2026, 66(10): 5294-5310
CSTR: 32112.14.j.AMS.20260214
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20260214

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

基于 RPA-CRISPR/dCas9 与 NanoBiT 技术的金黄色葡萄球菌便携式检测方法

陆沈焌杰[1#]，白桂杰[1#]，王焱乐[1]，黄鑫[1]，张燕宁[1]，刘夺[2,3*]，王汉杰[1,2,3,4*]

1 天津大学医学部 生命科学学院，天津
2 海南大学 药学院，热带生物资源教育部重点实验室和海南大学新药筛选及评价平台，海南 海口
3 天津大学 合成生物技术全国重点实验室，天津
4 龙岩学院 生命科学学院，动物源性人兽共患病防控福建省高校工程研究中心，福建 龙岩

陆沈焌杰, 白桂杰, 王焱乐, 黄鑫, 张燕宁, 刘夺, 王汉杰. 基于 RPA-CRISPR/dCas9 与 NanoBiT 技术的金黄色葡萄球菌便携式检测方法[J]. 微生物学报, 2026, 66(10): 5294-5310.
LU Shenjunjie, BAI Guijie, WANG Yanle, HUANG Xin, ZHANG Yanning, LIU Duo, WANG Hanjie. A portable detection method for *Staphylococcus aureus* based on RPA-CRISPR/dCas9 and NanoBiT[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(10): 5294-5310.

摘　要：【目的】针对当前病原菌检测方法依赖专业人员以及精密仪器、难以满足现场快速即时检测(point-of-care testing, POCT)需求的问题，本研究旨在建立一种基于重组酶聚合酶扩增(recombinant polymerase amplification, RPA)-CRISPR/dCas9 系统与纳米发光二元相互作用技术(NanoLuc binary interaction technology, NanoBiT)的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)便携式快速检测方法。【方法】以金黄色葡萄球菌高度保守的耐热核酸酶编码基因(*nuc*)为靶标，筛选灵敏度较高的 RPA 引物和小向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)；优化 sgRNA 与 dCas9 蛋白的添加浓度比例、检测时间等反应体系参数，并利用自制的便携式光电生物传感器读取检测信号；基于优化的反应体系与条件参数，对该检测方法的灵敏度、特异性、不同环境温度下的适应性和实际样本检测能力进行评估。【结果】优化后的检测方法在 1 h 内即可完成检测，以阴性对照信号均值+3 倍标准差(mean+3SD)为判定标准，检测限(limit of detection, LOD)可达 10^2 copies/μL，且只对靶细菌金黄色葡萄球菌敏感，表现出较高的特异性、灵敏度与环境适应性。【结论】成功建

资助项目：国家重点研发计划(2024YFC3407000)；国家自然科学基金(32571637, 32122047)；天津市自然科学基金(23JCJQJC00210, 22JCZDJC00230)；京津冀基础研究合作专项项目(23JCZXJC00370)；上海市“先锋者计划”(生物混合机器人主题)项目(25XF3200800)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2024YFC3407000), the National Natural Science Foundation of China (32571637, 32122047), the Tianjin Natural Science Foundation (23JCJQJC00210, 22JCZDJC00230), the Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research Cooperation Project of Beijing Natural Science Foundation (23JCZXJC00370), and the Shanghai “Pioneer Program” Bio-Hybrid Robot Project (25XF3200800).
[#]These authors contributed equally to this work.
*Corresponding authors. E-mail: WANG Hanjie, wanghj@tju.edu.cn; LIU Duo, liuduo@hainanu.edu.cn
ORCID: WANG Hanjie (0000-0001-9400-814X), LIU Duo (0000-0003-0867-1370)
Received: 2026-03-13; Accepted: 2026-06-02; Published online: 2026-07-01

立了一种基于 RPA-CRISPR/dCas9 与 NanoBiT 技术的高灵敏度、高特异性、便携式、低成本的金黄色葡萄球菌检测方法，尤其适用于在资源有限地区的现场快速即时检测，具有广阔应用前景。

关键词：CRISPR；重组酶聚合酶扩增(RPA)；核酸检测；纳米发光二元相互作用技术(NanoBiT)；金黄色葡萄球菌；光电生物传感器

A portable detection method for *Staphylococcus aureus* based on RPA-CRISPR/dCas9 and NanoBiT

LU Shenjunjie[1#], BAI Guijie[1#], WANG Yanle[1], HUANG Xin[1], ZHANG Yanning[1], LIU Duo[2,3*], WANG Hanjie[1,2,3,4*]

1 School of Life Sciences, Faculty of Medicine, Tianjin University, Tianjin, China
2 Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education and Hainan Engineering Research Center for Drug Screening and Evaluation, School of Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan, China
3 State Key Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin, China
4 Engineering Research Center for the Prevention and Control of Animal Original Zoonosis of Fujian Province University, College of Life Science, Longyan University, Longyan, Fujian, China

Abstract: [Objective] To address the current issue that pathogen detection methods rely on specialized personnel and precision instruments and are thus unsuitable for on-site rapid testing, this study established a portable and rapid detection method for *Staphylococcus aureus* (SA) based on the recombinase polymerase amplification (RPA)-CRISPR/dCas9 system and NanoLuc binary interaction technology (NanoBiT). **[Methods]** Firstly, targeting the highly conserved thermostable nuclease-encoding gene (*nuc*) of SA, RPA primers and single guide RNA (sgRNA) with high sensitivity were selected. Secondly, reaction parameters including the concentration ratio of sgRNA to dCas9 protein and the detection time were optimized, and detection signals were read by a self-developed portable photoelectric biosensor. Finally, with the optimized reaction system and conditions, this method was evaluated in terms of the sensitivity, specificity, adaptability under different environmental temperatures, and practical sample detection performance. **[Results]** The optimized method can complete the detection within 1 h. With the mean signal of the negative control plus three times the standard deviation (mean+3SD) as the threshold, the limit of detection (LOD) reached 10^2 copies/μL. The method was specifically sensitive only to the target bacterium SA, demonstrating high specificity, sensitivity, and environmental adaptability. **[Conclusion]** A highly sensitive, specific, portable, and low-cost detection method for SA was successfully established based on RPA-CRISPR/dCas9 and NanoBiT. This method is particularly suitable for on-site rapid testing in resource-limited settings and holds broad application prospects.

Keywords: CRISPR; RPA; nucleic acid detection; NanoBiT; *Staphylococcus aureus*; photoelectric biosensor

近年来，由病原微生物引起的食源性疾病的发病率逐年上升，对全球公共卫生安全构成严重的威胁[1]。其中，金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是最常见的食源性病原微生物之一，能产生引起急性胃肠炎的耐热肠毒素而造成食物中毒，对人类健康构成重大威胁[2-3]。金黄色葡萄球菌的检测方法有很多种，传统的平板培养法虽为检测金黄色葡萄球菌的金标准方法，但操作复杂、耗时久、易受干扰，难以满足现代快速检测的需求[4]。随着分子诊断技术的发展，基于核酸检测的病原微生物识别已成为目前食品安全和环境监测中的重要手段[5-6]。基于实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR)研究人员建立了金黄色葡萄球菌的核酸检测方法，该方法虽然具有较高的灵敏度，但需要昂贵的仪器设备和专业的操作人员，限制了其在资源匮乏地区的应用，难以实现现场快速即时检验[7-9]。因此，开发一种适用于现场即时检测(point-of-care testing, POCT)的高灵敏度金黄色葡萄球菌监测方法，对于预防和控制其引发的食源性疾病，以及保障食品与公共卫生安全具有重大意义。

相较于经典 PCR 技术，环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)[10]和重组酶聚合酶扩增[11]等恒温核酸扩增技术，在恒温条件下无需热循环即可将靶序列指数级扩增至可检测水平，大幅降低了对检测设备的要求。然而，上述方法仍然存在非特异性扩增的风险，可能导致虚假的检测结果。为此，多种序列特异性检测方法(特别是 CRISPR/Cas 系统)被开发出来，通过与恒温核酸扩增技术相结合以实现高特异性的靶序列检测。基于 CRISPR 效应蛋白 Cas12 或 Cas13 的附属切割活性可将报告核酸分子中的荧光团和淬灭剂分离从而产生荧光信号[12-14]。然而，依赖荧光信号的传统检测方法需要外部激发光源，同时易受到样本自发荧光和光散射的影响(尤其在复杂样本中)，导致灵敏度下降。

