Cas)检测是近年来发展较为迅速的检测方法，其原理为：首先向导 RNA 与 CRISPR-Cas 蛋白形成复合物，该复合物沿着基因组 DNA 搜索与向导 RNA 互补的靶标 DNA 序列，搜索并结合到特异性位点后，该复合物产生反式切割活性，可随机切割周围环境中任意单链 DNA，体系中加入荧光标记的淬灭探针，当被反式切割后，荧光基团与淬灭基团分离，产生可检测的荧光信号。由于 CRISPR-Cas 检测技术对于低浓度靶标识别能力有限，因此通常需要与其他核酸扩增技术相结合，如常用的等温扩增技术。目前已有较多研究将 CRISPR 检测技术应用于食源性致病菌的检测，如李凡[18]以 LMOSLCC2755_0090 基因为靶标建立重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)/CRISPR-Cas12a 电化学检测方法检测单增李斯特菌。LI 等[19]以蜡样芽孢杆菌 *cesB* 基因为靶标建立了 RPA/CRISPR-Cas12a 荧光检测方法，可在 40 min 内检出低至 0.01 ng/μL 的基因组 DNA。虽然目前关于等温扩增与 CRISPR-Cas12a 结合应用于食源性致病菌检测有一定报道，但是多集中于单重检测，对于双重检测报道较少。

前期研究中陈大伟等[20]建立了单增李斯特菌 RPA/CRISPR-Cas12a 检测体系，本研究在此基础上以蜡样芽孢杆菌 *gyrB* 基因和单增李斯特菌溶菌素毒力基因 *hly* 为检测靶标建立了双重 RAA 检测体系，同时结合 CRISPR-Cas12a 检测体系建立了双重重组酶介导的等温核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)/CRISPR-Cas12a 两步法荧光检测体系，旨在建立一种检测速度快、特异性强、灵敏度高的 RAA/CRISPR- Cas12a 快速检测方法，为食品中食源性致病菌的检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

本研究中所涉及的菌株如表 1 所示。蜡样芽胞杆菌荧光定量检测试剂盒、单增李斯特菌荧光定量检测试剂盒(50 rxn，上海伯杰医疗科技有限公司)；RAA 核酸扩增试剂盒(48 rxn，江苏奇天基因公司)；CRISPR-Cas12a 蛋白(10 μmol/L，

表 1　本研究所用菌株
Table 1　Strains used in this study

菌株	菌株编号	来源
蜡样芽胞杆菌	ATCC 11778	本实验室保存
单增李斯特菌	ATCC 19115	本实验室保存
肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)	ATCC 14028	本实验室保存
金黄色葡萄球菌(*Staphyloccocus aureus*)	ATCC 29213	本实验室保存
肠出血性大肠杆菌 O157:H7 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7)	NCTC 12900	本实验室保存
产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)	ATCC 13124	本实验室保存
副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)	BNCC 333072	本实验室保存

吐露港生物科技有限公司); NEB buffer kit [B7030S, 10×buffer, 英国 Biolabs (Beijing) Ltd.公司]; 生理盐水(纯度 0.9%, 北京索莱宝科技有限公司); 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); RNase-free ddH_2O_2(北京兰杰柯科技有限公司)。

1.2　引　物

本研究所用引物如表 2 所示, RAA 恒温扩增引物用于扩增蜡样芽胞杆菌特异性基因 *gyrB*[21]和单增李斯特菌溶菌素毒力基因 *hly*[22], 荧光探针单链脱氧核糖核酸(single-stranded DNA, ssDNA)用于指示反应, 引物均由上海生工生物股份有限公司合成。crRNA 设计在网站: https://ezassay.com/primer 上完成。

1.3　仪器与设备

3K15 离心机(德国默克公司); ABIQ5 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司); DH209L 电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司); GelDoc XR Biorad 凝胶成像系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]; Qubit2.0 荧光定量仪(美国应用生物系统公司); ME802E 天平(精度 0.01 g, 瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.4　方　法

1.4.1　菌株活化和菌液制备

将冻存的菌种在常温下解冻, 并通过平板划线法, 在 LB 培养基上对其进行活化。然后, 选取单个典型菌落接种于相应的培养基中, 如蜡样芽孢杆菌, 在 37 ℃下恒温振荡(转速为 180 r/min)培养 24 h。吸取培养后的菌液 1 mL 于 1.5 mL 无菌离心管中, 10000 r/min 离心 3 min, 除去上清, 用 0.9%生理盐水洗涤 2 次并重悬, 提取基因组 DNA 后备用。

1.4.2　双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系的构建

首先提取基因组 DNA, 根据 RAA 恒温扩增试剂盒说明方法扩增靶标 DNA, 50 μL 扩增体系的配制: 25 μL 缓冲液 V、2.5 μL 醋酸镁、引物 1 μL 5 μmol/L RAA-F1/R1 和 3 μL 5 μmol/L RAA-F2/R2、模板 5 μL、13.5 μL RNase-free ddH_2O_2, 后置于 37 ℃恒温扩增 20 min, 扩增产物备用。

