

# 基于 CRISPR/Cas13a-HCR 的副溶血性弧菌荧光检测方法构建及应用

黄梦琴<sup>1</sup>, 辛煜<sup>1</sup>, 符丹凤<sup>2</sup>, 刘子扬<sup>1</sup>, 彭道云<sup>3</sup>, 曾姝<sup>4\*</sup>, 万逸<sup>4\*</sup>, 崔倩<sup>5</sup>, 陈菲<sup>6</sup>

1 海南大学 海洋生物与水产学院, 海南 海口

2 海南省水产品质量安全检测中心(海南省水产技术推广站), 海南 海口

3 海南大学 生物医学工程学院, 海南 海口

4 海南大学 海洋科学学院(南海海洋资源利用国家重点实验室), 海南 海口

5 海南大学 生命健康学院, 海南 海口

6 海南大学 食品科学与工程学院, 海南 海口

黄梦琴, 辛煜, 符丹凤, 刘子扬, 彭道云, 曾姝, 万逸, 崔倩, 陈菲. 基于 CRISPR/Cas13a-HCR 的副溶血性弧菌荧光检测方法构建及应用[J]. 微生物学报, 2026, 66(4): 2007-2021.

HUANG Mengqin, XIN Yu, FU Danfeng, LIU Ziyang, PENG Daoyun, ZENG Shu, WAN Yi, CUI Qian, CHEN Fei. Development and application of a fluorescence method for *Vibrio parahaemolyticus* detection based on CRISPR/Cas13a and hybridization chain reaction[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(4): 2007-2021.

**摘要:** 【目的】将 CRISPR 系统与杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)结合, 构建一种用于副溶血性弧菌快速检测的荧光方法, 以实现病原菌的快速、灵敏、准确检测。【方法】筛选副溶血性弧菌特异性保守序列, 设计级联探针(RP/I)及 HCR 发夹结构, 优化反应体系及实验条件, 评估该方法的可行性、灵敏度和特异性, 并利用副溶血性弧菌污染的水产品验证其抗干扰能力。【结果】仅当靶标存在时, CRISPR/Cas13a 才能被激活, 反式切割 RP/I 级联探针, 释放出 I 链并引发 HCR 反应, 产生明显的荧光增强信号。该方法具有良好的检测特异性, 可区分单碱基错配、双碱基错配和三碱基错配, 并能针对不同菌株有效区分副溶血性弧菌与非靶标菌(如溶藻弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌、霍乱弧菌和大肠杆菌)。基于纯靶标 RNA 的检测灵敏度为 1.01 pmol/L, 在 25 pmol/L-10 nmol/L 具有良好的线性关系, 其回归方程为  $y=7\ 236.75\times\lg C_{T-RNA}-8\ 590.11$ ,  $R^2=0.99$ 。本研究可快速检测多种水产品中副溶血性弧菌提取的 RNA, 检测结果与实时荧光定量逆转录 PCR (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR) 一致。【结论】本研究建立的

资助项目: 国家自然科学基金(22204036); 海南省科技专项资助(ZDYF2025XDNY066)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22204036) and the Hainan Provincial Science and Technology Special Fund (ZDYF2025XDNY066).

\*Corresponding authors. E-mail: ZENG Shu, zengshu@hainanu.edu.cn; WAN Yi, 993602@hainanu.edu.cn

Received: 2026-01-19; Accepted: 2026-03-05; Published online: 2026-03-11

CRISPR/Cas13a-HCR 荧光检测方法可快速、准确地检测副溶血性弧菌，且具有良好的灵敏度、特异性和准确性。

关键词：副溶血性弧菌；CRISPR/Cas13a；杂交链式反应；荧光检测

## Development and application of a fluorescence method for *Vibrio parahaemolyticus* detection based on CRISPR/Cas13a and hybridization chain reaction

HUANG Mengqin<sup>1</sup>, XIN Yu<sup>1</sup>, FU Danfeng<sup>2</sup>, LIU Ziyang<sup>1</sup>, PENG Daoyun<sup>3</sup>, ZENG Shu<sup>4\*</sup>, WAN Yi<sup>4\*</sup>, CUI Qian<sup>5</sup>, CHEN Fei<sup>6</sup>

1 School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou, Hainan, China

2 Hainan Provincial Aquatic Product Quality and Safety Inspection Center (Hainan Provincial Fisheries Technology Extension Station), Haikou, Hainan, China

3 School of Biomedical Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan, China

4 School of Marine Sciences (State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea), Hainan University, Haikou, Hainan, China

5 School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan, China

6 School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan, China

**Abstract: [Objective]** To develop a fluorescence method for *Vibrio parahaemolyticus* detection by the combination of CRISPR system and the hybridization chain reaction (HCR), thus achieving rapid, sensitive, and accurate detection of the pathogen. **[Methods]** Cascade probe (RP/I) and HCR hairpin structures were first designed according to a specific conserved sequences screened from *V. parahaemolyticus*. Subsequently, the feasibility, specificity, and sensitivity of the method were evaluated after the optimization of reaction conditions. Furthermore, *V. parahaemolyticus*-contaminated aquatic products were used to validate the interference resistance of the method. **[Results]** The cleavage of CRISPR/Cas13a was activated upon binding to the target RNA (T-RNA), leading to the *trans*-cleavage of the RP/I cascade probe and the release of I strand. Then, the released I strand subsequently triggered HCR, generating a significant fluorescence signal for target detection. The established method successfully distinguished target sequences with single-base, double-base, and triple-base mismatches and enabled the specific identification of *V. parahaemolyticus* against other non-target bacteria, including *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. cholerae*, and *Escherichia coli*, demonstrating excellent specificity. The assay showed a good linear correlation over a T-RNA concentration range of 25 pmol/L to 10 nmol/L. The corresponding linear regression equation was  $y=7\ 236.75\times\lg C_{T-RNA}-8\ 590.11$  ( $R^2=0.99$ ,  $C$  represents the T-RNA concentration and  $y$  represents the fluorescence intensity), with the LOD of 1.01 pmol/L. The proposed method enabled rapid detection of RNA extracted from *V. parahaemolyticus* in various aquatic products, yielding results consistent with those obtained by

RT-qPCR. **[Conclusion]** The fluorescence method based on CRISPR/Cas13a-HCR established in this study realizes rapid detection of *V. parahaemolyticus*, demonstrating good sensitivity, specificity, and accuracy.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*; CRISPR/Cas13a; hybridization chain reaction; fluorescence detection

食源性疾病是全球范围内一项重大的公共卫生挑战。细菌性病原体引发的感染在疾病负担中占据重要地位,是导致腹泻、败血症等严重临床后果的主要因素之一<sup>[1]</sup>。副溶血性弧菌属于弧菌科、弧菌属,是一种革兰氏阴性菌,同时也是引发生物性食源性疾病的最主要致病菌之一,作为全球沿海水域最为普遍的细菌性病原体,它对人类健康和渔业构成极大威胁<sup>[2-3]</sup>。其致病因子包括热不稳定溶血素(thermolabile hemolysin, Tlh)基因、热稳定直接溶血素(thermostable direct hemolysin, Tdh)以及与 Tdh 相关溶血素(tdh-related hemolysin, Trh)基因的产物,还有与  $\beta$  溶血相关的因子等,这些因子会直接或间接引发人体伤口感染、原发性败血症和胃肠炎<sup>[4]</sup>。因此,亟需开发灵敏、高效的副溶血性弧菌检测技术。