相较于依赖激发光的荧光信号，通过荧光素酶催化的化学发光信号无需借助外部激发光，具有更高的信噪比[15]。Engelen 等[16]利用荧光素酶偶联的分子信标建立了针对单链 DNA 及 RNA 的发光检测方法。Zhang 等[17]则构建了基于分裂型荧光素酶 2 个半体偶联 dCas9 蛋白的系统，成功用于体外结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) DNA 的检测。随着基因工程与蛋白质工程技术的发展，基于定向进化改造获得 NanoLuc 荧光素酶展现出优异的发光性能：其分子量仅有 19.1 kDa，对检测体系干扰小(如通过蛋白偶联方式)；NanoLuc 荧光素酶能够与新型底物 furimazine (商用改良型底物为 Nano-Glo 底物)作用，生成 furimamide 并产生高强度的催化发光信号，其小巧且明亮的发光特性可显著提升检测灵敏度[18]。在此基础上进一步发展的纳米发光二元相互作用技术(NanoLuc binary interaction technology, NanoBiT)可将 NanoLuc 分成 156 氨基酸大小的 LargeBiT (LgBiT)和 11 氨基酸大小的 SmallBiT (SmBiT) 2 个亚基，这 2 个亚基在空间上足够接近时可重新组成具有荧光素酶活性的 NanoLuc[19]。Van der Veer 等[20]基于该原理构建了 dCas9 介导的分裂型 NanoLuc 荧光素酶互补系统，实现了严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的序列特异性检测。此外，如果能将该发光信号进一步通过光电生物传感器转换成可精确测量的电信号，将有助于便携化现场布置使用，拓展该类方法在即时诊断中的应用潜力[21]。

本研究将 RPA-CRISPR/dCas9 系统和 NanoBiT 技术相结合，使用原核表达系统表达并纯化分别偶联 LargeBiT 和 SmallBiT 亚基的 dCas9 融合蛋白，即 dCas9-LargeBiT (dCas9-LB)蛋白和 dCas9-SmallBiT (dCas9-SB)蛋白；针对金黄色葡萄球菌高度保守的 *nuc* 基因设计靶标特异性的小向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)；结合本实验室自制的便携式光电生物传感器和自

主开发的配套应用软件对金黄色葡萄球菌 RPA 产物进行快速检测，旨在建立一种灵敏、快速、便携的金黄色葡萄球菌检测方法(图 1)。

1 材料与方法

1.1 菌株

肠沙门氏菌肠道亚种鼠伤寒血清型(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium*) ATCC14028、金黄色葡萄球菌金黄亚种(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*) ATCC25923、金黄色葡萄球菌金黄亚种 ATCC6538、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853，北京北纳创联生物技术研究院(BNCC)提供；大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) MG1655、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168，均由本实验室前期保存；*E. coli* BL21(DE3)化学感受态细胞，北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

RPA/RAA DNA 恒温扩增试剂盒(基础型)(冻干)，深圳易致生物科技有限公司；无酶无菌水，北京索莱宝科技有限公司；溶菌酶 A、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)，天根生化科技(北京)有限公司；NEBuffer r3.1 (10×)，纽英伦生物技术(北京)有限公司；DTT 溶液、核糖核酸酶抑制剂，上海源叶生物科技有限公司；His-Tag 纯化树脂，罗氏诊断产品(上海)有限公司；咪唑，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒，苏州新赛美生物科技有限公司；Nano-Glo 底物，普洛麦格(北京)生物技术有限公司。

超微量分光光度计(NanoDrop 2000)、高速落地离心机，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；化学发光多色荧光凝胶成像系统，Uvitec 公司；金属浴，杭州瑞诚仪器有限公司；VICTOR Nivo 多功能酶标仪，瑞孚迪生物医学(上海)有限公司；电泳仪(含电泳槽)，北京君意东方电泳设备有限公司；便携式光电生物传感器，本实验室自制。

1.3 RPA 引物和 sgRNA 的设计与合成

在 NCBI 网站中利用 BLAST 工具对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因(*nuc*)序列进行比对分析，发现该基因在不同亚种的金黄色葡萄球菌

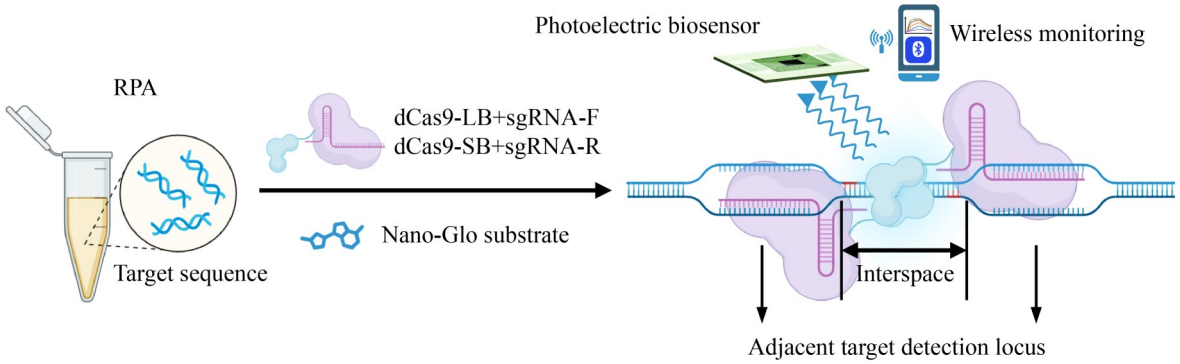


图1 RPA-CRISPR/dCas9系统结合NanoBiT技术的检测方法原理示意图

Figure 1 Schematic diagram of the detection method based on the RPA-CRISPR/dCas9 system combined with NanoBiT technology. dCas9-LB/sgRNA-F and dCas9-SB/sgRNA-R complexes specifically recognize target DNA sequences in a PAM-dependent manner and bind to adjacent target detection loci. The spatial proximity of dCas9-LB and dCas9-SB facilitates the reconstitution of catalytically active NanoLuc luciferase. Upon addition of the Nano-Glo substrate, furimazine is oxidized to furimamide, resulting in the generation of a high-intensity bioluminescent signal.

之间高度保守，且几乎不存在于其他细菌中，因此该基因可用于金黄色葡萄球菌特异性鉴定。根据该保守基因的序列，确定 2 组候选检测位点(分别为 A 位点和 B 位点)，分别设计候选的 RPA 引物与 sgRNA，sgRNA 由 CRISPR RNA (crRNA)与反式激活 crRNA (tracrRNA)组成。其中，靶向 A 位点的一对 sgRNA 对应的靶序列中间的间隔区(interspace)长度为 31 bp，靶向 B 位点的一对 sgRNA 对应的靶序列相隔 37 bp (图 1)，RPA 引物与 sgRNA 均由安升达(天津)生物科技有限公司直接合成(表 1)。

1.4 dCas9-LB 和 dCas9-SB 蛋白制备

按照参照文献[20]的相关序列信息构建带有 His 标签的 pET28a-dCas9-LB 和 pET28a-dCas9-SB 后，转入 *E. coli* BL21(DE3)化学感受态细胞。使用 IPTG 诱导后，将细菌细胞 6 000×*g* 离心 10 min，在缓冲液(20 mmol/L Tris，300 mmol/L NaCl)中重新悬浮 30 mL，然后再次重复离心。将沉淀物在 30 mL 缓冲液中重新悬浮，对菌体进行超声破碎(150 W，25 kHz，开 2 s/关 3 s，持续破碎 5 min)，之后 12 000×*g* 离心 1 h，收集上清液，并使用 0.22 μm 滤膜过滤。使用镍柱进行亲和层析纯化，用梯度咪唑缓冲液洗脱目标蛋白，透析至蛋白缓冲液中备用。通过 SDS-PAGE 使用蛋白质印迹法(Western blotting, WB)鉴定纯化蛋白，并使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定目标蛋白的浓度。

1.5 RPA 等温扩增

根据 RPA/RAA DNA 恒温扩增试剂盒的操作说明，在总体积不变的情况下对各组分含量进行微调。在冰上操作，每个反应管中依次加入：Rehydration Buffer (2×) 10 μL，上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μL，目标 DNA 2 μL，无菌无酶水 4 μL，Starter (10×) 2 μL。混匀后瞬时离心，在金属浴上恒温 40 ℃孵育 30 min，完成对候选检测位点 A 位点或 B 位点的目标 DNA 的扩增。

1.6 RPA-CRISPR/dCas9 系统结合 NanoBiT 技术的检测方法的建立与优化

dCas9-LB 和 dCas9-SB 蛋白分别与 sgRNA-F 和 sgRNA-R 进行组装，预组装体系中含有

表1 RPA引物和sgRNA序列信息

Table 1 Sequence information of RPA primers and sgRNA

Primer names	Primer sequences (5′→3′)
nuc-RPA-A-F1	CTTATAGGGATGGCTATCAGTAATGTTTCG
nuc-RPA-A-F2	TCGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAG
nuc-RPA-A-R1	GTATCACCATCAATCGCTTTAATTAATGTCGCAGG
nuc-RPA-A-R2	CAGGTGTATCAACCAATAATAGTCTGAATGTCA
nuc-RPA-B-F1	CAGATAATGGCGTAAATAGAAGTGGTTCTG
nuc-RPA-B-F2	CTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAACTTC
nuc-RPA-B-R1	CACTTGCTTCAGGACCATATTTCTCTACACC
nuc-RPA-B-R2	CGTAAATGCACTTGCTTCAGGACCATATTTCTC
nuc-sgRNA-A-F	AAUGCAUCACAAACAGAUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
nuc-sgRNA-A-R	GAAGUUGCACUAUAUACUGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
nuc-sgRNA-B-F	ACAUUAAUUAAAGCGAUUGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
nuc-sgRNA-B-R	AAUAAUAGUCUGAAUGUCAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

