

实验技术与方法

重组酶介导的等温扩增技术联合 CRISPR-Cas13a 快速检测 4 种腹泻病原菌

安柏霖^{1,3}, 苏璇^{1,3}, 郭悦⁴, 王祥喜^{1,5}, 葛以跃², 朱凤才², 崔仑标²

- (1. 南开大学药学院, 天津 300000; 2. 江苏省疾病预防控制中心, 国家卫生健康委员会肠道病原微生物重点实验室, 江苏南京 210009; 3. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300000; 4. 南京医科大学, 江苏南京 210029; 5. 中国科学院生物物理所, 北京 100101)

摘要:目的 重组酶介导的等温扩增技术(RAA)联合规律间隔性成簇短回文重复序列相关 Cas13a 蛋白(CRISPR-Cas13a), 建立对沙门菌、志贺菌、霍乱弧菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 4 种腹泻病原菌的快速分子检测方法, 即 RAA-Cas13a。方法 设计 4 种腹泻病原菌的 RAA 特异性引物和 CRISPR RNA(crRNA), 利用 RAA 技术扩增样本核酸, 并进行 CRISPR-Cas13a 恒温荧光检测, 以实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)为对照方法, 评价 RAA-Cas13a 优化方法的灵敏度与特异性。结果 RAA-Cas13a 方法可在 35 min 内完成检测。检测志贺菌、霍乱弧菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的最低检测限为 10 copies/ μ L, 沙门菌最低检测限为 1 copy/ μ L; 特异性实验表明每一种病原菌与其余 10 种对照细菌均无交叉反应。应用建立的方法检测 200 份实际样本和 40 份人工污染样本, 结果表明同 RT-qPCR 检测结果一致性高(分别为 Kappa=0.927 和 Kappa=1.000)。结论 RAA-Cas13a 检测方法具有灵敏度高, 特异性强等优点, 能用于 4 种腹泻病原菌的快速检测。

关键词: 重组酶介导的等温扩增技术; CRISPR-Cas13a; 腹泻病原菌; 快速分子检测

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)03-0381-09

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.03.010

Rapid detection of four diarrheal bacteria by CRISPR-Cas13a combined with recombinase aided amplification

AN Bailin^{1,3}, SU Xuan^{1,3}, GUO Yue⁴, WANG Xiangxi^{1,5}, GE Yiyue², ZHU Fengcai², CUI Lunbiao²

- (1. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300000, China; 2. NHC Key Laboratory of Enteric Pathogen Microbiology, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nanjing 210009, China; 3. Tianjin International Biomedical Joint Research Institute, Tianjin 300000, China; 4. Nanjing Medical University, Jiangsu Nanjing 210029, China; 5. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Objective To establish a rapid, sensitive and specific detection method for 4 diarrheal bacteria (*Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholera* and *Escherichia coli* O157:H7) by the Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 13a (CRISPR-Cas13a) combined with recombinant enzyme-mediated isothermal amplification (RAA), called RAA-Cas13a. **Methods** In this study, the specific primer for RAA and CRISPR RNA (crRNA) of 4 different diarrheal bacteria were designed. The sample nucleic acids were amplified by RAA, and the amplification products were then detected with CRISPR-Cas13a. Compared with real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), the sensitivity and specificity of the RAA-Cas13a method were evaluated. **Results** The established RAA-Cas13a detection method for *Shigella*, *Vibrio cholera* and *Escherichia coli* O157:H7 had the detection limit of 10 copies/ μ L, the detection limit for *Salmonella* was 1 copy/ μ L, and each bacteria did not have cross-reaction with the other ten bacteria. Meantime, the detection of the RT-qPCR and RAA-Cas13a were highly consistent in 200 suspected samples and 40 artificial simulation samples (Kappa=0.927 and 1.000, respectively). **Conclusion** The established RAA-Cas13a detection method has the advantages of high sensitivity and strong specificity. It can quickly detect and screen diarrheal diseases

收稿日期: 2022-10-12

作者简介: 安柏霖 男 硕士研究生 研究方向为新型分子诊断技术与病原体基因组分析 E-mail: 1315816788@qq.com

通信作者: 崔仑标 男 教授 研究方向为病原微生物和新发传染病的监测及分子诊断技术研究 E-mail: lbcul@jscdc.cn

caused by 4 pathogenic bacteria.