CRISPR-Cas12a 与 crRNA 复合物的准备: 20 μL CRISPR-Cas12a 蛋白(1 μmol/L)与 10 μL crRNA1 (1 μmol/L)和 10 μL crRNA2 (1 μmol/L)混合均匀后置于 37 ℃恒温孵育 10 min 后形成 RNP 复核物备用。20 μL 检测体系的配制[23]: 3 μL RNP, 5 μL 重组酶介导的 RAA 扩增产物, 2 μL 10×Tolo buffer for Cas12a, 1 μL ssDNA (10 μmol/L), 9 μL RNase-free ddH_2O_2。

1.4.3　人工污染样本处理及检测

称取牛肉样品 25 g, 放入盛有 225 mL 生理盐水的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 2 min。在 900 μL 匀浆中加入终质量浓度为 0.01~0.50 ng/μL 的待检细菌 DNA 以及终浓度为 10^8~10^5 CFU/mL 的菌体, 振荡混匀, 配制的加标样品以 500 r/min 低速离心 30 s, 以去除大颗粒食品颗粒, 上清液通过煮沸法提取核酸; 用双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系以及荧光定量 PCR 试剂盒进行检测。

1.5　数据处理

使用 Origin 9.0 软件作图, 使用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析。双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测实验部分均重复 3 次, 使用独立样本 *t* 检验, 当双尾 $P<0.05$ 判定差异有统计学意义。

表 2　实验中引物信息
Table 2　Information of primers in this study

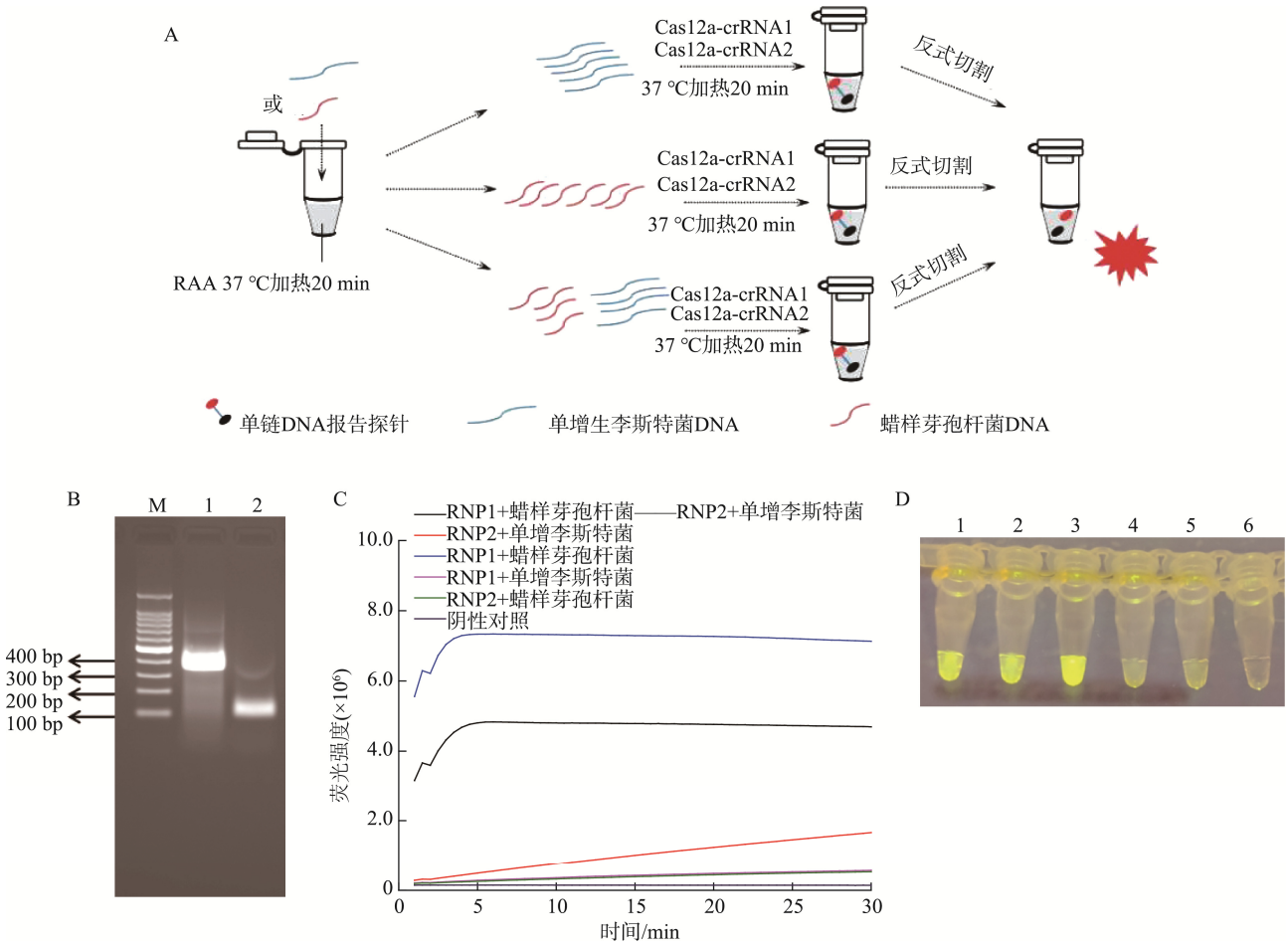
引物名称	引物序列	用途
RAA-F1	TACATCGTGAAGGTA AAATCCATTACCAAA AATAC	扩增 *gyrB* 基因片段
RAA-R1	TTATATTGAAGAGAA ACCTCAACCTGAATACCA	
RAA-F2	AATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAG	靶向 *hly* 基因片段
RAA-R2	ATTTCGGATAAAGCGTGGTGCCCCAGATGGA	
crRNA1	UAAUUUCUACUCUUGUAGAUUCGGAUCUGGUUUAAAUCGAGUUA	*gyrB* 基因 crRNA
crRNA2	UAAUUUCUACUCUUGUAGAUUUGUUCACCAUUCAAGGCCAG	*hly* 基因 crRNA
ssDNA	5'FAM-TCTACTCTC-3'BHQ1	荧光报告探针