NEBuffer r3.1 (10×) 5 μL，0.1 mol/L DTT 溶液 0.5 μL，40 U/μL 核糖核酸酶抑制剂 1.25 μL，4 μmol/L dCas9-LB 或 dCas9-SB 用量分别为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 μL，10 μmol/L sgRNA-F 或 sgRNA-R 用量分别为 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 μL，最后用无菌无酶水补足为 50 μL 总体系，在金属浴上恒温 37 ℃孵育 30 min 后完成预组装。

分别取 45 μL dCas9-LB/sgRNA-F 和 dCas9-SB/sgRNA-R 预组装体系，加入 10 μL RPA 扩增产物和 0.1 μL Nano-Glo 底物，混匀后瞬时离心，在金属浴上恒温 37 ℃孵育 10−60 min，最后分别通过便携式光电生物传感器和酶标仪对化学发光信号的强度进行检测。以最短时间出现便携式光电生物传感器可检测出的化学发光信号为原则，选择出最佳的检测位点，并对 dCas9-LB/SB 与 sgRNA-F/R 的预组装浓度、Nano-Glo 底物反应时间(检测时间)进行优化。

便携式光电生物传感器基于化学发光信号检测原理构建。首先，硅光电倍增管(silicon photomultiplier, SiPM)可将检测体系中微弱的光信号转换为可测的电信号；接着，经运算放大器(operational amplifier, OPA)放大后转换为电压信号，并经模拟数字转换器(analogue-to-digital conversion, ADC)转换为数字信号；最后，蓝牙模块(bluetooth module, BTM)将数字信号信息无线发送至智能手机中自研的应用软件，通过该软件可读取输出的数字信号数值，取 30 s 内的平均数值作为单次检测结果，整个检测过程在不透光的防静电黑盒子中完成(图 2)。便携式光电生物传感器上的相关电子元件均采用焊接工艺组装到电路板上，同时由可充电锂离子电池供电。整个电子器件表面涂覆了三防漆，以确保其在各类环境中得到保护。

对于酶标仪，取 80 μL 反应体系使用 384 孔酶标板进行检测，读取化学发光检测模式(luminescence, Lum)下的相对光单位(relative light units, RLU)数值作为单次检测结果。二者均通过检测化学发光信号的强度来输出检测结果，为验证便携式光电生物传感器的检测性能(灵敏度、稳定性)，本研究中使用便携式光电生物传感器与酶标仪对样品的化学发光信号强度进行同步检测，并将相关检测结果进行平行展示。

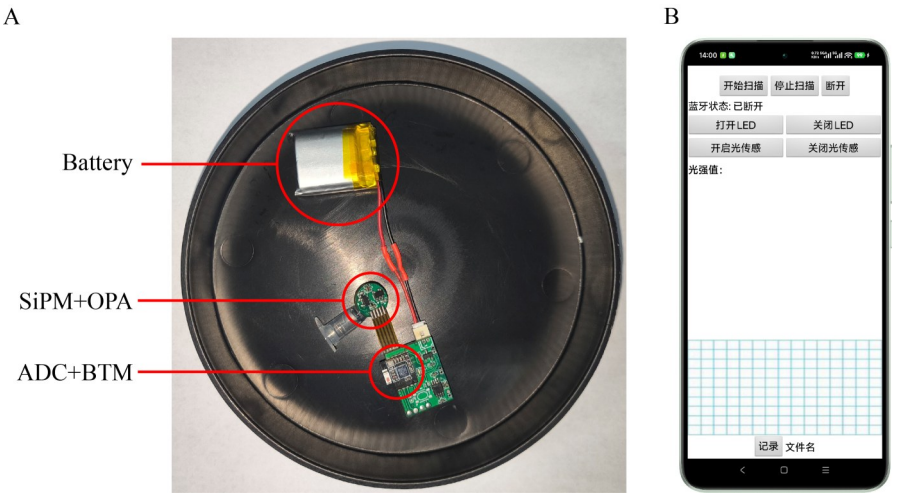


图2 便携式光电生物传感器示意图

Figure 2 Schematic diagram of a portable photoelectric biosensor. A: Electronic components of the biosensor; B: Self-developed smartphone application software. SiPM: Silicon photomultiplier; OPA: Operational amplifier; ADC: Analogue-to-digital conversion; BTM: Bluetooth module.

1.7 RPA-CRISPR/dCas9 系统结合 NanoBiT 技术的检测方法的灵敏度试验

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取金黄色葡萄球菌 ATCC6538 的基因组 DNA，并稀释成 8 个稀释度，基因组拷贝数浓度分别为 10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10^1、10^0 copies/μL，并设置 ddH_2O 作为阴性对照，以阴性对照信号均值+3 倍标准差(mean+3SD)作为检测限(limit of detection, LOD)的判定标准。

1.8 RPA-CRISPR/dCas9 系统结合 NanoBiT 技术的检测方法的特异性试验

选择沙门氏菌 ATCC14028、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠埃希氏菌 MG1655、枯草芽孢杆菌 168 进行特异性实验，使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取相关菌株的基因组 DNA，并将浓度统一稀释至 10^5 copies/μL，同时设置 ddH_2O 作为阴性对照，采用优化的反应条件进行检测，判断该检测方法的特异性。

1.9 RPA-CRISPR/dCas9 系统结合 NanoBiT 技术的检测方法的不同环境温度下的适应性试验

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取金黄色葡萄球菌 ATCC6538 的基因组 DNA，并稀释成 10^5 copies/μL，并设置 ddH_2O 作为阴性对照。采用优化的反应条件，在 30、34、37、40、42 ℃下(检测全流程保持同一温度)分别进行检测，判断该检测方法在不同环境温度下的适应性。

1.10 检测人工污染样品中的金黄色葡萄球菌

为了评价 RPA-CRISPR/dCas9 系统结合 NanoBiT 技术的金黄色葡萄球菌检测方法的实用性，将含有金黄色葡萄球菌的培养液分别加入到市场上购买的牛奶、矿泉水、豆浆、果汁饮料中，使人工污染的样品中金黄色葡萄球菌的浓度约 10^4 CFU/mL，分别取适量样品提取基因组 DNA，采用优化的反应条件进行检测。

1.11 统计学分析方法与检测限确定方法

使用软件 GraphPad Prism 10 进行数据处理分析，比较单因素多组间差异时采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计学分析，并选择合适的方法进行事后多重比较来确定组间的显著性值。为了保证检测的可重复性与准确性，所有实验中均至少设置了 3 个独立的技术重复(n≥3)，数据误差棒以±SD (标准差)表示，显著性水平设定为 P<0.05。

检测限依据阴性对照信号分布进行统计学判定，以阴性对照信号均值+3 倍标准差(mean+3SD)作为显著阳性阈值(3σ 准则)，该方法被广泛用于对检测限的判定[22]。基于上述阈值，当样本信号高于该阈值时判定为检测结果阳性。

2 结果与分析

2.1 最佳 RPA 引物的确定

为筛选出适用于金黄色葡萄球菌检测的最佳 RPA 扩增引物，本研究以金黄色葡萄球菌 ATCC6538 基因组 DNA (10 ng)为模板，针对 *nuc* 基因上的 A、B 两个候选检测位点，将其对应的上下游引物进行两两组合配对扩增，并设 ddH_2O 为阴性对照。如图 3 所示，通过凝胶电泳条带分析结合 ImageJ 灰度定量分析，比较不同引物组合的扩增效率。对于 A 位点，*nuc*-RPA-A-F2/*nuc*-RPA-A-R1 引物组合的扩增效率最高；对于 B 位点，*nuc*-RPA-B-F2/*nuc*-RPA-B-R2 引物组合的扩增效率最高。据此，选定上述 2 组引物作为后续金黄色葡萄球菌 RPA 扩增的优选引物。

2.2 dCas9-LB 和 dCas9-SB 蛋白纯化与鉴定

为获得高纯度的功能性融合蛋白，本研究对纯化后的 dCas9-LB 和 dCas9-SB 蛋白进行了 WB 鉴定及浓度测定(图 4)。结果显示，dCas9-LB 和