近年来,CRISPR/Cas 系统因能特异性识别并切割核酸靶标,已成为基因编辑和微生物诊断领域的研究热点。CRISPR/Cas 系统由簇状规则间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated proteins, Cas)构成<sup>[5-6]</sup>。其中,CRISPR/Cas13a(前称 C2c2)是一种 RNA 靶向的核酸酶,其 crRNA 由直接重复序列和间隔序列组成,间隔区序列可通过编程与靶标互补,识别靶标 RNA 后,激活的 Cas13a 可非特异性切割周围的单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA) (也称为旁支切割),从而提供特定的 RNA 检测平台<sup>[7-10]</sup>。杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR)是一种无酶的核酸聚合反应,作为一种无酶、等温、可编程的核酸自组装放大技术,仅需简单的温控设备

即可完成反应。该技术无需辅助酶参与,可大大降低实验成本,利用 HCR 的信号转导和无酶扩增能力能够实现靶分子的信号放大<sup>[11-12]</sup>。

本研究以副溶血性弧菌特异性 *toxR* 基因为靶点,结合 CRISPR/Cas13a 系统和 HCR 技术进行级联信号转导放大,以期构建副溶血性弧菌检测新平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

本课题组共购买 6 株实验菌株,分别为副溶血性弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌、霍乱弧菌以及大肠杆菌,菌株信息如表 1 所示。

### 1.2 靶标 RNA、crRNA、级联探针和发夹探针的设计

从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取 *toxR* 基因序列,使用 MEGA-X 软件将副溶血性弧菌与其他弧菌进行序列比对,选取相对保守的区域作为检测靶区,使用 NCBI BLAST 验证靶标 RNA

表1 菌株信息

Table 1 Strain information

Strain name	Strain collection number
副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 33787
创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	ATCC BAA-1117
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	CICC 23794
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	CICC 10899

(target RNA, T-RNA)的特异性。crRNA 序列由直接重复区和间隔区组成, 设计间隔区序列与 T-RNA 序列互补。T-RNA、crRNA、RP、I、H1.1、H1 和 H2 链由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 核酸序列见表 2。

### 1.3 RP/I 探针制备

为形成 RNA 与 DNA 的杂交体 RP/I 级联探针, 将终浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  的 I 链(DNA)和 2.8  $\mu\text{mol/L}$  的 RP 链(RNA)、1 $\times$ Annealing buffer 用无酶水配至所需体积, 混匀后于 95  $^{\circ}\text{C}$  退火 5 min, 随后缓慢降温至 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h, 最后置于 8  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4 Cas13a 切割反应

Cas13a 切割反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): T-RNA 3  $\mu\text{L}$ , Cas13a (400 nmol/L) 3  $\mu\text{L}$ , crRNA (200 nmol/L) 3  $\mu\text{L}$ , RP/I 探针(2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ Cas13a 反应缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , DEPC 水 4  $\mu\text{L}$ 。在 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后用于后续实验。

### 1.5 HCR 反应及荧光测定

HCR 反应体系(30  $\mu\text{L}$ ): 在 1.4 节反应体系中加入 10  $\mu\text{L}$  H1 和 H2 反应液, 使 H1 和 H2 终浓度均为 400 nmol/L (即 4  $\mu\text{mol/L}$ ), 加入 1 $\times$ HCR 反应缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 300 mmol/L NaCl, pH 7.60)。将反应体系于 37  $^{\circ}\text{C}$  下反应 2 h, 使用酶标仪(BioTek 公司)记

录荧光。H1、H2 在反应前进行预处理: 95  $^{\circ}\text{C}$  退火 5 min, 立即于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

使用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (native polyacrylamide gel electrophoresis, Native-PAGE) 验证 RP/I 探针、Cas13a 切割产物及 HCR 扩增产物。电压设置为 110 V, 缓冲液为 1 $\times$ TBE。电泳结束后, 小心取出凝胶, 置于 1 $\times$ Super Red 染色液中避光染色 10 min, 然后使用凝胶成像系统在紫外下进行成像、拍照并记录数据结果。

### 1.7 RNA 提取

将 50  $\mu\text{L}$  甘油保存的副溶血性弧菌接种至 5 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水(3% NaCl alkaline peptone water, 3% NaCl APW); 将 50  $\mu\text{L}$  甘油 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存的溶藻弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌、霍乱弧菌和大肠杆菌分别加入 1% 氯化钠碱性蛋白胨水(1% NaCl alkaline peptone water, 1% NaCl APW)中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 12 h, 分别取 3 mL 用于 RNA 提取, 使用细菌 RNA 提取试剂盒(Omega 公司)按说明书操作提取 RNA, 使用 NanoDrop 超微量紫外分光光度计(ThermoFisher Scientific 公司)测定 RNA 浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 提取产物质量, 提取的 RNA 置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。

表2 本研究所用核酸序列

Table 2 Nucleotide sequence used in this study

Nucleotide name	Nucleotide sequences (5'→3')
T-RNA	UGAACCCAGAAGCGCCAGUAGUACCUGAA
crRNA	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACUUCAGGUACUACUGGCGCUUCUGGUUCA
RP	UUAACCCACGCUUUUUUCAUCCUAGACU
I	AGTCTAGGATGTCGCGTGGGTAA
H1.1	TTAACCCACGCGACATCCTAGACTCAAAGTAGTCTAGGATGTCGCGTG
H1	TTAACCCACGCGACA/i6FAMdT/CCTAGACTCAAAGTAGTCTAGGA/iBHQ1dT/GTCGCGTG
H2	AGTCTAGGATGTCGCGTGGGTAAACACGCGACATCCTAGACTACTTTG
RT-qPCR F1	GTCTTTAGCGACGACTTC
RT-qPCR R1	GTAAACAGCAGTACGCAA

The underlined sequence of the crRNA is complementary to the target RNA (T-RNA) sequence.

## 1.8 副溶血性弧菌添加样本制备

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)、珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀×*Epinephelus lanceolatus* ♂)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*), 购自海南本地生鲜超市。解剖分离对虾的肝胰腺组织、石斑鱼的肠组织、牡蛎的内脏团组织, 分别称取 2.5 g 组织研磨后置于 50 mL 无菌离心管中, 加入 22.5 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 (3% NaCl alkaline peptone water, 3% NaCl APW), 均质处理 2 min。将 121 °C 灭菌 15 min 灭菌后的组织样本进行分组处理, 阳性组中加入 2.5 mL  $10^8$  CFU/mL 的副溶血性弧菌菌液, 使终浓度达到  $10^7$  CFU/mL, 而阴性组中加入 2.5 mL 灭菌的 0.9% 生理盐水。将制备的阳性组和阴性组组织样本旋涡振荡混匀后, 取 3 mL 进行组织样本 RNA 提取, 提取的 RNA 置于 -80 °C 保存。

## 1.9 统计分析

实验独立重复 3 次 ( $n=3$ ), 数据以平均值±标准差 (SD) 表示。采用 Origin 2021、GraphPad Prism 9.5 软件进行数据分析, 单因素多组间比较采用单因素 ANOVA 方差分析 (one-way ANOVA), 多重比较采用 Dunnett's 多重比较方法。  $P<0.05$

认为差异具有统计学意义 (ns 表示  $P>0.05$ ; \*\*\*\* 表示  $P<0.0001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测原理

通过序列比对, 选择副溶血弧菌特异性保守序列 T-RNA (28 nt) 作为靶标序列, 结合 Cas13a 设计 crRNA。在有靶标存在的情况下, T-RNA 与 crRNA 结合, 激活 Cas13a 活性, 反式切割 RP1/I 级联探针上的 U 碱基, 从而释放 I 链, 引发 HCR 反应。该反应依次循环打开 H1 和 H2 的发夹结构, 形成带有缺口的长链双链 HCR 产物。H1 上标记的 FAM 基团在发夹结构关闭时, 因与 BHQ1 基团邻近而被淬灭; 打开后, 随着 BHQ1 基团的远离, FAM 的荧光会再次恢复。随着 HCR 反应的进行, 打开的 H1 越多, FAM 基团累计恢复的荧光信号越强, 从而实现靶标菌的荧光检测, 检测原理示意图见图 1。