Key words: Recombinase aided amplification; CRISPR-Cas13a; diarrheal bacteria; molecular detection

食源性疾病是威胁人类健康和造成死亡的主要原因之一,给医疗卫生事业带来了沉重负担。据统计,腹泻病原菌是引起食源性疾病的常见病因,其中沙门菌(*Salmonella*)^[1-2]、志贺菌(*Shigella* spp.)^[3-5]、大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)^[6-8]、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)^[9-11]的感染率高、致病力强,在全球多次引发严重的食品安全事件。目前,常规食源性致病菌和腹泻病原菌检测方法均包含分离培养、生化试验、血清学鉴定试验和聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)确认试验等。相较于传统的生化培养方法,分子检测法避免了耗时长、步骤繁杂、检出率低等情况,常用于疾病暴发事件快速筛查。常用的分子检测法有普通 PCR、多重 PCR(Multiplex PCR)、实时荧光定量 PCR(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)、数字 PCR(Digital PCR, dPCR)等。其中,RT-qPCR 作为病原菌检测方法的“金标准”,具有较高的灵敏度和特异性,广泛应用于医院、疾病预防控制系统和第三方检测机构;但 RT-qPCR 方法要求昂贵精密的仪器设备,且操作复杂,依赖于专业人员,不适用于基层实验室。

近年的研究发现,规律间隔性成簇短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)相关蛋白(CRISPR-associated proteins, CRISPR-Cas)如 Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(C2c1)、Cas13a(C2c2)均有附带切割活性,即在 CRISPR RNA(crRNA)引导下识别特定靶标后,激活其核酸酶活性可对非特异核酸片段进行切割^[12-13]。CRISPR-Cas13a 蛋白有两个催化位点,在 crRNA 的引导下与靶标 RNA 产生特异性结合,形成 CRISPR-Cas13a-crRNA-RNA 三元复合体,从而转化为一种核糖核酸酶^[14],进行非特异性切割靶标 RNA 处于反式的 ssRNA^[15-16];这种附带切割活性在反应体系中加入类似荧光 PCR 的报告探针后可放大检测信号,实现对特定靶标的实时检测^[17-19]。但是,仅依靠 Cas 蛋白的切割活性检测实际样本存在敏感度不足、耗时长等问题^[20-22],目前主要的解决方法是与核酸扩增技术联合,其中最具代表性的是将重组酶聚合酶等温扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)技术与 CRISPR-Cas13a 相结合建立了特异性高灵敏度酶促解锁(Specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, SHERLOCK)^[23]检测技术,SHERLOCK 具有灵敏度高、特异性强等特点,这为开发病原体核酸检测技术提供了新的方向。

重组酶介导的等温扩增(Recombinase aided amplification, RAA)技术是国内自主研发的一种等温扩增技术,扩增效果和原理与 RPA 相似。本研究基于 RAA 恒温扩增技术,结合 crRNA 和 CRISPR-Cas13a 蛋白对靶标片段进行特异性切割,进而实现荧光检测信号的指数放大,并以此首次建立了针对 4 种常见腹泻病原菌(沙门菌、志贺菌、霍乱弧菌 O1 群和 O139 群、肠出血性大肠杆菌 O157:H7)的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和样本