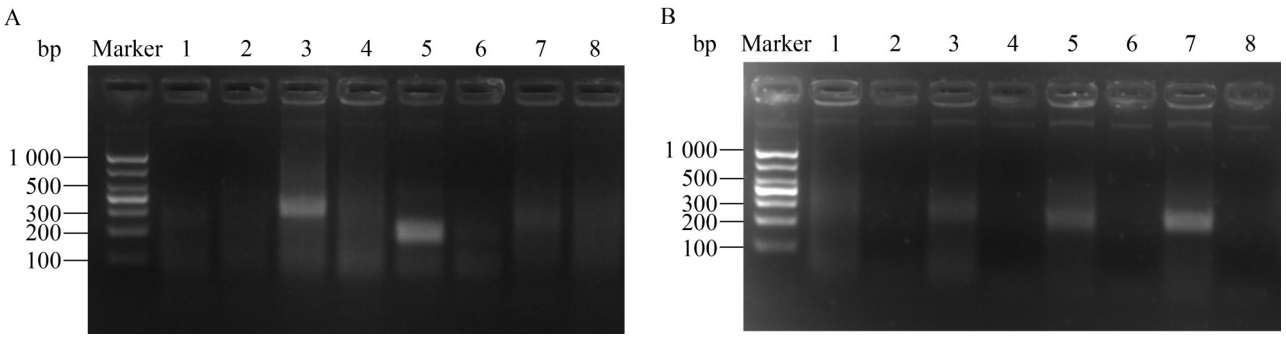


图3 RPA引物筛选结果

Figure 3 The results of RPA primer screening. A: Results of primer screening for locus A by nucleic acid electrophoresis (Marker: GL DNA Marker 1000; Lane 1: Primer *nuc*-RPA-A-F1/*nuc*-RPA-A-R1 amplify the gDNA, 248 bp; Lane 2: Primer *nuc*-RPA-A-F1/*nuc*-RPA-A-R1 amplify ddH_2O; Lane 3: Primer *nuc*-RPA-A-F1/*nuc*-RPA-A-R2 amplify the gDNA, 310 bp; Lane 4: Primer *nuc*-RPA-A-F1/*nuc*-RPA-A-R2 amplify ddH_2O; Lane 5: Primer *nuc*-RPA-A-F2/*nuc*-RPA-A-R1 amplify the gDNA, 187 bp; Lane 6: Primer *nuc*-RPA-A-F2/*nuc*-RPA-A-R1 amplify ddH_2O; Lane 7: Primer *nuc*-RPA-A-F2/*nuc*-RPA-A-R2 amplify the gDNA, 249 bp; Lane 8: Primer *nuc*-RPA-A-F2/*nuc*-RPA-A-R2 amplify ddH_2O); B: Results of primer screening for locus B by nucleic acid electrophoresis (Marker: GL DNA Marker 1000; Lane 1: Primer *nuc*-RPA-B-F1/*nuc*-RPA-B-R1 amplify the gDNA, 228 bp; Lane 2: Primer *nuc*-RPA-B-F1/*nuc*-RPA-B-R1 amplify ddH_2O; Lane 3: Primer *nuc*-RPA-B-F1/*nuc*-RPA-B-R2 amplify the gDNA, 311 bp; Lane 4: Primer *nuc*-RPA-B-F1/*nuc*-RPA-B-R2 amplify ddH_2O; Lane 5: Primer *nuc*-RPA-B-F2/*nuc*-RPA-B-R1 amplify the gDNA, 201 bp; Lane 6: Primer *nuc*-RPA-B-F2/*nuc*-RPA-B-R1 amplify ddH_2O; Lane 7: Primer *nuc*-RPA-B-F2/*nuc*-RPA-B-R2 amplify the gDNA, 209 bp; Lane 8: Primer *nuc*-RPA-B-F2/*nuc*-RPA-B-R2 amplify ddH_2O).

dCas9-SB 蛋白的各自特异性条带位置分别与它们的理论分子量 178.4 kDa、162.3 kDa 一致，证实成功纯化出目的蛋白。经测定，2 个蛋白浓度均约为 40 μmol/L，稀释 10 倍后备用，为后续检测体系的构建提供了核心试剂。

2.3 sgRNA 最佳检测位点的筛选确定

为确定赋予检测体系最高灵敏度的 sgRNA 靶向位点，本研究以基因 *nuc* 候选检测位点 A 或 B 的 RPA 扩增产物(10 fmol)为检测目标，在固定 dCas9 蛋白添加量的条件下，比较了对应 sgRNA 的检测效果。在 dCas9-LB 或 dCas9-SB 添加量为 0.9 pmol，*nuc*-sgRNA-F 或 *nuc*-sgRNA-R 添加量为 2.25 pmol 的条件下，添加 Nano-Glo 底物后，将 100 μL 总反应体系恒温 37 ℃孵育 30 min 后分别使用光电生物传感器和酶标仪进行检测。检测结果如图 5 所示，靶向 B 位点的 sgRNA (*nuc*-sgRNA-B-F/R)产生的检测信号显著优于靶向 A 位点的 sgRNA。因此，选用靶向 B 位点的 sgRNA 进行后续实验。

2.4 sgRNA-F/R 与 dCas9-LB/SB 最佳添加比例的优化

为获得最优的信号输出效率，本研究对体系中关键组分 dCas9 蛋白与 sgRNA 的添加比例进行了优化。以基因 *nuc* 检测位点 B 的 RPA 扩增产物(10 fmol)为检测目标，添加不同浓度的 dCas9-LB 或 dCas9-SB 与 *nuc*-sgRNA-B-F 或 *nuc*-sgRNA-B-R，将 100 μL 总反应体系恒温 37 ℃孵育 30 min 后分别使用光电生物传感器和酶标仪进行检测。如图 6 所示，100 μL 总反应体系中，当 dCas9-LB 或 dCas9-SB 添加量为 2.7 pmol，*nuc*-sgRNA-B-F 或 *nuc*-sgRNA-B-R 添

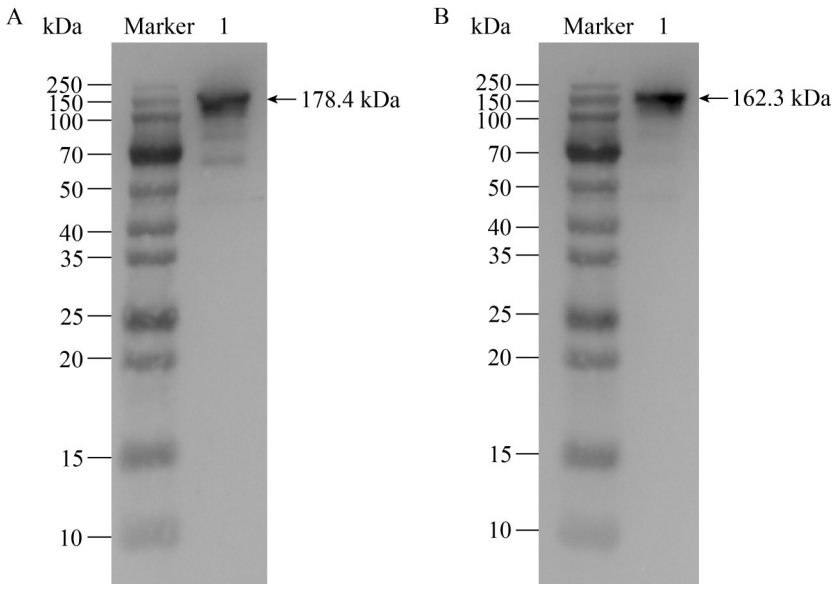


图4　dCas9-LB和dCas9-SB蛋白的WB分析鉴定

Figure 4　Identification of dCas9-LB and dCas9-SB proteins by Western blotting analysis. A: Western blotting identification of dCas9-LB (Marker: StarRuler Color Prestained Protein Marker 10−250 kDa; Lane 1: dCas9-LB, 178.4 kDa); B: Western blotting identification of dCas9-SB (Marker: StarRuler Color Prestained Protein Marker 10−250 kDa; Lane 1: dCas9-SB, 162.3 kDa).