### 2.2 可行性分析

通过 12% Native-PAGE 验证 Cas13a 切割反应体系中靶标 T-RNA 能否结合 crRNA, 激活

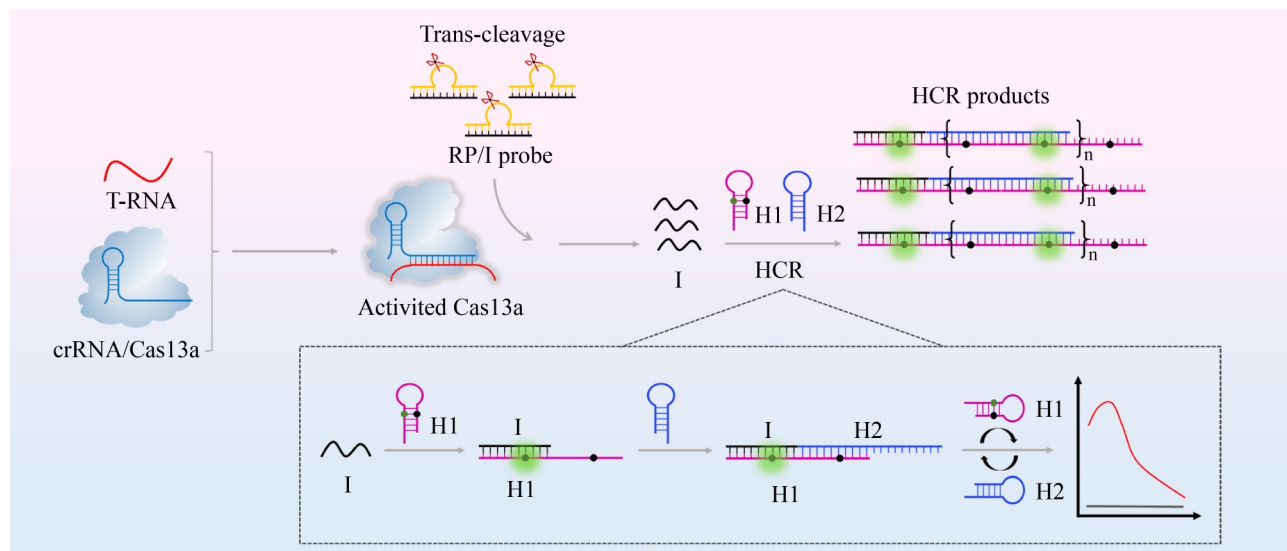


图1 CRISPR/Cas13a-HCR传感器检测原理

Figure 1 The detection principle of the CRISPR/Cas13a-HCR sensor.

Cas13a 切割 RP/I 探针。如图 2A 所示, 泳道 3 和泳道 4 分别为 RP 单链和 I 单链, 泳道 5 为 RP 和 I 链的退火产物, 其电泳速度明显慢于泳道 3 和 4, 说明形成了 RP/I 探针。加入 T-RNA、crRNA 和 Cas13a 蛋白后泳道 6 中 RP/I 探针条带消失, 并出现了一条属于 I 链的条带; 与泳道 6 对比, 泳道 7 中 RP/I 探针条带未消失, 这说明虽然添加了 crRNA 和 Cas13a 蛋白, 但无 T-RNA 时 Cas13a 的反式切割活性未能激活, 无法切割 RP/I 探针上的 U 碱基。这些数据表明, T-RNA 可结合 crRNA 激活 Cas13a 活性, 反式切割 RP/I 探针从而释放 I 链。

本研究通过 12% Native-PAGE 验证单独 I 链能否引发 HCR 反应, 结果如图 2B 所示。泳道 1、2、4 分别为单独的发夹 H1.1、发夹 H2 及引发链 I, 均仅呈现单一的条带, 对应各自的分子量大小。泳道 3 为 H1.1 与 H2 的混合物, 也仅观察到单一条带, 且迁移速率与单独的 H1.1 和 H2 基本一致, 表明在无引发链存在的情况下, H1.1 与 H2 之间不会发生非特异性组装或自发开环反应, 背景信号较低。泳道 5 为 H1.1、H2 与 I 链的混合物, 结果显示出现多条分子量大小不一的高分子量新条带。这是由于 I 链首先与发夹 H1.1 的部分互补序列结合, 打开 H1.1 的发夹结构, 暴露其黏性末端; 该黏性末端进而与发夹 H2 的部分区域互补, 打开 H2 的发夹结构; H2 暴露的黏性末端又可继续与下一个游离的 H1.1 发夹结合, 如此交替循环, 形成具有重复单元的长链双链 DNA 产物, 即 HCR 扩增产物。上述结果表明, 单独 I 链可有效触发 HCR 级联反应, 产生多条高分子量的长链双链 DNA 产物。

接下来进一步验证切割释放的 I 链能否引发后续级联的 HCR 反应。如图 2C 所示, 泳道 1 和泳道 2 分别为 H1.1 单链和 H2 单链, 泳道 7 为 H1.1 和 H2 的混合物, 仅有一条对应 H1.1 和 H2 混合物的条带, 说明 H1.1 和 H2 在无引发剂时相对稳定, 不会自发组装产生背景条带; 即

使添加了 RP/I 探针(泳道 8), 也基本未产生杂带。添加 T-RNA 和对应的 crRNA 及蛋白后(泳道 9), 泳道口以及附近出现分子量大小不一的产物带, 表明切割释放的 I 链引发了后续 HCR 级联反应。图 2D 荧光光谱数据进一步证实了这一点, 仅有 T-RNA 存在时, 体系在 518 nm 处的荧光显著高于无 T-RNA 组以及其他对照组, 且其在 518 nm 处的荧光值是无 T-RNA 对照组的 58.76 倍。这些结果说明本方法具有用于副溶血弧菌检测的潜力。

### 2.3 条件优化

为了实现更好的性能, 对 CRISPR/Cas13a-HCR 的实验条件进行了优化。首先优化了关键组分 RP/I 探针中 RP 与 I 的杂交比例。RP 与 I 杂交比例分别为 1.0:1、1.2:1、1.4:1、1.6:1, 随着杂交比例的增加, 518 nm 处 T-RNA 组与对照组的荧光比值先升高后降低, 其对照组背景信号的荧光值逐渐降低, 在 1.2:1 时, 518 nm 处 T-RNA 组与对照组的荧光比值达到最大, 因此选择 RP 与 I 最佳杂交比例为 1.2:1 (图 3A)。随后优化了 RP/I 探针在切割体系中的反应浓度, 随着探针浓度从 225 nmol/L 增至 450 nmol/L, 518 nm 处 T-RNA 组与对照组的荧光值比值先增加后下降, 在 375 nmol/L 时达到最大(图 3B), 因此选择该浓度用于后续实验。

接着, 优化了 Cas13a 的反应浓度, 将 Cas13a 浓度从 45.0 nmol/L 增至 75.0 nmol/L, T-RNA 组与对照组的荧光值比值先增加后下降最后稳定(图 3C), 最后选择 60.0 nmol/L 作为 Cas13a 的最佳反应浓度。随着 crRNA 浓度在 15.0–45.0 nmol/L 范围内增加, T-RNA 组与对照组的荧光比值先增加, 后在 30.0 nmol/L 时达到稳定状态(图 3D), 因此选择 30.0 nmol/L 作为 crRNA 的最佳反应浓度。随后对 Cas13a 反应时间和 HCR 反应时间进行了优化。随着 Cas13a 反应时间延长, 荧光比值增加后在 40 min 处稳定