本实验使用的标准菌株和实验室分离菌株共 18 株均保存于本实验室,具体信息如下:沙门菌(*Salmonella dublin*)(标准菌株 CMCC50761)、肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*)(实验室分离株, JSCC10224, JSCC10223)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)(标准菌株, CMCC51572)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)(实验室分离株, JSCC50030, JSCC50029)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)(标准菌株, CICC23795)、霍乱弧菌 O1 群和 O139 群(*Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139)(实验室分离株, JSCC00030, JSCC00020)、肠出血性大肠杆菌埃希氏菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)(标准菌株, ATCC43888)、肠出血性大肠杆菌埃希氏菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)(实验室分离株, JSCC30010)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)(实验室分离株, JSCC65001)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)(实验室分离株, JSCC43002)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)(实验室分离株, JSCC30103)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)(实验室分离株, JSCC56001)、小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)(实验室分离株, JSCC23002)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)(实验室分离株, JSCC36005)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)(实验室分离株, JSCC70101)。所有菌株均通过生化鉴定仪、质谱仪进行菌种鉴定。

200 份样本(患者粪便 145 份,动物粪便 36 份,食物 19 份)来自于江苏省肠道传染病监测、食品安全风险监测网以及江苏省疾病预防控制中心菌种保藏中心,用于方法学的实际样本验证。

1. 1. 2 主要仪器与试剂

Cas13a 蛋白(本实验室制备^[24-25]), RAA 检测试剂盒(江苏奇天基因生物科技有限公司), T7 RNA Polymerase、Recombinant RNase Inhibitor、Recombinant DNase I、LA Taq PCR、100 mmol/L ATP、GTP、UTP、CTP、Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)(宝生物工程大连有限公司), 全自动核酸提取仪及配套试剂(西安天隆科技有限公司), TIANamp Genomic DNA Kit(天根生化科技有限公司), 柱式 RNA 快速浓缩纯化试剂盒、Hepes Solution 1M、MgCl₂ 25 mmol/L(生工生物工程上海有限公司), LB 肉汤培养基(广东环凯微生物科技有限公司), Qubit dsDNA BR Assay、Qubit ssRNA BR Assay(美国 Invitrogen), B6100 恒温振荡混匀仪、F1620 荧光检测仪(江苏奇天基因生物科技有限公司), LightCycler 2.0 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Roche), Qubit 2.0 仪(美国 Invitrogen)。

1. 2 方法

1. 2. 1 样本前处理方法和细菌 DNA 的提取

收集的患者和动物粪便实际样本分装于收集管, 具体步骤如下: 称取 0. 2 g 粪便加入 1 mL 的 PBS 缓冲液(pH 7. 4, 浓度 0. 01 mol/L), 涡旋振荡 2 min, 500 r/min 转速离心 5 min(离心半径: 8. 80 cm), 取上清液; 重复步骤 2 次, 将全部上清液 5 000 r/min 离心 10 min(离心半径: 8. 80 cm), 弃上清备用。

食物样本(肉与肉制品)制备: 用 0. 9% 氯化钠水溶液清洗样本 3 次, 并用无菌剪刀剪碎, 称取 0. 1 g, 打碎处理为细胞悬液, 10 000 r/min 离心 1 min

(离心半径: 8. 80 cm), 弃上清^[26], 加入 200 μL 缓冲液 GA, 振荡至彻底悬浮备用。

本实验的细菌菌株接种于 3 mL LB 培养基, 37 °C 220 r/min 摇床过夜培养。所得菌液和实际粪便样本使用 DNA/RNA 提取试剂盒(磁珠法), 首先在提取深孔板中加入蛋白酶 K 溶液 20 μL, 然后取 200 μL 待提取样本加入其中, 完成后设置细菌核酸提取程序, 提取细菌基因组 DNA。食品样本(肉类)核酸提取根据 TIANamp Genomic DNA 提取试剂盒使用说明书进行, 所得核酸储存于 -80 °C 备用。

1. 2. 2 引物设计及 crRNA 制备

针对沙门菌 *invA* 基因、志贺菌 *ipaH* 基因、大肠杆菌 O157: H7 *rfbE* 基因、霍乱弧菌 *ctx* 基因, 从 GenBank 检索各腹泻病原菌特异基因的 DNA 序列, 并选择保守的序列区域用 Primer 5 软件设计 RAA 扩增引物, 同时使用 Primer-BLAST 软件验证引物序列的特异性。设计各细菌 crRNA 转录模板序列添加 T7 启动子序列(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')。CrRNA 转录模板(浓度 70 μmol/L)加入 T7 RNA 聚合酶进行退火结合(42 °C 2 h), 随后使用 Recombinant DNase I 进行残余核酸降解(37 °C 1 h, 80 °C 2 min), 体外转录制备的 crRNA 产物利用柱式 RNA 快速浓缩纯化试剂盒进行纯化, 并使用 Qubit 2. 0 仪和 Qubit ssRNA BR Assay 试剂盒进行 RNA 含量测定。本研究的 RAA 引物及 RNA 报告探针均由生工生物工程上海有限公司合成, 具体信息见表 1。