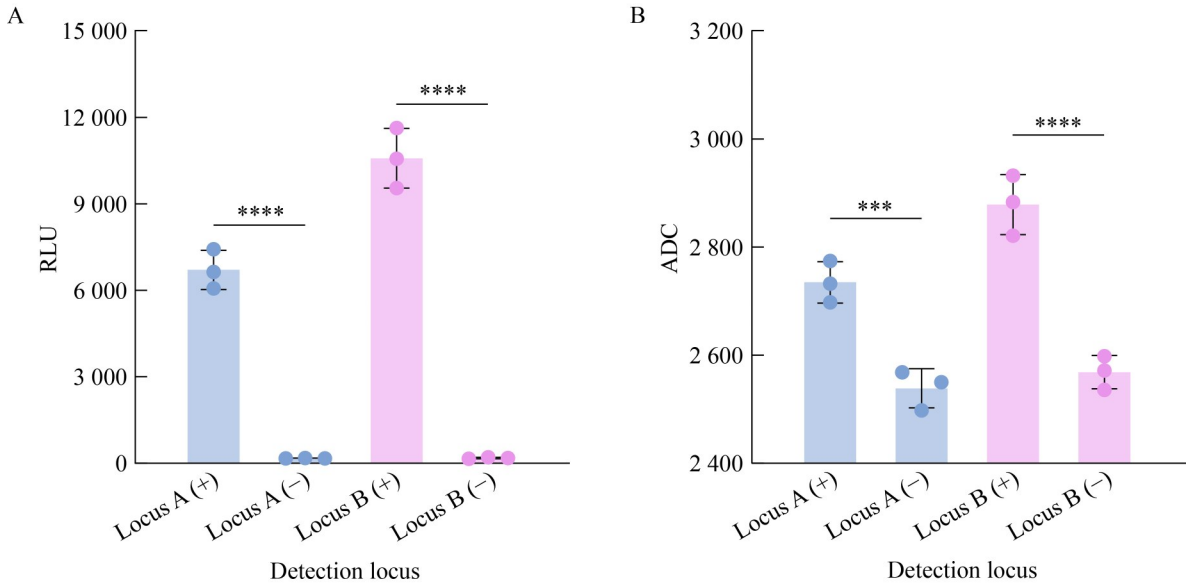


图5　基因*nuc*位点A和B的检测结果比较

Figure 5　Comparison of detection results of *nuc* locus A and B. A: Detection results read by microplate reader; B: Detection results read by portable optoelectronic biosensor. The plus sign (+) represents the experimental group with the target DNA added, and the minus sign (−) represents the negative control group using ddH_2O as the detection target. Data are mean±SD. ****: P<0.000 1; ***: P<0.001.

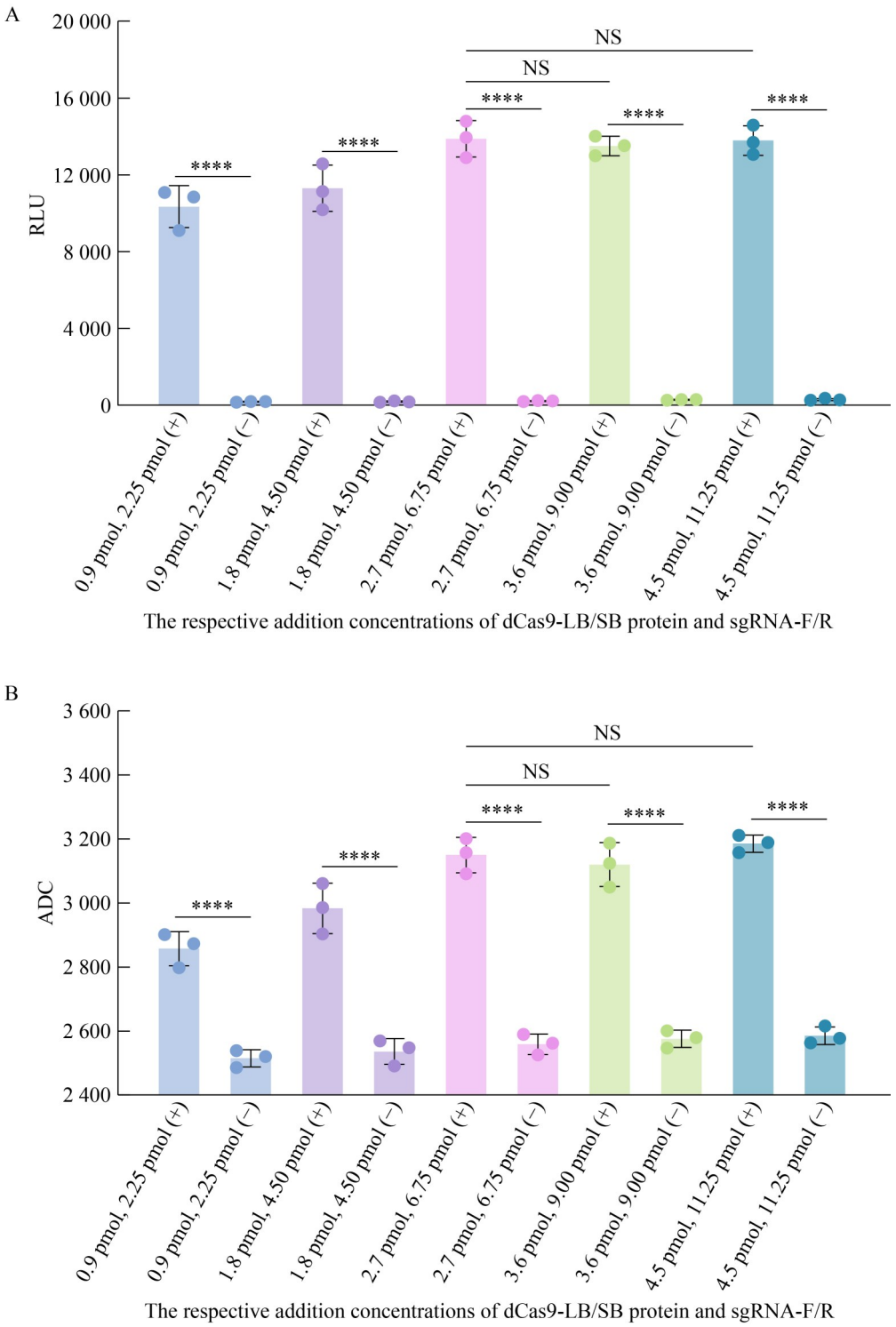


图6　添加不同浓度的sgRNA-F/R与dCas9-LB/SB蛋白的情况下的检测结果

Figure 6　Detection results under the condition of adding different concentrations of sgRNA-F/R and dCas9-LB/SB proteins. A: Detection results read by microplate reader; B: Detection results read by portable optoelectronic biosensor. ****: P<0.000 1; NS: P>0.05.

加量为 6.75 pmol 的情况下，体系可达到较高的检测效果。尽管更高浓度条件下信号略有增加，但差异无统计学意义。因此，综合考虑试剂消耗与检测成本，最终仍然选定此比例条件为后续实验的反应参数。

2.5 最佳检测时间的确定

为实现快速检测并捕捉信号峰值，本研究考察了不同孵育时间对检测信号强度的影响。基于上述已探索的优化条件，对 0.1、1、10、100 fmol 的 RPA 扩增产物进行检测，将总反应体系恒温 37 ℃分别孵育 10、20、30、40、50、60 min 后，分别使用光电生物传感器和酶标仪进行检测。检测结果如图 7 所示，在 10 min 即可观察到较好的检测结果，时间延长反而会导致荧光素酶信号发生不同程度的衰减，同步引发电信号读数的降低。因此，确定 10 min 为信号读取的最佳检测时间点。

2.6 灵敏度评估

基于上述最终优化的实验参数，本研究对 10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10^1、10^0 copies/μL 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 进行 RPA 扩增及后续检测，以评估方法的灵敏度。如图 8 所示，以阴性对照信号均值+3 倍标准差作为阳性阈值，最低检测限可达 10^2 copies/μL，同时检测限及以上浓度的样本的检测信号均与阴性对照有显著差异，表明该方法具有良好的检测灵敏度。

2.7 特异性评估

为验证方法的特异性，本研究选取了金黄色葡萄球菌及其他非靶标细菌(如肠沙门氏菌、枯草芽孢杆菌等)进行检测。首先对各菌株基因组进行 RPA 扩增，电泳结果(图 9)显示仅金黄色葡萄球菌组出现目的条带。进一步利用本研究开发的新方法对扩增产物进行发光检测，结果表明仅金黄色葡萄球菌组产生了与阴性对照有显著差异的检测信号，而其他非靶标菌株均无阳性信号(图 10)，充分证明了该检测方法具有优异的特异性。

2.8 不同环境温度下的适应性评估

为初步评估该方法在不同环境温度下的适应性，本研究采用所建立的方法分别在 30、34、37、40、42 ℃下(检测全流程保持同一温度)对金黄色葡萄球菌 ATCC6538 的基因组 DNA 样品进行检测。检测结果如图 11 所示，在 30–42 ℃范围内均可获得稳定阳性检测信号，表明该方法对环境温度波动具有一定耐受性，具备在非严格控温条件下进行现场检测的潜力。