2 结果与分析

2.1 RAA/CRISPR-Cas12a 检测流程和可行性分析

双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测流程如图 1 所示，双重 RAA 能够扩增出相应的核酸靶标，然后吸取 5 μL RAA 扩增产物加入 CRISPR-Cas12a 检测体系中，当检测体系中存在蜡样芽孢杆菌或单核细胞增生李斯特菌检测靶标基因时，CRISPR-Cas12a 检测体系能够产生荧光信号，当检测体系中既不存在蜡样芽孢杆菌也不存在单核细胞增生李斯特菌检测靶标基因时，CRISPR-Cas12a 检测体系不能够产生荧光信号。

根据蜡样芽孢杆菌的 *gyrB* 基因序列和单核细胞增生李斯特菌 *hly* 基因序列分别设计了 RAA-F1、RAA-R1 引物和 RAA-F2、RAA-R2 引物以及针对扩增产物部分设计的 crRNA1 和 crRNA2；为了验证检测体系的可行性，分别以蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌提取的基因组 DNA 为模板进行 RAA 扩增，结果如图 1A 所示，RAA-F1/R1 和 RAA-F2/R2 可以扩增出目标大小的序列分别为 379 bp 和 111 bp，RAA-F2/R2 有微弱的非目标条带；说明设计的恒温扩增引物较合理。其次验证了所设计 crRNA 的激活效果，分别取恒温扩增产物 5 μL 加入 CRISPR-Cas12a 检测体系中，结果如图 1B 所示，只有加入了对应扩增产物的体系能够产生荧光信号；蜡样芽孢杆菌的检测信号响应速度和荧光值更快，更强，单增李斯特菌的检测信号相对较弱和慢，将检测结果置于 490 nm 蓝光仪下结果如图 1C 所示，只有加入了靶标核酸的 PCR 管产生了肉眼可见荧光信号，说明所设计的 crRNA 较合理，同时相互之间没有交叉反应。以上结果表明利用所设计的引物建立 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系是可行的。



注：A. RAA/CRISPR-Cas12a 检测流程；B. RAA 引物扩增特异性验证(泳道 M：100 bp DNA Ladder，泳道 1：蜡样芽孢杆菌 *gyrB* 基因扩增产物，泳道 2：单增李斯特菌 *hly* 基因扩增产物)；C. crRNA 的激活效果验证(RNP1：蜡样芽孢杆菌 crRNA1 和 AsCas12a 蛋白形成的复合物，RNP2：单增李斯特菌 crRNA2 和 AsCas12a 蛋白形成的复合物)；D. CRISPR-Cas12a 检测体系荧光结果(从 1~6 为 RNP1+蜡样芽孢杆菌和 RNP2+单增李斯特菌、RNP2+单增李斯特菌、RNP1+蜡样芽孢杆菌、RNP1+单增李斯特菌、RNP2+蜡样芽孢杆菌、阴性对照)。