表 1 RAA 引物、crRNA 和 RNA 报告探针序列

Table 1 Sequences of RAA primers, crRNA and RNA reporter probe

病原菌	引物/探针名称	序列(5'-3')	片段长度/bp
沙门菌: <i>invA</i>	<i>invA</i> -RAA-F	TGTTGCTTCTCTATTGTCACCGTGCTCCAG	
	<i>invA</i> -RAA-R	TAATACGACTCACTATAGGGTACCGGGCATAACCATCCAGAGAAAATCGGGCCGC	127
	<i>invA</i> -crRNA	GACACGTTCTGAACCTTTGGTAATAACGGTTTTAGTCCCCTTCGTTTTTGGGGTACTCTAAAT	
志贺菌: <i>ipaH</i>	<i>ipaH</i> -RAA-F	CGATAATGATAACCGGCTCTGCTCTCCCTG	
	<i>ipaH</i> -RAA-R	TAATACGACTCACTATAGGGCTGAAGTTTCTCTGCGAGCATGGTCTGGAAG	177
	<i>ipaH</i> -crRNA	TATCTCATCCACAAAATGGAGAGTCTGTTTTAGTCCCCTTCGTTTTTGGGGTACTCTAAAT	
大肠杆菌 O157: H7: <i>rfbE</i>	<i>rfbE</i> -RAA-F	TCTAATTGAAGATTGCGCTGAAGCCTTTGG	
	<i>rfbE</i> -RAA-R	TAATACGACTCACTATAGGGTATGTACAGCTAATCCTTGGCCTTTAAAATG	217
	<i>rfbE</i> -crRNA	TTCACCTGTAGTAATAGTTTTATTCCAGTTTTAGTCCCCTTCGTTTTTGGGGTACTCTAAAT	
霍乱弧菌: <i>ctx</i>	<i>ctx</i> -RAA-F	TAAAGCAGTCAGGTGGTCTTATGCCAAGAGG	
	<i>ctx</i> -RAA-R	TAATACGACTCACTATAGGGTGGGTGCAGTGGCTATAACATATATATAATAAG	251
	<i>ctx</i> -crRNA	TCAAACCTAATTGAGGTGGAACATATCCGTTTTAGTCCCCTTCGTTTTTGGGGTACTCTAAAT	
—	RNA-probe	FAM-TrU _r U _r U _r U _r U _r C-BHQ1 ^a	—

注: ^a表示 RNA-probe 中 r 代表对应碱基为核糖核苷; 参考 GenBank 中菌株的基因序列, 设计沙门菌 *invA*(登录号: CP082595)、志贺菌 *ipaH*(登录号: CP054913)、大肠杆菌 O157: H7 *rfbE*(登录号: CP039834)、霍乱弧菌 *ctx*(登录号: CP046837)引物

1. 2. 3 RAA 扩增体系

参照 RAA 检测试剂盒说明书配置 50 μL RAA 扩增体系: 冻干粉的基础反应单元管中依次加入 2× 基础缓冲液 25 μL、RAA 正反向引物(表 1)各 0. 5 μL

(终浓度分别为 0. 24、0. 48、0. 72、0. 96 μmol/L), RNase free ddH₂O 19. 5 μL, 混匀后在管盖上加入细菌 DNA 样本 2 μL, 在管壁上加入乙酸镁溶液 2. 5 μL, 把反应管放入 B6100 恒温振荡混匀仪中恒温混匀, 于