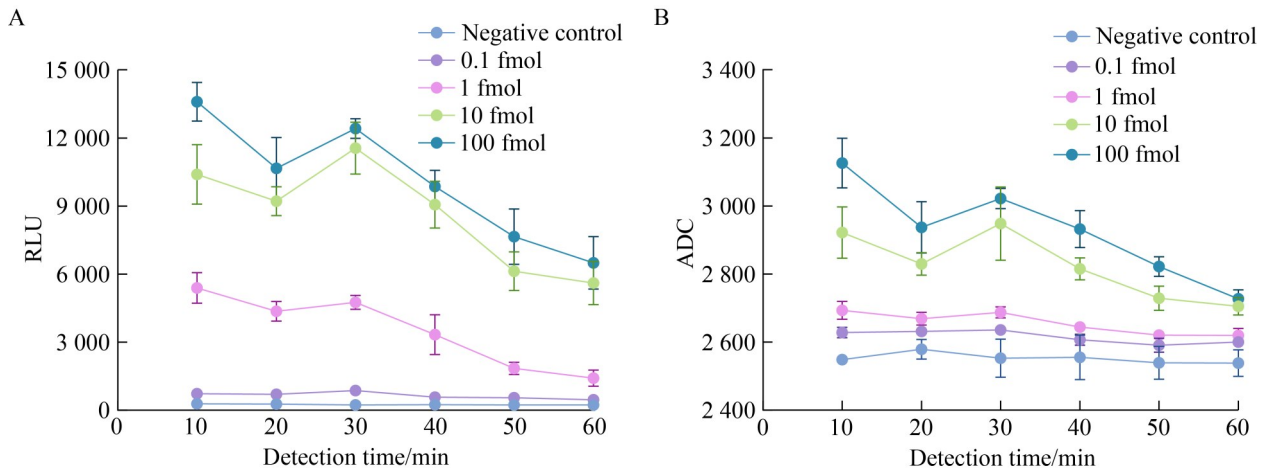


图7 不同时间点下不同浓度DNA片段的检测结果

Figure 7 Detection results for various concentrations of DNA fragments at different time points. A: Detection results read by microplate reader; B: Detection results read by portable optoelectronic biosensor.

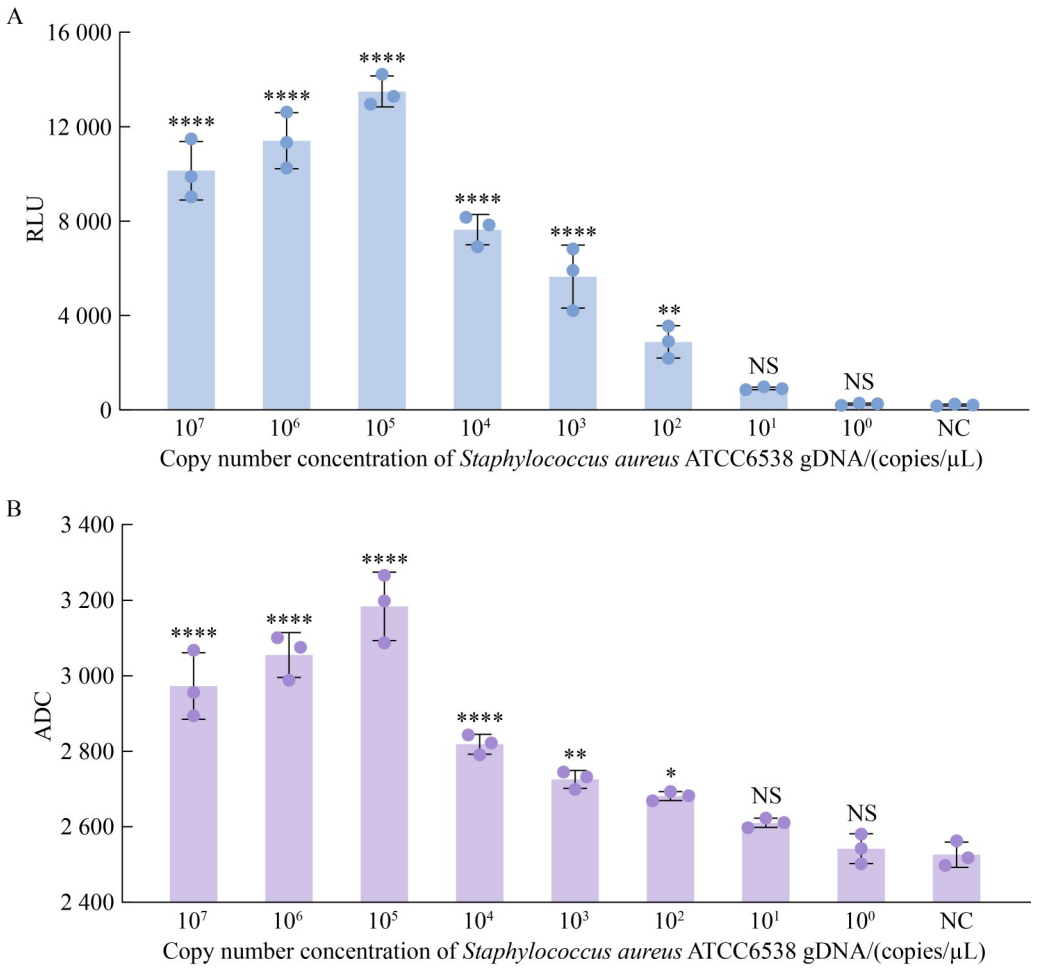


图8　对于不同拷贝数浓度的金黄色葡萄球菌的检测结果

Figure 8　Detection results for different copy number concentrations of *Staphylococcus aureus*. A: Detection results read by microplate reader; B: Detection results read by portable optoelectronic biosensor. ****: P<0.000 1; **: P<0.01; *: P<0.05; NS: P>0.05.

2.9　对人工污染样品检测效果的评价

为初步评估该方法在实际样本检测中的可行性，本研究采用所建立的方法对一系列人工污染金黄色葡萄球菌的样品进行检测。检测结果如图 12 所示，所有人工污染样品均能产生明确的阳性检测信号，证实了本方法能够有效识别复杂基质中的目标病原体，具备应用于实际样本检测的潜力。

3　讨论与结论

食源性金黄色葡萄球菌，特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)，可导致严重的感染性疾病且病死率高，对全球公共卫生安全造成严重的威胁[23]。为应对当前检测技术在临床应用与现场筛查之间的适应性困境，本研究旨在建立一种兼具高灵敏度与便携性的金黄色葡萄球菌核酸检测新方法。传统细菌培养法虽作为金标准方法被广泛应用，但其需要 48–72 h 菌落培养周期，监测耗时长，易错过最佳治疗窗口。以 qPCR 为代表的分子检测技术，虽具备快速、准确的检测能力，但仍存在依赖精密仪器、

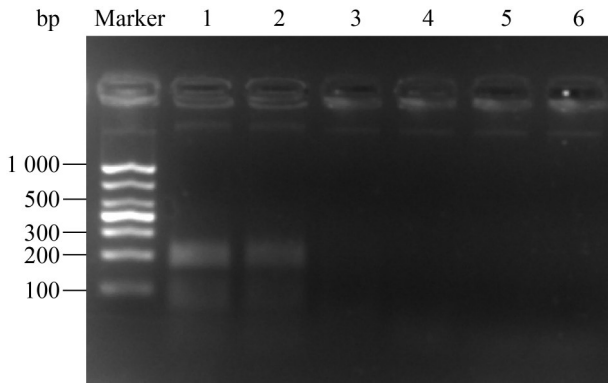


图9　RPA引物的特异性检测

Figure 9　Specificity detection of RPA primers. Marker: GL DNA Marker 1000; Lane 1: *S. aureus* ATCC6538; Lane 2: *S. aureus* ATCC25923; Lane 3: *S. typhimurium* ATCC14028; Lane 4: *P. aeruginosa* ATCC27853; Lane 5: *E. coli* MG1655; Lane 6: *B. subtilis* 168.