图 1 RAA/CRISPR-Cas12a 检测流程和可行性分析

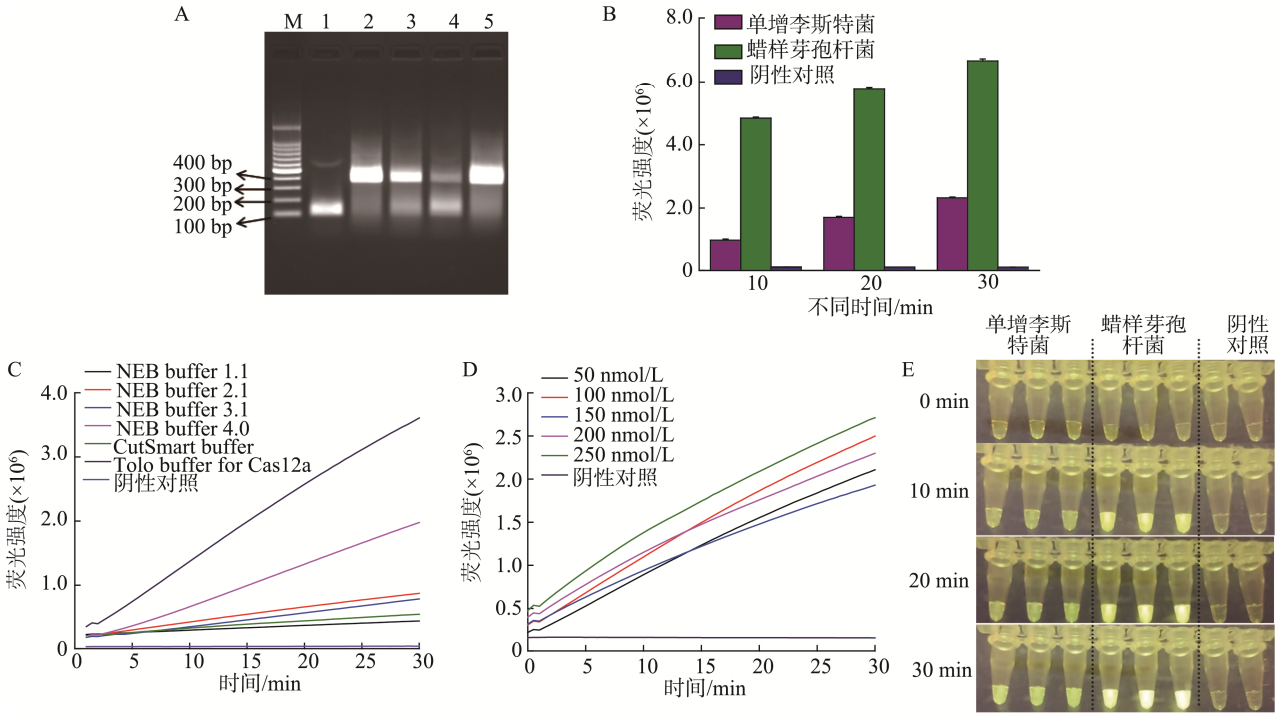
Fig.1 Detection process and feasibility analysis of the RAA/CRISPR-Cas12a

2.2　双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系的建立

为了建立双重 RAA 扩增体系, 本研究对 RAA 扩增的引物浓度、反应时间进行优化, 结果如图 2A 和 2B 所示; 图 2A 中, 向 RAA 检测体系中加入不同浓度比的 RAA-F1/R1 和 RAA-F2/R2: (0+400)、(400+0)、(200+200)、(100+300)、(300+100) nmol/L, 泳道 4 当加入 100 nmol/L RAA-F1/R1 和 300 nmol/L RAA-F2/R2 时, 两个目标条带扩增效果最好, 所以选择 100 nmol/L RAA-F1/R1 和 300 nmol/L RAA-F2/R2 为双重 RAA 扩增条件; 图 2B 中, 随着双重 RAA 扩增时间的延长, 单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌检测荧光信号都在逐渐增强, 考虑到检测速度选择 20 min 作为 RAA 扩增时间。同时对 CRISPR-Cas12a 检测体系的反应缓冲液、Cas12a/crRNA 复合物浓度以及反应时间进行了优化, 考虑到单增李斯特菌的信号值较低, 所以主要针对单增李斯特菌进行优化, 结果如图 2C~2E 所示, 由图 2C 可知, 在 NEB buffer 1.1、NEB buffer 2.1、NEB buffer 3.1、NEB buffer 4、CutSmart buffer 以及 Tolo buffer for Cas12a 中, Tolo buffer for Cas12a 的荧光值和响应速度表现都最好, 所以选择 Tolo buffer for Cas12a 为反应 buffer; 图 2D 中, 随着 Cas12a/crRNA 复合物浓度的提高, 荧光信号值有所增强, 但影响不大, 最终选择 100 nmol/L 条件; 图 2E 中, 随着 CRISPR-Cas12a 检测时间的延长, 检测信号在逐渐增强, 考虑到时效性, 选择 20 min 作为检测时间。因此, 最终双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测条件为: 100 nmol/L RAA-F1/R1 和 300 nmol/L RAA-F2/R2、RAA 恒温扩增 20 min、Tolo buffer for Cas12a 为反应 buffer、100 nmol/L Cas12a/crRNA 复合物、CRISPR-Cas12a 反应 20 min。