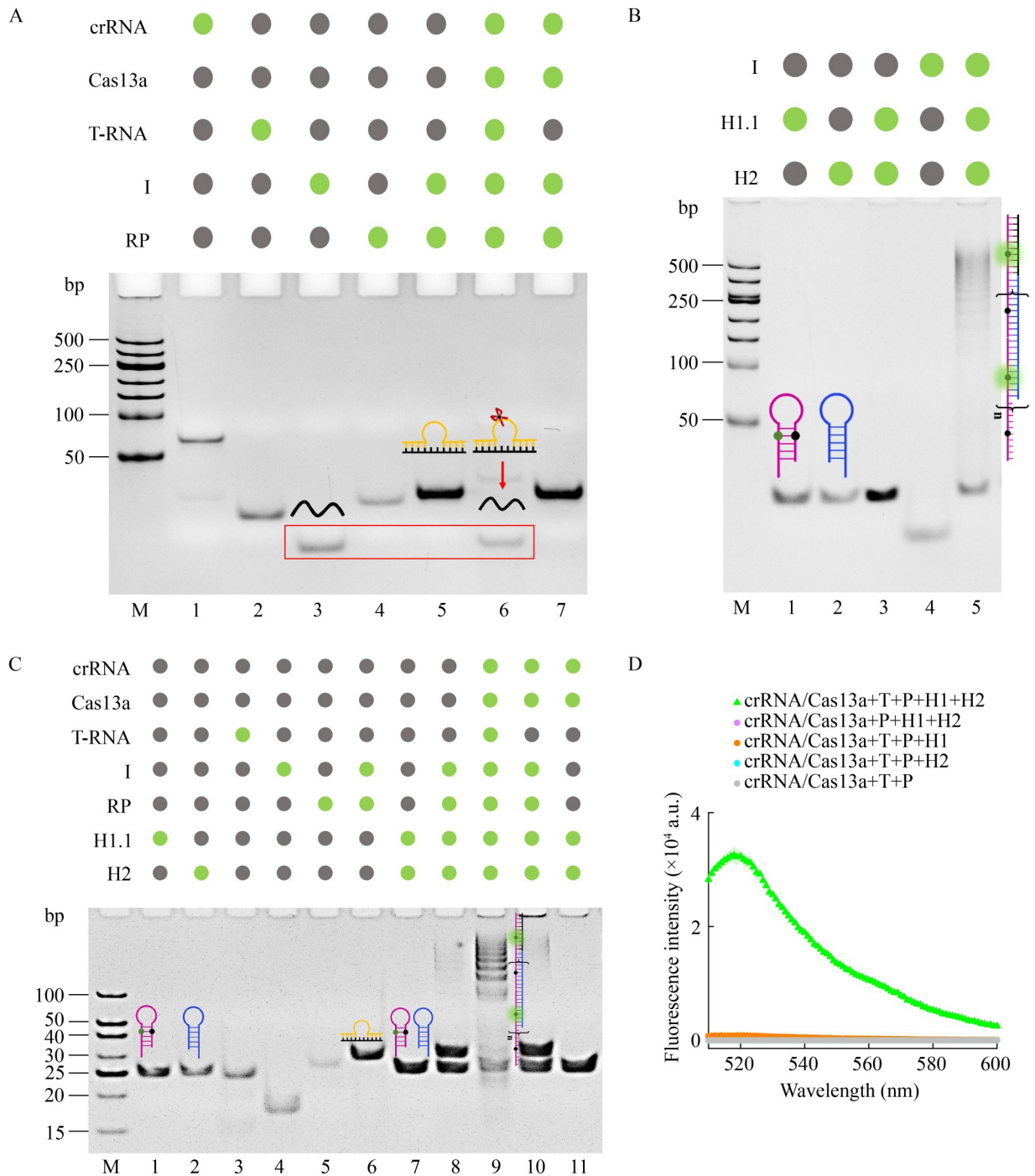
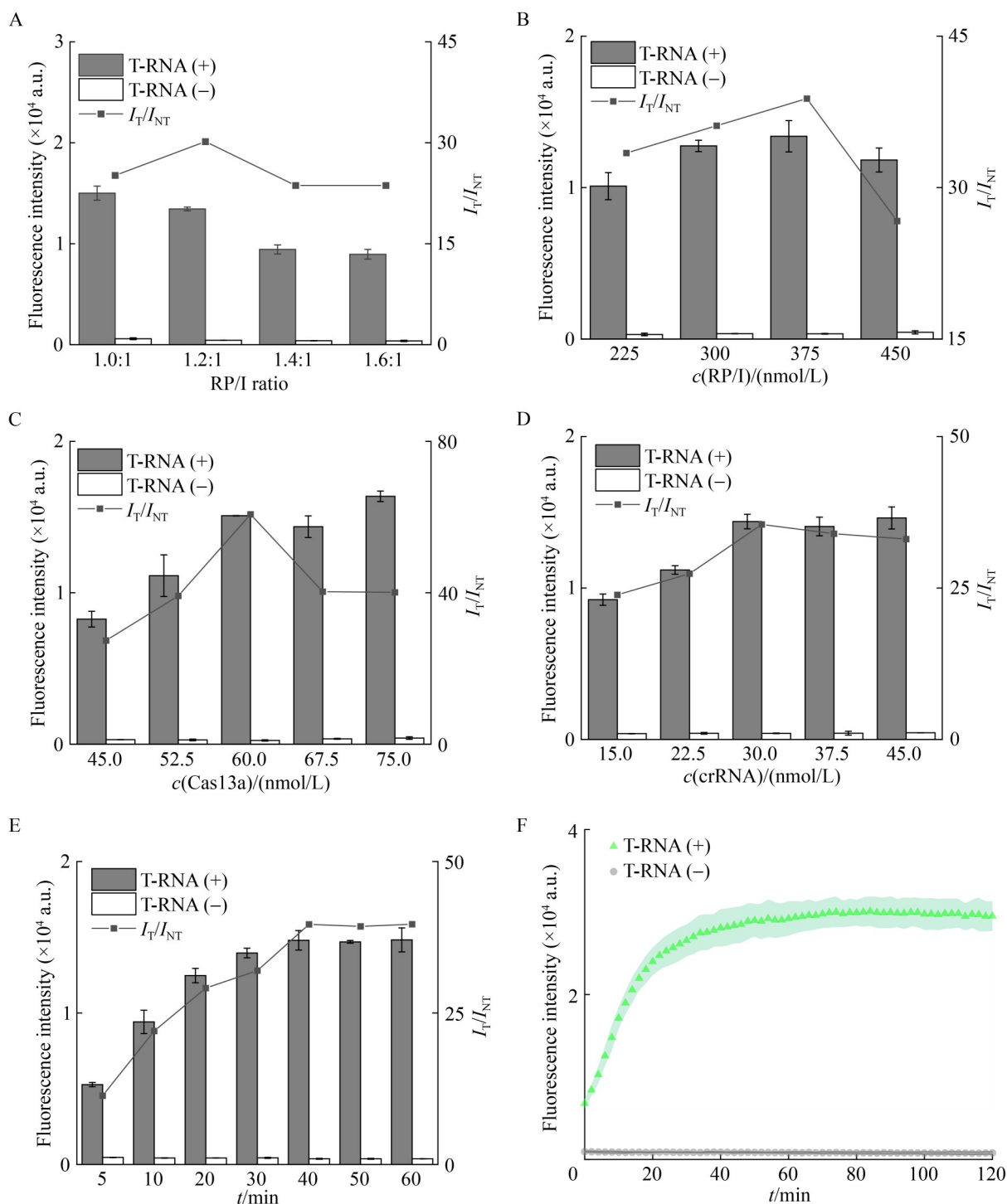


图2 CRISPR/Cas13a-HCR检测T-RNA可行性分析

Figure 2 The feasibility of CRISPR/Cas13a-HCR assay for the detection of T-RNA. A: Feasibility characterization of the Cas13a cleavage reaction using 12% Native-PAGE; B: Feasibility assessment of HCR reaction initiated by isolated I-chain using 12% Native-PAGE; C: Characterization of the CRISPR/Cas13a-HCR-based reaction using 12% Native-PAGE; D: Fluorescence emission spectra of the CRISPR/Cas13a-HCR-based reaction.