操作流程复杂、需专业人员操作等固有局限，难以满足资源有限环境下的即时检测需求。因此，开发适用于现场部署的快速检测方法具有重要的现实意义[24-26]。

为突破上述技术瓶颈，本研究将RPA-CRISPR/dCas9系统与NanoBiT技术相结合，利用自制的便携式光电生物传感器成功建立了一种灵敏、快速、准确且便携的金黄色葡萄球菌检测方法。在信号输出策略上，本研究区别于大多数依赖荧光信号的传统检测方法，采用NanoLuc荧光素酶催化的生物发光体系实现靶标检测。生物发光作为自发光信号，无需外部激发光源，可有效规避自发荧光及光散射等背景干扰，同时能够被各类光电生物传感器稳定捕获。基于此，本研究自主设计并制作了一款低成本便携式光电生物传感器，配合自研的智能手机应用软件，实现了对化学发光信号的灵敏检测，其检测结果与高精度酶标仪在信号变化趋势及定量结果上具有良好一致性，表明该生物传感器具备较好的灵敏度与重复性，可满足现场检测需求。该检测方法在30–42 ℃的环境下即使不完全依赖恒温设备，也可完成全流程检测，显著降低了对精密昂贵仪器设备的依赖。本方法可在1 h内完成全部检测流程，检测速度较传统培养法及常规PCR方法大幅提升。本方法同时具有良好的灵敏度，检测限可达10^2 copies/μL，与多数qPCR、LAMP、CRISPR/Cas12a方法检测方法灵敏度相似(表2)[8,10,12,27-28]。此外，本方法表现出优异的

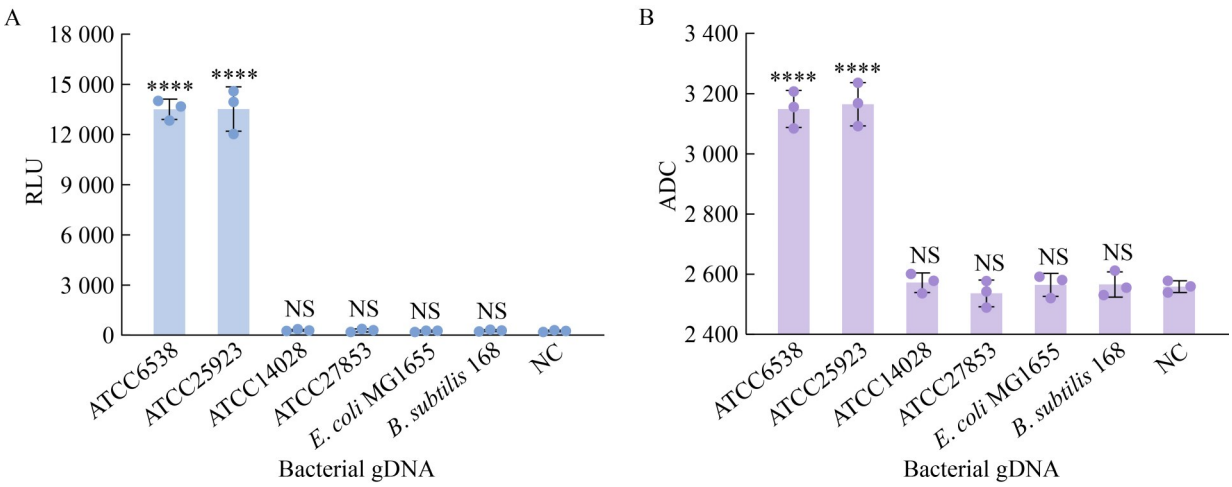


图10　对于不同细菌的检测结果

Figure 10　Detection results for different bacteria. A: Detection results read by microplate reader; B: Detection results read by portable optoelectronic biosensor. ****: P<0.000 1; NS: P>0.05.

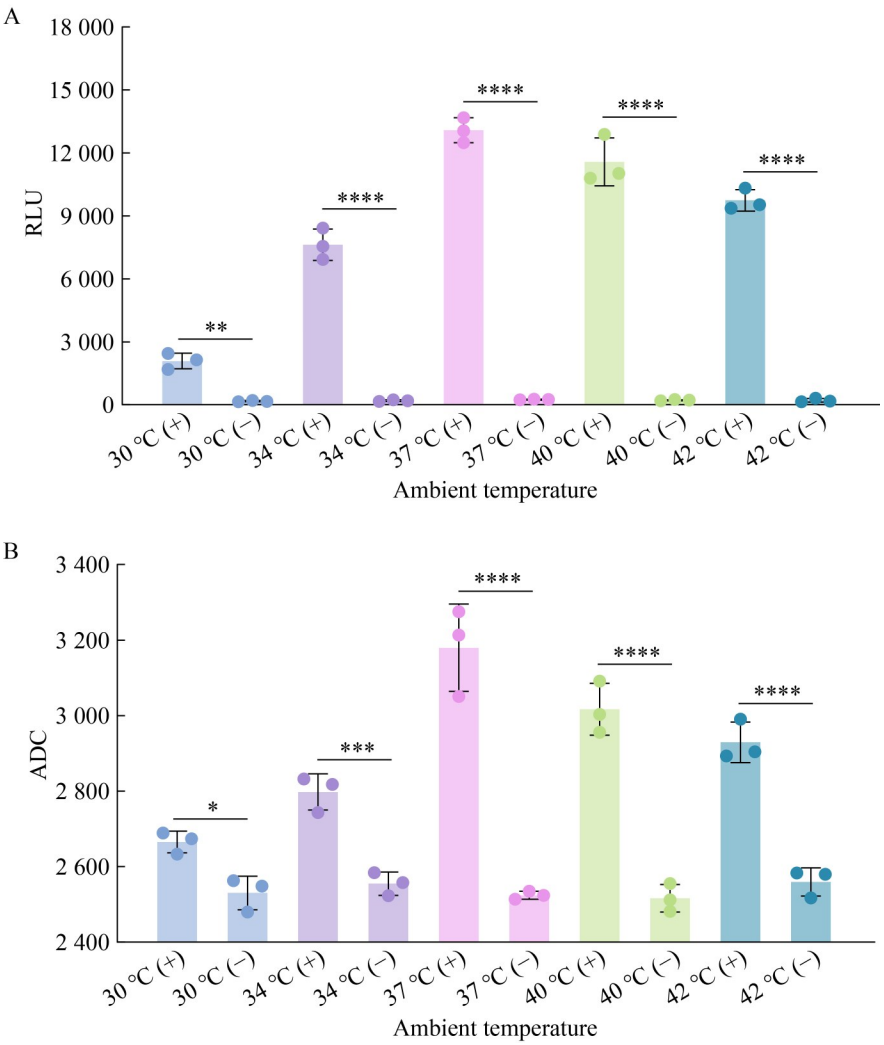


图11　在不同环境温度下的检测结果

Figure 11　Detection results at different ambient temperatures. A: Detection results read by microplate reader; B: Detection results read by portable optoelectronic biosensor. The plus sign (+) represents the experimental group with the target DNA added, and the minus sign (−) represents the negative control group using ddH_2O as the detection target. ****: P<0.000 1; ***: P<0.001; **: P<0.01; *: P<0.05.

特异性，与肠沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌等其他常见细菌均无交叉反应。

综上所述，本研究建立的金黄色葡萄球菌检测方法整合了 RPA 等温扩增、CRISPR/dCas9 特异性识别与 NanoBiT 生物发光信号输出技术，具有高灵敏度、高特异性、便携式、低成本等综合优势，在资源有限环境中的现场快速检测领域展现出广阔的应用前景。本研究在 van der Veer 等[20]提出的 LUNAS 体系基础上，进一步拓展至金黄色葡萄球菌检测，并结合自制便携式光电生物传感器实现现场信号读取。相比以往研究中使用的数码相机，本研究使用的便携式光电生物传感器更加小型化、便携化且成本低廉。通过固定检测时间与检测阈值的判定标准，本方法可获得稳定可靠的检测结果，更适