2.3　双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系灵敏度和特异性评价

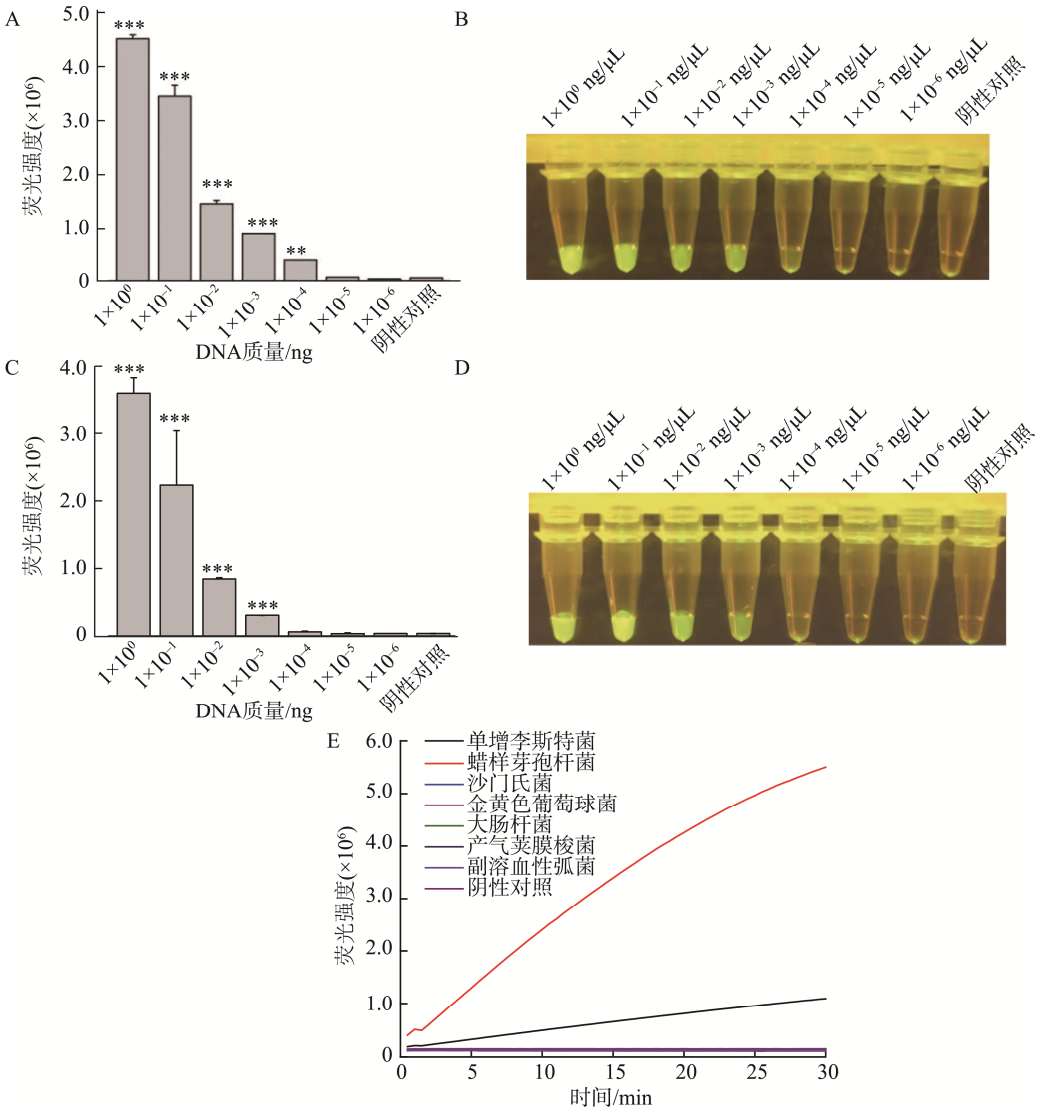
进一步评测了上述建立的双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系的灵敏度和特异性, 首先评测了反应的灵敏度, 往检测体系中分别投入 1×10^{0}、1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6} ng 蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌的基因组 DNA, 进行双重 RAA/CRISPR-Cas12a 反应, 结果如图 3A~3D 所示。往体系中分别加入最低 0.0001 ng/μL 的蜡样芽孢杆菌和 0.001 ng/μL 单增李斯特菌的基因组 DNA, 仍然能观察到检测体系荧光值的变化, 加入 0.001 ng 的基因组 DNA 能产生肉眼可见的荧光值变化, 说明检测具有较高的灵敏度。其次评测了特异性, 分别以蜡样芽孢杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌、产气荚膜梭菌以及副溶血性弧菌基因组 DNA 为检测靶标, 进行 RAA/CRISPR-Cas12a 反应, 结果如图 3E 所示, 只有当检测模板为蜡样芽孢杆菌或单增李斯特菌时体系才能产生荧光信号, 说明所建立的体系特异性良好。