**图3 CRISPR/Cas13a-HCR的条件优化**

Figure 3 Optimization of experimental conditions for the CRISPR/Cas13a-HCR assay. A: RP/I ratio; B: RP/I concentration; C: Cas13a concentration; D: crRNA concentration; E: Incubation time for CRISPR/Cas13a assay; F: Incubation time for HCR assay. The concentration of T-RNA was 50 nmol/L.

(图 3E)。对 HCR 反应时间进行 2 h 的荧光动力学检测, 其荧光信号随时间逐渐增强, 并在 40 min 时达到稳定(图 3F)。因此, Cas13a 反应时间和 HCR 反应最佳反应时间均为 40 min。

## 2.4 灵敏度

在上述最佳条件下, 基于 CRISPR/Cas13a 和 HCR 级联策略对不同浓度的 T-RNA 进行灵敏度评估。如图 4A 所示, 在 0–10 nmol/L 浓度范围内, 随着靶标浓度升高, 荧光信号逐渐增强。然而, 在靶标浓度范围为 25 pmol/L–10 nmol/L 时, 荧光强度与 T-RNA 浓度的对数呈线性相关如图 4B 所示。其线性关系为  $y=7\ 236.75 \times \lg C_{\text{T-RNA}} - 8\ 590.11$ ,  $R^2=0.99$ , 基于  $3\sigma/k$  准则计算出检测限 (limit of detection, LOD) 为 1.01 pmol/L, 其中  $\sigma$  为 7 个空白样本的标准偏差,  $k$  为标准曲线的斜率, 表明 CRISPR/Cas13a-HCR 具有良好的检测灵敏度。

## 2.5 特异性

为验证 CRISPR/Cas13a-HCR 策略检测的特异性, 根据 T-RNA 分别设计了单碱基(M1)、双碱基(M2)和三碱基(M3)错配链, 错配位置见图 5A。结果如图 5B、5C 所示, 添加 1 nmol/L

T-RNA 后, 荧光信号显著增强(\*\*\*\*:  $P<0.000\ 1$ ), 而单碱基、双碱基和三碱基错配链未引起显著的荧光变化(ns:  $P>0.05$ ), 表明 Cas13a-HCR 具有单碱基识别能力。另外, 如图 5D 所示, 针对 5 种弧菌属弧菌(副溶血性弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌和霍乱弧菌)以及大肠杆菌提取总 RNA, 以进一步评估该策略的特异性检测能力, 荧光结果如图 5E、5F 所示, 仅副溶血性弧菌组荧光信号显著增强(\*\*\*\*:  $P<0.000\ 1$ ), 其他 5 组荧光无显著增强(ns:  $P>0.05$ ), 说明 CRISPR/Cas13a-HCR 能区分副溶血性弧菌及近缘弧菌或其他细菌, 进一步证明该检测方法的特异性良好。

## 2.6 实际样本

为评估 CRISPR/Cas13a-HCR 方法在复杂样本中的检测能力, 对 27 份组织样本(南美白对虾的肝胰腺组织、珍珠龙胆石斑鱼的肠组织以及太平洋牡蛎的内脏团组织)进行检测。复杂样本处理过程示意图见图 6A。CRISPR/Cas13a-HCR 检测结果如图 6B 所示, 阳性样本组的荧光信号强度显著高于阴性样本组的荧光信号强度, 表明 CRISPR/Cas13a-HCR 方法可显著区分所有阳性样本与阴性样本。RT-qPCR 复杂样本分析结

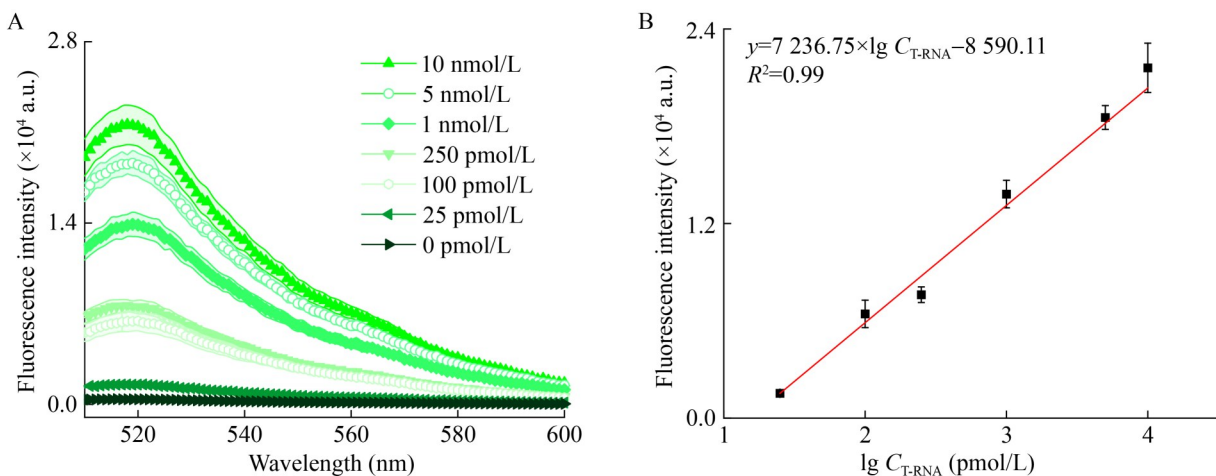


图4 CRISPR/Cas13a-HCR的灵敏度分析

Figure 4 Performance of CRISPR/Cas13a-HCR assay for T-RNA detection. A: Fluorescence emission spectra of different T-RNA concentrations from 0 to 10 nmol/L; B: Linear analysis for T-RNA detection.