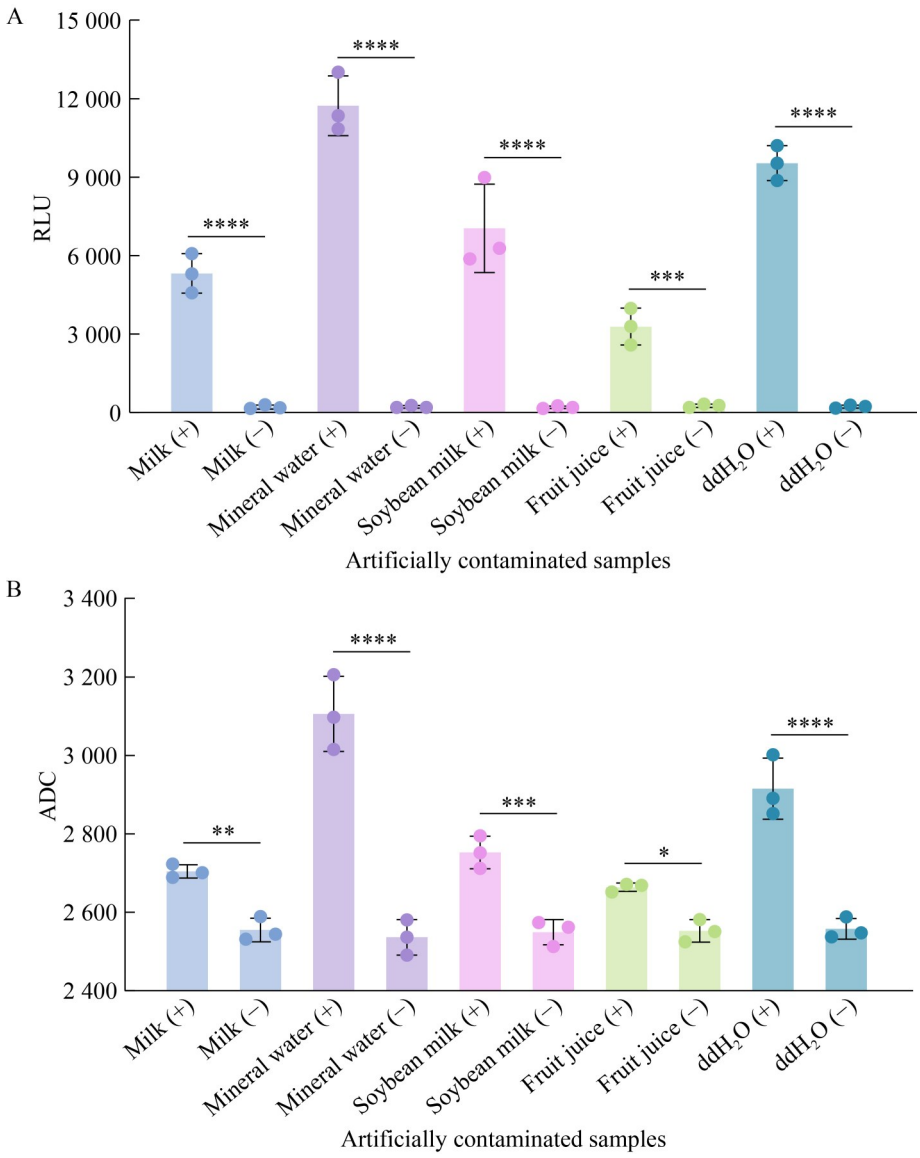


图12　对于不同人工污染样品的检测结果

Figure 12　Detection results for different artificially contaminated samples. A: Detection results read by microplate reader; B: Detection results read by portable optoelectronic biosensor. The plus sign (+) represents the experimental group with the target bacteria added, and the minus sign (−) represents the negative control group using ddH_2O as the detection target. ****: P<0.000 1; ***: P<0.001; **: P<0.01; *: P<0.05.

表2　不同检测方法对比

Table 2　Comparison of different detection methods

Methods	Detection time	Limit of detection	Equipment requirements
qPCR	1.5−2 h	10^1−10^2 copies/μL	Real-time fluorescent PCR instrument
LAMP	45−60 min	10^2 copies/μL	Constant temperature equipment
CRISPR/Cas12a (fluorescence)	40−60 min	10^1 copies/μL	Fluorescence detection equipment
This research	<1 h	10^2 copies/μL	Portable photoelectric sensor

用于 POCT 场景。

然而，本研究开发的检测方法在实际应用时仍存在一定局限性，与当前绝大多数细菌核酸检测方法相似，本方法在检测前需从样本中提取核酸。金黄色葡萄球菌作为一种革兰氏阳性菌，其由肽聚糖和磷壁酸组成的细胞壁结构较为复杂且致密[29]，这一特性显著增加了对其基因组 DNA 进行快速提取的难度，通常需要额外借助离心机、细胞破碎仪或溶菌酶等辅助设备或试剂。这一前处理环节的复杂性在一定程度上制约了该方法在更多即时检测场景下的直接应用。因此，未来研究的重点应聚焦于样本快速预处理技术的优化与整合，通过开发简便、高效的核酸释放策略，与本研究建立的检测体系实现无缝对接，以期最终实现对各类潜在污染样本的直接、快速检测，推动该技术向现场即时检测应用的实质性转化。

作者贡献声明

陆沈焌杰：实验设计与操作，数据收集与处理，论文撰写与修改；白桂杰：实验设计与方案优化，协助部分实验操作；王焱乐：协助部分实验操作，参与论文修改；黄鑫：光电生物传感器的设计与配套应用软件的开发；张燕宁：协助部分实验操作；刘夺：论文审阅和修改，研究项目管理与监督，提供基金支持；王汉杰：论文审阅和修改，研究项目管理与监督，提供基金支持。

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] Rossi GAM, Pereira JG, Nitschke M. Epidemiology, prevention and control of foodborne microbial pathogens[J]. Microorganisms, 2025, 13(7): 1435.

[2] Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(4): 815-836.

[3] Dos Santos Emiliano JV, Fusieger A, Camargo AC, da Cruz Rodrigues FF, Nero LA, Perrone ÍT, de Carvalho AF. *Staphylococcus aureus*in dairy industry: enterotoxin production, biofilm formation, and use of lactic acid bacteria for its biocontrol[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2024, 21(10): 601-616.

[4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物检验 金黄色葡萄球菌检验: GB 4789.10—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, National Medical Products Administration. National food safety standard—Food microbiological examination: Staphylococcus aureus GB 4789.10—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese).

[5] Ye YX, Li LL, Chen YY, Li BB, Xu ZS. Molecular methods for rapid detection and identification of foodborne pathogenic bacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2025, 41(5): 175.

[6] Umesha S, Manukumar HM. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: current applications and future challenges[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(1): 84-104.

[7] Štěpán J, Pantůček R, Doškař J. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci[J]. Folia Microbiologica, 2004, 49(4): 353-386.

[8] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR III, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(1): 165-256.

[9] MacKay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2004, 10(3): 190-212.

[10] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.

[11] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.

[12] Guo W, Guo YQ, Xu H, Li C, Zhang XN, Zou XB, Sun ZB. Ultrasensitive "on-off" ratiometric fluorescence biosensor based on RPA-CRISPR/Cas12a for detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(3): 2167-2173.

[13] Li YN, Shi ZL, Hu AZ, Cui JS, Yang K, Liu Y, Deng GQ, Zhu CC, Zhu L. Rapid one-tube RPA-CRISPR/Cas12 detection platform for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Diagnostics, 2022, 12(4): 829.

[14] Liu YJ, Liu H, Yu GL, Sun WB, Aizaz M, Yang GW, Chen L. One-tube RPA-CRISPR Cas12a/Cas13a rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1278: 341757.

[15] Yeh HW, Ai HW. Development and applications of bioluminescent and chemiluminescent reporters and biosensors[J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2019, 12: 129-150.

[16] Engelen W, van de Wiel KM, Meijer LHH, Saha B, Merkx M. Nucleic acid detection using BRET-beacons based on bioluminescent protein-DNA hybrids[J]. Chemical Communications, 2017, 53(19): 2862-2865.
[17] Zhang YH, Qian L, Wei WJ, Wang Y, Wang BN, Lin PP, Liu WC, Xu LZ, Li X, Liu DM, Cheng SD, Li JF, Ye YX, Li H, Zhang XH, Dong YM, Zhao XJ, Liu CH, Zhang HM, Ouyang Q, et al. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(2): 211-216.
[18] England CG, Ehlerding EB, Cai WB. NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence[J]. Bioconjugate Chemistry, 2016, 27(5): 1175-1187.
[19] Dixon AS, Schwinn MK, Hall MP, Zimmerman K, Otto P, Lubben TH, Butler BL, Binkowski BF, Machleidt T, Kirkland TA, Wood MG, Eggers CT, Encell LP, Wood KV. NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells[J]. ACS Chemical Biology, 2016, 11(2): 400-408.
[20] Van der Veer HJ, van Aalen EA, Michielsen CMS, Hanckmann ETL, Deckers J, van Borren MMGJ, Flipse J, Loonen AJM, Schoeber JPH, Merkx M. Glow-in-the-dark infectious disease diagnostics using CRISPR-Cas9-based split luciferase complementation[J]. ACS Central Science, 2023, 9(4): 657-667.
[21] Zhang XY, Feng ZJ, Li HX, Yang HY, Li LY, Zhang C, Dai PX, Wang HX, Xue HM, Wang YX, Sun DW, Liu XY, Li MS, Lu S, Liu J, Du TF, Liu D, Wang HJ. Ingestible optoelectronic capsules enable bidirectional communication with engineered microbes for controllable therapeutic interventions[J]. Nature Microbiology, 2025, 10(8): 1841-1853.
[22] Nath N, Flemming R, Godat B, Urh M. Development of NanoLuc bridging immunoassay for detection of anti-drug antibodies[J]. Journal of Immunological Methods, 2017, 450: 17-26.
[23] Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe[J]. Eurosurveillance, 2010, 15(41): 19688.
[24] Chen H, Liu KK, Li Z, Wang P. Point of care testing for infectious diseases[J]. Clinica Chimica Acta, 2019, 493: 138-147.
[25] Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory[J]. Clinica Chimica Acta, 2006, 363(1/2): 206-220.
[26] Choi JR, Yong KW, Choi JY, Cowie AC. Emerging point-of-care technologies for food safety analysis[J]. Sensors, 2019, 19(4): 817.
[27] Liu Y, Zhang J, Ji YD. PCR-based approaches for the detection of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. The Open Microbiology Journal, 2016, 10(1): 45-56.
[28] Zhang ZH, Liu WT, Xu HY, Aguilar ZP, Shah NP, Wei H. Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(3): 1625-1633.
[29] Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(14): 7602.