注: A. RAA 扩增引物浓度优化; B. RAA 扩增时间优化(双重 RAA 扩增 10、20、30 min 后用 CRISPR-Cas12a 检测); C. CRISPR-Cas12a 反应 buffer 筛选; D. Cas12a/crRNA 复合物浓度筛选; E. CRISPR-Cas12a 检测时间筛选。

图 2　双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系的优化

Fig.2　Optimization of the dual RAA/CRISPR-Cas12a detection system



注: A. 蜡样芽孢杆菌灵敏度检测; B. 蜡样芽孢杆菌灵敏度蓝光照射结果; C. 单增李斯特菌灵敏度检测; D. 单增李斯特菌灵敏度蓝光照射结果; E. 特异性检测结果; ***表示差异强极显著(P<0.001); **表示差异极显著(P<0.01)。

图 3 双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系灵敏度和特异性评价

Fig.3 Evaluation of the sensitivity and specificity of the dual RAA/CRISPR-Cas12a detection system

2.4 人工污染样本的检测

蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌都能够污染肉类及肉制品，利用建立的检测体系检测了人工模拟污染的牛肉样本 30 份。结果如表 3 所示，30 份样本中双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检出阳性 5 份，阳性检出率 16.67%；同时用荧光定量 PCR 试剂盒进行复核，荧光定量 PCR 一共检出 5 份阳性，阳性检出率与双重 RAA/CRISPR-Cas12a 方法一致；重新用单重 RAA/CRISPR-Cas12a 进行单一复核，结果显示均为阳性，其中，8 号和 12 号样本同时检出蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌加标基因组 DNA，说明双重 RAA/CRISPR-Cas12a 方法阳性样本符合率为 100%。同时通过在牛肉样本中分别加入 10^8~10^5 CFU/mL 的蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌也可以检出，进一步说明本方法在实际样本检测中的可行性。

表 3 人工污染样本检出结果对比

Table 3 Comparison of detection results for artificially contaminated samples

样本	DNA 质量浓度/(ng/μL)	RAA/CRISPR-Cas12a 法	荧光定量 PCR 法	样本	DNA 质量浓度/(ng/μL)	RAA/CRISPR-Cas12a 法	荧光定量 PCR 法
S1	0.01	+	+	S16	/	−	−
S2	/	−	−	S17	/	−	−

表 3(续)

样本	DNA 质量浓度/(ng/μL)	RAA/CRISPR-Cas12a 法	荧光定量 PCR 法	样本	DNA 质量浓度/(ng/μL)	RAA/CRISPR-Cas12a 法	荧光定量 PCR 法
S3	0.05	+	+	S18	/	−	−
S4	/	−	−	S19	/	−	−
S5	/	−	−	S20	0.01	+	+
S6	/	−	−	S21	/	−	−
S7	/	−	−	S22	/	−	−
S8	0.5	+	+	S23	/	−	−
S9	/	−	−	S24	/	−	−
S10	/	−	−	S25	/	−	−
S11	/	−	−	S26	/	−	−
S12	0.1	+	+	S27	/	−	−
S13	/	−	−	S28	/	−	−
S14	/	−	−	S29	/	−	−
S15	/	−	−	S30	/	−	−

注: +为样本检出单增李斯特菌或蜡样芽孢杆菌; – 为样本未检出单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌; /为未添加细菌 DNA。

3　讨论与结论

本研究将 RAA 恒温扩增与 CRISPR-Cas12a 检测结合, 通过优化 RAA 恒温扩增时间以及引物浓度, 建立了蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌双重 RAA 恒温扩增体系, 进一步通过优化 CRISPR-Cas12a 检测时间、Cas12a/crRNA 复合物浓度、以及筛选反应 buffer, 建立了双重 RAA/CRISPR-Cas12a 检测体系, 可在 40 min 内检出低至 0.0001 ng 蜡样芽孢杆菌和 0.001 ng 单增李斯特菌的加标基因组 DNA, 同时具有良好的特异性。30 份人工模拟样本实验表明, 本研究建立的方法与荧光定量 PCR 检出结果一致。本研究建立的方法不需要特殊的检测仪器, 适合于现场的快速检测。但是本研究也存在一定的局限性, 不能在一管检测中区分开单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌, 目前已有研究通过温度调节实现一管双重检测[24], 也有通过将 Cas12 蛋白与 Cas13 蛋白融合在一管内检测实现一管多重检测目的[25]。虽然在一管中实现了多重检测的目的, 但是并不是利用单一 Cas 蛋白在一管中实现多重检测的目的, 这依然是 CRISPR 检测在应用中需要解决的问题。