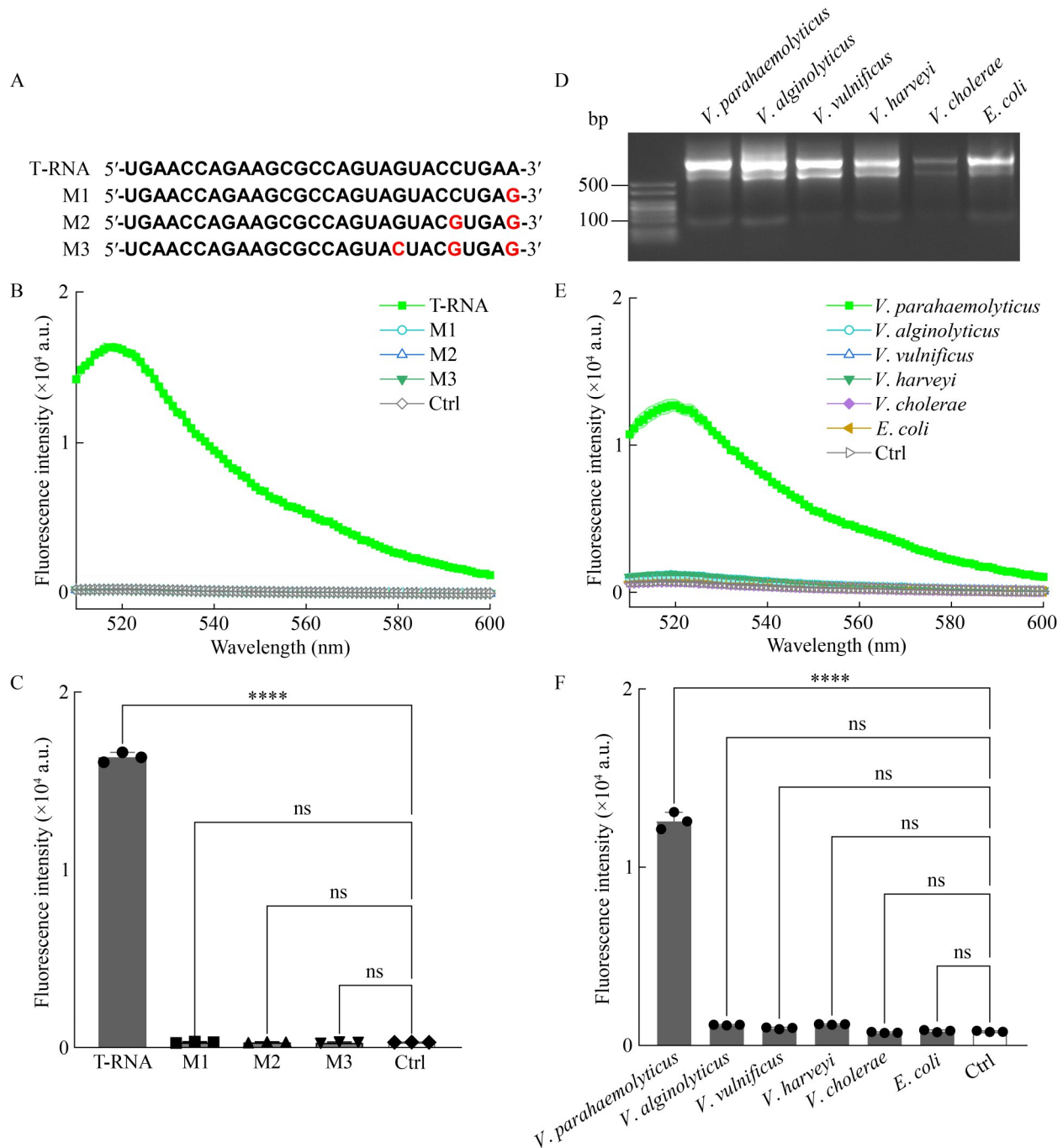


图5 CRISPR/Cas13a-HCR实验的特异性分析

Figure 5 Specificity analysis of the CRISPR/Cas13a-HCR assay. A: T-RNA and its mismatched base sequences; B: Fluorescence emission spectra of the mismatched sequences; C: Significance analysis of the mismatched sequences; D: Total RNA from target and non-target bacteria; E: Fluorescence emission spectra of the total bacterial RNA; F: Significance analysis of the total bacterial RNA. \*\*\*\* indicates a significant difference compared to the control group ( $P < 0.0001$ ); ns indicates no statistical difference ( $P > 0.05$ ); All data are from three independent experiments ( $n=3$ ).

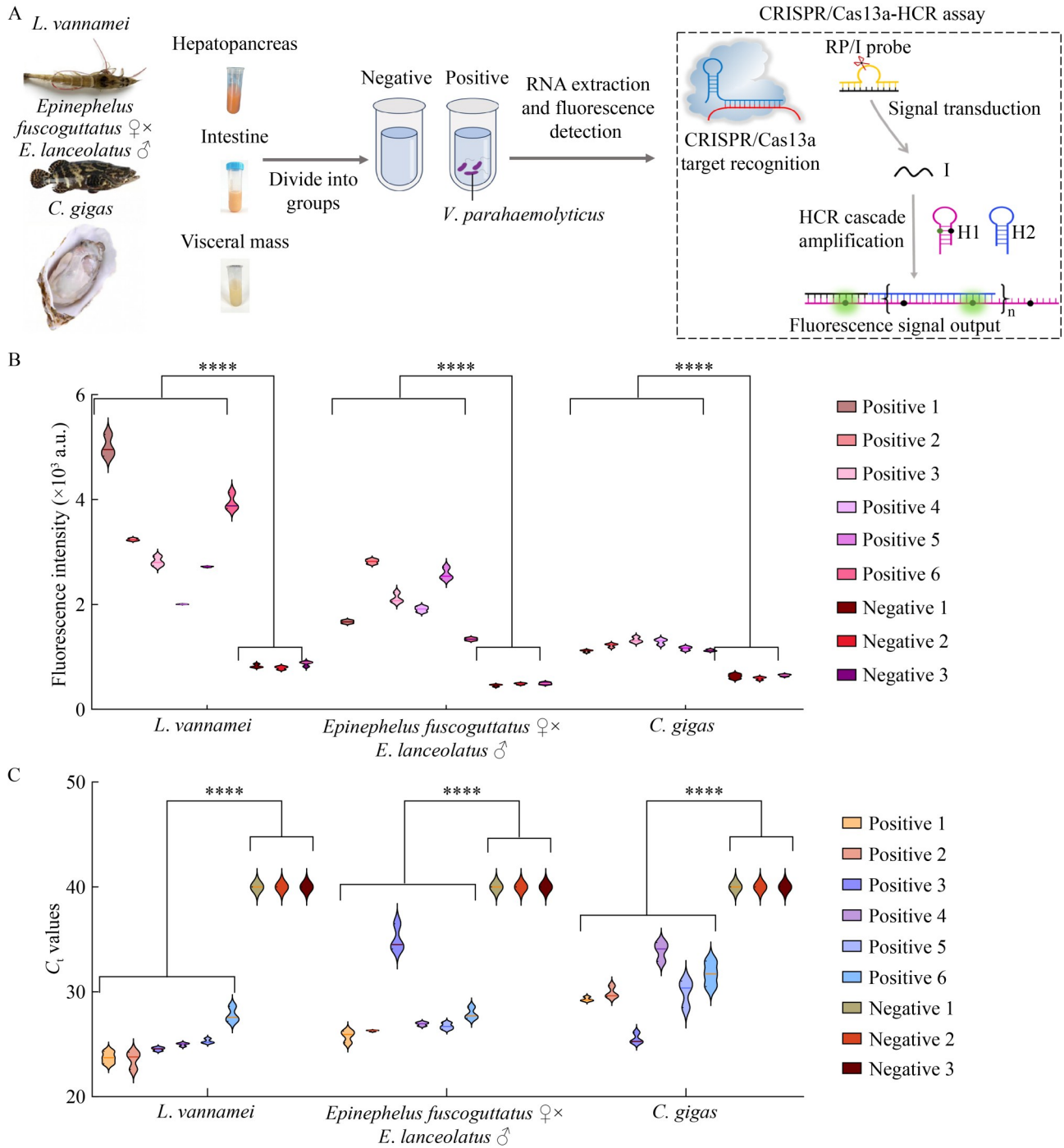


图6 复杂样本分析

Figure 6 Analysis of complex samples. A: Schematic diagram of the sample processing procedure for complex samples; B: Significance analysis based on the CRISPR/Cas13a-HCR strategy; C: Significance analysis based on the RT-qPCR strategy ( $C_t$  values for RT-qPCR-negative groups were undetectable and were set to 40). \*\*\*\* indicates a significant difference compared to the negative group ( $P < 0.0001$ ); All data are from three independent experiments ( $n = 3$ ).

果如图 6C 所示, 所有阳性样本组产生的  $C_t$  值均显著低于 40, 而所有阴性样本组均无  $C_t$  值(阴性样本组  $C_t$  值设为 RT-qPCR 程序循环次数 40), CRISPR/Cas13a-HCR 与 RT-qPCR 检测结果一致。上述结果表明 CRISPR/Cas13a-HCR 对复杂样本的检测具有良好的准确率。

### 3 讨论与结论

据联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)发布的《2024 年世界渔业和水产养殖状况》报告显示, 2022 年全球渔业和水产养殖总产量为 2.232 亿 t, 其中水生动物产量为 1.854 亿 t, 藻类产量为 3 780 万 t, 全球水产养殖产量为 1.309 亿 t, 全球渔业水产养殖动物类产量首次超过捕捞渔业动物类产量, 其中中国的水生动物产量占全球总量的 36%, 目前中国已成为全球最大的水产养殖生产国<sup>[13]</sup>。然而, 随着集约化养殖的发展, 养殖水域环境恶化, 不同季节、不同养殖水域的水产病害频发, 水产病害问题已成为制约我国渔业发展的重要因素, 弧菌病原中副溶血性弧菌是影响虾蟹类细菌性疾病的主要病原, 如对虾的急性肝胰腺坏死病、幼体弧菌病以及红腿病<sup>[14-17]</sup>。开发灵敏、高效的病原检测技术对我国渔业的可持续发展具有重要的现实意义。

目前, 基于 RNA 的病原检测技术一般需要逆转录过程, 如实时荧光定量逆转录 PCR (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR), 首先需要设计多对引物并验证其特异性, 以避免假阳性结果。其次, 检测环境需洁净, 否则靶标 RNA 降解可能导致模板不完整, 从而产生假阴性结果; 或阴性样本污染可能引发假阳性结果, 这 2 种结果在预实验中均出现过。另外, PCR 需要复杂的温度循环, 对实验仪器要求严格<sup>[18]</sup>。与 RT-qPCR 相比, 本研究同样涉及菌总 RNA 的提取与  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 但省去了引物设计与逆转录步骤, 简化了实验复

杂程度。本研究直接将易降解的 RNA 信号转导为 DNA 信号, 且靶标长度仅需 28 nt, 反应过程为等温反应( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), 这在一定程度上提升了信号输出的稳定性及准确性。本研究方法可行的原因主要有以下 2 点。(1) CRISPR/Cas13a 系统具有高度特异性。依赖向导 RNA (CRISPR-associated RNA, crRNA) 与靶标 RNA 完全互补后, 激活 Cas13a 蛋白的反式切割活性, 从而非特异性切割周围单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA)<sup>[19-21]</sup>。本研究构建了一种 RNA 与 DNA 杂交的级联探针(RP/I), 被靶标 RNA (T-RNA) 激活的 CRISPR/Cas13a 能切割 RP/I 探针并成功释放出引发链 I (DNA)。(2) 为了进一步实现信号放大输出, 本研究引入了 HCR 技术, 通过一对 DNA 发夹探针(H1 和 H2)在引发链 I 的作用下发生级联杂交, 形成长的级联 DNA, 其中 H1 标记荧光 FAM 基团, 因此能输出强大的荧光信号(图 2B、2D)。

Cas13a 蛋白在 CRISPR RNA (crRNA) 的引导下, 能够高度特异性地识别并结合目标 RNA 序列。这种识别机制的优势在于严格遵守碱基互补配对原则, 使其能够精确区分单碱基突变, 为检测提供了极高的准确性。HCR 反应是一种无酶等温扩增技术, 操作简单、成本低廉。HCR 反应能将单个目标结合事件转换为长链 DNA 聚合物的形成, 每个聚合物上可以负载大量的信号分子(如荧光基团、拉曼探针), 实现信号的级联放大。Cas13a 提供了良好的特异性, 而 HCR 则提供了灵活的信号放大能力。将两者级联, 利用 Cas13a 的特异性识别切割来产生触发器, 进而启动 HCR 的二次信号放大, 从而实现超灵敏、高特异性检测<sup>[22-26]</sup>。本研究的核心创新点在于利用 CRISPR/Cas13a 的特异性识别和 HCR 的级联放大机制, 将单个 RNA 识别转换为 DNA 信号, 将检测限(LOD)降至  $1.01\text{ pmol/L}$  (图 4)。该性能与其他研究方法相似, 例如, Lysne 等<sup>[27]</sup>开发的量子点(quantum

dot, QD)分子信标(quantum dot-molecular beacon, QD-MB)平台集成 Förster 共振能量转移(Förster resonance energy transfer, FRET)与 CRISPR-Cas13a、Bruch 团队<sup>[28]</sup>开发的 CRISPR/Cas13a 驱动的电化学微流控生物传感器以及 Zhou 等<sup>[8]</sup>开发的 CRISPR/Cas13a 与 HCR 可视化检测平台, 其检测限 LOD 结果都在 pmol/L 水平。也有将 CRISPR/Cas13a 与催化发夹组装(CHA)技术结合的电化学生物传感平台, 在无靶标预扩增下其灵敏度可达 fmol/L 水平<sup>[29]</sup>。

尽管本研究成功建立了快速、灵敏、特异性的 CRISPR/Cas13a-HCR 检测方法, 但仍存在一定局限性: (1) 未实现一锅法操作, CRISPR/Cas13a-HCR 的两步法增加了开盖污染的风险, 步骤相对繁琐; (2) 与集成核酸扩增技术的 CRISPR/Cas13a 系统相比, 灵敏度性能还有提升空间, 如基于 CRISPR/Cas13a 系统的 SHERLOCK<sup>[30]</sup>以及超分支滚动环扩增(hyperbranched rolling circle amplification, HRCA)<sup>[31]</sup>, 其检测灵敏度甚至可达 amol/L 级别; (3) 该检测平台针对的是单一靶标, 而水产病害常由多种病原共同引起, 当前尚未满足水产病害多靶标检测需求。针对上述局限性, 未来可从以下 3 个方面进行优化。(1) 引入 DNA 四面体纳米结构提升灵敏度性能<sup>[32-34]</sup>。本研究的 HCR 体系依赖于自由扩散的发夹探针之间的随机碰撞, 这导致反应效率较低、耗时较长, 限制了其在高通量快速检测中的应用。然而, 即使设计再精密的发夹结构, 也可能因发夹的非特异性打开而产生背景信号, 特别是在复杂的生物基质中, 这可能会降低检测的信噪比。若能将 DNA 四面体设计为发夹 H1、H2 的信号载体, 利用 DNA 四面体的 4 个顶点连接发夹 H1、H2, 利用 DNA 四面体的刚性结构和空间限域效应可增加局部分子反应浓度, 有效提升信号强度。(2) 设计多重 crRNA 与多元 HCR 系统, 利用不同荧光基团进行标记, 实现多靶标检测以提升检测效

率。(3) 开发微流控芯片生物传感平台, 通过设计加样室、Cas 反应室和 HCR 反应室的微流控芯片, 实现两步反应的时空隔离, 开发全集成、一体化、多通道的便携式信号检测装置, 进一步降低操作门槛和使用成本<sup>[35-36]</sup>。

综上所述, 本研究聚焦病原微生物诊断的高灵敏、快速检测需求, 成功构建了一种 CRISPR/Cas13a-HCR 诊断方法。CRISPR/Cas13a-HCR 方法无需靶标预扩增、引物设计和复杂的温度循环程序即可实现 1.01 pmol/L 的 RNA 检测灵敏度, 反应温度为 37 °C, 检测时间约 2 h。CRISPR/Cas13a-HCR 不仅能有效区分副溶血性弧菌与近缘弧菌或其他细菌, 更具有单碱基识别能力, 表现出良好的特异性。该方法在 3 种模拟的复杂样本(27 份)中均达到 100% 准确率, 为微生物诊断提供了新的技术选择。

## 作者贡献声明

黄梦琴: 实验操作、数据处理和论文撰写; 辛煜: 数据分析、验证; 符丹凤: 样本获取与处理; 刘子扬: 数据呈现; 彭道云: 文献调研; 曾姝: 方法论、论文审阅和修改、基金获取; 万逸: 方法论、论文审阅和修改; 崔倩: 细菌培养; 陈菲: 文献调研、细菌培养。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007–2015[R]. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [2] 范鹏辉, 李红秋, 褚遵华, 刘志涛, 郭华, 林黎, 章荣华, 梁进军, 蒋玉艳, 戴月, 黄峥, 胡晴文, 刘继开, 韩海红, 闫韶飞, 李薇薇, 郭云昌. 2023 年中国大陆食源性疾病预防监测结果分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(10): 1199-1208.  
Fan PH, Li HQ, Chu ZH, Liu ZT, Guo H, Lin L, Zhang RH, Liang JJ, Jiang YY, Dai Y, Huang Z, Hu QW, Liu