重组酶介导的等温扩增用于食源性致病菌检测已有不少相关报道, 如刘立兵等[26]建立了沙门氏菌的 RAA 单重检测体系, 可检测低至 0.0011 ng/μL 的沙门氏菌基因组 DNA。MU 等[27]建立了大肠杆菌的 RAA 荧光检测法, 可在脱脂乳、生菜和湖水中检出 5.4×10^1、7.9×10^1、 5.2×10^1 CFU/mL 的大肠杆菌。但是目前研究多集中于单重检测, 突发公共卫生食物中毒事件中, 往往需要尽快确定引起中毒的原因是病毒还是细菌。CRISPR 检测系统可以融合多个靶标 crRNA 到一个检测体系, 从而同时检测多个靶标。如 LIM 等[28]将耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌、大肠杆菌以及乙肝病毒 crRNA 混合于一个检测体系, 实现一个检测体系检测多个靶标。本研究中建立了双重 RAA 扩增, 并将靶向蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌的 crRNA 混合于一管, 实现一管双重检测。鉴于 RAA 等温扩增一管实现超过三重检测具有一定的难度[29–30], 可以分多管完成扩增, 于一管内完成检测。也可以将 CRISPR 检测与其他技术相结合实现多个靶标的检测目的, 如微流控、侧向流等。

综上, 本研究利用 RAA 恒温扩增与 CRISPR-Cas12a 检测结合, 在 CRISPR 检测系统中融合了单增李斯特菌和蜡样芽孢杆菌的 crRNA, 实现了一管双重检测的目的, 具有较高的灵敏度和特异性, 同时不需要昂贵的检测仪器, 为现场开展食源性致病菌检测提供了有力的技术手段。

参考文献

[1] 李雁飞, 郭莹, 王蒋丽, 等. 学生午餐中蜡样芽孢杆菌污染状况毒力基因及耐药性分析[J]. 医学动物防制, 2023, 39(11): 1068–1071.
LI YF, GUO Y, WANG JL, *et al*. Contamination status of *Bacillus cereus* in students' lunches andanalysis on its virulence genes and drug resistance [J]. Journal of Medical Pest Control, 2023, 39(11): 1068–1071.

[2] 贾伟娟, 宋丽丽, 张玲艳, 等. 蜡样芽胞杆菌毒素的最新研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(6): 534–542.
JIA WJ, SONG LL, ZHANG LY, *et al*. Research progress of the toxins from *Bacillus cereus* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(6): 534–542.

[3] 王琼, 马红梅, 曾瑾, 等. 食源性蜡样芽孢杆菌的危害及其检测方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(5): 633–637.
WANG Q, MA HM, ZENG J, *et al*. Research progress on the hazards of foodborne *Bacillus cereus* and its detection method [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(5): 633–637.

[4] 张志刚, 林祥木, 胡涛, 等. 即食肉制品微生物污染及其控制技术研究进展[J]. 肉类研究, 2020, 34(1): 94–102.
ZHANG ZG, LIN XM, HU T, *et al*. Microbial contamination of ready-to-eat meat products and its control: A review [J]. Meat Research, 2020, 34(1): 94–102.

[5] 张阳, 张璟, 兰光, 等. 市售婴幼儿食品蜡样芽胞杆菌污染状况调查[J]. 疾病预防控制通报, 2021, 36(05): 5–7.
ZHANG Y, ZHANG J, LAN G, *et al*. Survey of contamination of *Bacillus cereus* in commercial food for infant and children [J]. Bulletin of Disease Control and Prevention, 2021, 36(5): 5–7.

[6] DIETRICH R, JESSBERGER N, EHLING-SCHULZ M, *et al*. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus* [J]. Toxins (Basel), 2021, 13(2): 98.

[7] 种婷. 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素 Cereulide 研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(10): 61–63.
CHONG T. The emetic toxin cereulide of *Bacillus cereus* research progress [J]. Modern Food, 2022, 28(10): 61–63.

[8] 王燕梅, 乔昕, 倪云龙, 等. 2015—2024 年江苏省肉与肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌污染状况分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 333–339.
WANG YM, QIAO X, NI YL, *et al*. Analysis of *Listeria monocytogenes* contamination status in meat and meat products in Jiangsu Province from 2015 to 2024 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 333–339.

[9] SHOUKAT S, ALI M, WANI H, *et al*. Food-borne listeriosis, an upcoming public health problem: A review [J]. Journal of Immunology and Immunopathology, 2017, 19(1): 1–9.

[10] FARBER JM, PETERKIN PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1991, 55: 476–511.