- JK, Han HH, Yan SF, Li WW, Guo YC. Analysis of foodborne diseases outbreak surveillance in China's Mainland, 2023[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2024, 36(10): 1199-1208 (in Chinese).
- [3] Martinez-Urtaza J, Baker-Austin C. *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(10): 867-868.
- [4] Drake SL, DePaola A, Jaykus LA. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2007, 6(4): 120-144.
- [5] Huang D, Xu CT, Jiang CH, Chen QX, Xu ZN, Fang XM. Advances and challenges of signal readout systems in CRISPR-based biosensors for point-of-care testing of nucleic acid[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2024, 178: 117856.
- [6] Gong SH, Zhang SQ, Lu F, Pan W, Li N, Tang B. CRISPR/Cas-based *in vitro* diagnostic platforms for cancer biomarker detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(35): 11899-11909.
- [7] Granados-Riveron JT, Aquino-Jarquín G. CRISPR/Cas13-based approaches for ultrasensitive and specific detection of microRNAs[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1655.
- [8] Zhou HY, Bu SJ, Xu Y, Xue LL, Li ZY, Hao Z, Wan JY, Tang F. CRISPR/Cas13a combined with hybridization chain reaction for visual detection of influenza A (H1N1) virus[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(29/30): 8437-8445.
- [9] Yang YX, Yi WF, Gong F, Tan ZY, Yang YL, Shan XY, Xie CH, Ji XH, Zheng ZH, He ZK. CRISPR/Cas13a trans-cleavage-triggered catalytic hairpin assembly assay for specific and ultrasensitive SARS-CoV-2 RNA detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(2): 1343-1349.
- [10] Yang H, Patel DJ. Structures, mechanisms and applications of RNA-centric CRISPR-Cas13[J]. *Nature Chemical Biology*, 2024, 20(6): 673-688.
- [11] Dirks RM, Pierce NA. Triggered amplification by hybridization chain reaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(43): 15275-15278.
- [12] Zhang CY, Chen J, Sun R, Huang ZJ, Luo ZW, Zhou C, Wu MF, Duan YX, Li YX. The recent development of hybridization chain reaction strategies in biosensors[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(10): 2977-3000.
- [13] 联合国粮食及农业组织. 2024年世界渔业和水产养殖状况: 蓝色转型在行动[R]. 罗马: 联合国粮食及农业组织, 2024: 1-264 (in English).  
Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024-Blue Transformation in action[R]. Rome, Italy: FAO, 2024: 1-264.
- [14] Mohamad N, Amal MNA, Yasin ISM, Zamri Saad M, Nasruddin NS, Al-saari N, Mino S, Sawabe T. Vibriosis in cultured marine fishes: a review[J]. *Aquaculture*, 2019, 512: 734289.
- [15] 舒琥, 冯娟. 水产病原微生物与免疫[M]. 北京: 海洋出版社, 2022.
- [16] Yang F, Xu LM, Huang WZ, Li F. Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae[J]. *Aquaculture*, 2022, 548: 737605.
- [17] Zou Y, Xie GS, Jia TC, Xu TT, Wang C, Wan XY, Li YX, Luo K, Bian XD, Wang XH, Kong J, Zhang QL. Determination of the infectious agent of translucent post-larva disease (TPD) in *Penaeus vannamei*[J]. *Pathogens*, 2020, 9(9): 741.
- [18] 张星宇, 周婉婷, 邢方潇, 张岚. 实时荧光定量PCR在水源性致病微生物检测中的应用[J]. *净水技术*, 2025, 44(9): 10-20.  
Zhang XY, Zhou WT, Xing FX, Zhang L. Application of real-time quantitative PCR in determination of waterborne pathogenic microorganisms[J]. *Water Purification Technology*, 2025, 44(9): 10-20 (in Chinese).
- [19] Li LN, Duan CX, Weng JF, Qi XT, Liu CL, Li XH, Zhu JJ, Xie CX. A field-deployable method for single and multiplex detection of DNA or RNA from pathogens using Cas12 and Cas13[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(7): 1456-1465.
- [20] Li Y, Li SY, Wang J, Liu GZ. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(7): 730-743.
- [21] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DBT, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [22] Hang XM, Liu PF, Tian S, Wang HY, Zhao KR, Wang L. Rapid and sensitive detection of Ebola RNA in an unamplified sample based on CRISPR-Cas13a and DNA roller machine[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 211: 114393.
- [23] Huang D, Shen PJ, Xu CT, Xu ZP, Cheng DY, Zhu XC, Fang MJ, Wang ZY, Xu ZN. Dual nucleases-assisted cyclic amplification using polydopamine nanospheres-based biosensors for one-pot detection of microRNAs[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 222: 114957.
- [24] Gao X, Yin Y, Xie JY, Gong SH, Li XM. CRISPR/Cas13a-mediated triple signal amplification strategy for viral RNA detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2025, 422: 136706.
- [25] Liu L, Ju P, Yang KT, Li XM, Duan KL, Xie JL, Liu M, Chen JM, Luo R. Extended linear confined zipper cascaded reaction for highly efficient intracellular imaging and assisting diagnosis of thyroid cancer[J]. *Small*, 2025, 21(30): 2500202.
- [26] Wei RY, Wang KX, Liu XH, Shi MW, Pan W, Li N, Tang B. Stimuli-responsive probes for amplification-based imaging of miRNAs in living cells[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 239: 115584.
- [27] Lysne DP, Stewart MH, Susumu K, Leski TA, Stenger

- DA, Medintz IL, Díaz SA, Green CM. Quantum dot molecular beacons achieve sub-10 pM CRISPR-Cas detection in field-ready assays[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15: 27950.
- [28] Bruch R, Baaske J, Chatelle C, Meirich M, Madlener S, Weber W, Dincer C, Urban GA. CRISPR/Cas13a-powered electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid amplification-free miRNA diagnostics[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(51): 1905311.
- [29] Cui Y, Fan SJ, Yuan Z, Song MH, Hu JW, Qian D, Zhen DS, Li JH, Zhu BD. Ultrasensitive electrochemical assay for microRNA-21 based on CRISPR/Cas13a-assisted catalytic hairpin assembly[J]. *Talanta*, 2021, 224: 121878.
- [30] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [31] Huang MQ, Huang R, Yue HH, Shan YY, Xing D. Ultrasensitive and high-specific microRNA detection using hyper-branching rolling circle amplified CRISPR/Cas13a biosensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 325: 128799.
- [32] He SL, Chen L, Chen ZL, Zhang GH, Huang YJ, Zheng HX, Yang Q, Mo ZX, Lin XY, Wen JC. The sensing of circRNA with tetrahedral DNA nanostructure modified microfluidic chip[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1319: 342951.
- [33] Ouyang Y, Zhang P, Willner I. DNA tetrahedra as functional nanostructures: from basic principles to applications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(41): e202411118.
- [34] Su JS, Liu TS, Wang M, Xu WS, Liu JL, Lan JN, Chen YJ, Xu H, Guo DH, Lai ZM. Enhanced stability of hairpin-functionalized DNA tetrahedral nanostructures for miRNA detection in plasma from ischemic stroke patients[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2025, 1334: 343419.
- [35] Mao XY, Lu Y, Gao ZX, Zhong J, Xiao AJ, Lin JQ, Hu JM, Shu BW, Zhang CS. Modular microfluidic sensor integrating nucleic acid extraction, CRISPR/Cas13a, and electrochemiluminescence for multichannel RNA detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2025, 97(9): 5085-5092.
- [36] Hou Y, Liu Z, Huang HN, Lou CM, Sun ZW, Liu XY, Pang JB, Ge SG, Wang ZN, Zhou WJ, Liu H. Biosensor-based microfluidic platforms for rapid clinical detection of pathogenic bacteria[J]. *Advanced Functional Materials*, 2025, 35: 2411484.