[11] ARCHER LD. The evolution of FDA's policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in the United States [J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 20: 64–68.

[12] 吴鹏, 孙雅和, 朱旭丽, 等. 食源性致病菌快速检测技术及其标准化应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 426–437.
WU P, SUN YH, ZHU XL, *et al*. Research progress on rapid detection technology and standardized application of foodborne pathogens [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 426–437.

[13] 全美淋, 李飞, 刘金燕, 等. 抗体技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3985–4005.
QUAN ML, LI F, LIU JY, *et al*. Research progress of antibody technology in rapid detection of foodborne pathogens [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3985–4005.

[14] 苏娜, 明亮, 何静, 等. 免疫检测技术在食源性致病菌中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(12): 343–352.
SU N, MING L, HE J, *et al*. Research progress on application of immunoassays in foodborne pathogens [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(12): 343–352

[15] HODZIC E, GLAVINIC A, WADEMAN C. A novel approach for simultaneous detection of the most common food-borne pathogens by multiplex qPCR [J]. Biomolecules and Biomedicine, 2023, 23(4): 640–648.

[16] 王珊, 高辉明, 王雁伟, 等. 4 种食源性致病菌多重 PCR 检测体系的建立及其在乳品检测中的应用[J]. 中国乳品工业, 2024, 52(1): 47–52.
WANG S, GAO HM, WANG YW, *et al*. Establishment and application of a multiplex PCR assay for detection of four foodborne pathogenic bacteria in dairy products [J]. China Dairy Industry, 2024, 52(1): 47–52.

[17] MOON YJ, LEE SY, OH SW. A review of isothermal amplification methods and food-origin inhibitors against detecting food-borne pathogens [J]. Foods, 2022, 11(3): 322.

[18] 李凡. 致病性李斯特菌全基因组数据库构建及基于 CRISPR/Cas 核酸检测新技术研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022.
LI F. Construction of pathogenic *Listeria* whole genome database and research on new CRISPR/Cas nucleic acid detection technology [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.

[19] LI PR, WANG ZX, XU ZK, *et al*. An RPA-Assisted CRISPR/Cas12a assay combining fluorescence and lateral flow strips for the rapid detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(24): 11.

[20] 陈大伟, 李兵兵, 魏明月, 等. 基于 RPA/CRISPR-Cas12a 技术的单核细胞增生李斯特菌快速检测方法建立[J]. 肉类研究, 2023, 37(9): 46–51.
CHEN DW, LI BB, WEI MY, *et al*. Development of a rapid detection method for *Listeria monocytogenes* based on recombinase polymerase amplification combined with CRISPR-Cas12a technology [J]. Meat Research, 2023, 37(9): 46–51.

[21] 傅奇, 甘美裕, 王艳, 等. 16S 与 gyrB 基因联合建树快速鉴定一株蜡样芽孢杆菌[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(10): 98–103.
FU Q, GAN MY, WANG Y, *et al*. Rapid identification of a *Bacillus cereus* strain with phylogenetic tree basedon combination of 16S and *gyrB* gene [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(10): 98–103.

[22] LE MONNIER A, ABACHIN E, BERETTI JL, *et al*. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the *hly* gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(11): 3917–3923.

[23] LÜ HL, WANG J, ZHANG J, *et al*. Definition of CRISPR Cas12a trans-cleavage units to facilitate CRISPR diagnostics [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 766464.

[24] HUANG Z, DONG Y, YANG Y, *et al*. Thermally programmed one-pot CRISPR assay for on-site pandemic surveillance [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 10286.

[25] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, KELLNER MJ, *et al*. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. Science, 2018, 360(6387): 439–444.

[26] 刘立兵, 耿云云, 姜彦芬, 等. 沙门氏菌重组酶聚合酶检测方法的建立及应用[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 298–303.
LIU LB, GENG YY, JIANG YF, *et al*. Development and application of a recombinase polymerase amplification assay for detection of *Salmonella* [J]. Food Science, 2019, 40(2): 298–303.

[27] MU D, ZHOU DG, XIE GY, *et al*. The fluorescent probe-based recombinase-aided amplification for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Molecular and Cellular Probes, 2021, 60: 101777.

[28] LIM J, VAN AB, KOPROWSKI K, *et al*. Amplification-free, or-gated crispr-cascade reaction for pathogen detection in blood samples [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2025, 122(11): e2420166122.

[29] MA B, LI J, CHEN K, *et al*. Multiplex recombinase polymerase amplification assay for the simultaneous detection of three foodborne pathogens in seafood [J]. Foods, 2020, 9(3): 278.

[30] FENG M, Ma J, ZHANG Y, *et al*. Rapid detection assays for *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, and *Brucella* spp. via triplex-recombinase polymerase amplification [J]. Molecular biology reports, 2025, 52(1), 149.

(责任编辑: 曹岱琳 蔡世佳)