37℃、39℃和40℃条件下反应10~60 min。

1.2.4 CRISPR-Cas13a检测体系

CRISPR-Cas13a检测体系:5×缓冲液5 μL(终浓度20 mmol/L HEPES,60 mmol/L NaCl,6 mmol/L MgCl₂,pH 6.8),25 mmol/L NTP mix 1 μL,Recombinant RNase Inhibitor 0.5 μL,1.2 μmol/L crRNA 0.6 μL,10 μmol/L RNA-probe 0.5 μL,1 μmol/L CRISPR-Cas13a 1 μL,T7 RNA Polymerase 0.3 μL,用RNase free ddH₂O补足体积至23 μL,加入RAA产物2 μL,混匀后置于F1620荧光检测仪中,在39℃条件检测40 min。

1.2.5 RAA-Cas13a的灵敏度和特异性试验

使用RAA引物对4种腹泻病原菌的核酸进行扩增,完成后对扩增产物进行纯化。使用Qubit dsDNA BR assay定量试剂盒对纯化产物进行定量。采用以下公式确定dsDNA的拷贝数^[27]: $\{[6.02 \times 10^{14} \times \text{dsDNA 浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9}]\} / [660 \times \text{对应 DNA 长度}]$,用RNase free ddH₂O制备4种病原菌定量后的dsDNA标准品(10⁷~10⁻¹ copies/μL)备用。采用

单因素筛选试验优化引物浓度、反应温度、RAA扩增时间、CRISPR检测时间4个影响因素,并评价优化的RAA-Cas13a方法的灵敏度,实验重复3次。特异性实验以建立的RAA-Cas13a方法分别对每种腹泻病原菌和其余10种细菌对照菌株(沙门菌、志贺菌、大肠杆菌O157:H7、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、粪肠球菌、副溶血性弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌、空肠弯曲菌、创伤弧菌)进行检测,实验重复3次。

1.2.6 与RT-qPCR检测结果的一致性比较

200份实际样本分别使用RT-qPCR和RAA-Cas13a方法进行检测,并比较两种方法对实际样本的检测结果。4种腹泻病原菌RT-qPCR引物和荧光探针均由生工生物工程上海有限公司合成,具体信息见表2。RT-qPCR(10 μL):Premix Ex Taq 5 μL,上下游引物和荧光探针各0.2 μL,DNA(模板)2 μL,ddH₂O 2.4 μL。RT-qPCR反应程序:95℃2 min;95℃5 s,60℃20 s,45个循环;25℃2 min。

表2 RT-qPCR引物和荧光探针序列

Table 2 Sequences of RT-qPCR primers and fluorescence probe

病原菌	引物/探针名称	序列(5'-3')	片段长度/bp
沙门菌: <i>invA</i> ^[28]	<i>invA</i> -F	GTGAAATAATCGCCA CGTCGGGCAA	285
	<i>invA</i> -R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
	<i>invA</i> -P	FAM-TTATTGCGGATAGCCTGGCGTGGGTTTTGTTG-TAMRA	
志贺菌: <i>ipaH</i> ^[29]	<i>ipaH</i> -F	GAACTCAAATCTTGCACCATTCA	107
	<i>ipaH</i> -R	CGTCCGTCGAGAACAAATTAAG	
	<i>ipaH</i> -P	Cy5-ATCCCCGACACCGTTTGTGAGTTTCACT-BHQ-3	
大肠杆菌O157:H7: <i>stxI</i> ^[29]	<i>stxI</i> -F	CTTCCATCTGCCGGACACATA	87
	<i>stxI</i> -R	ATTAATACTGAATTGTCATCATCATGCAT	
	<i>stxI</i> -P	ROX-AAGGAAACTCATCAGATGCCATTTCTGGCA-BHQ-2	
霍乱弧菌: <i>toxR</i> ^[30]	<i>toxR</i> -F	GTTTGGCGAGAGCAAGGTTT	165
	<i>toxR</i> -R	TCTCTTCTCAACCGTTTCCA	
	<i>toxR</i> -P	FAM-CGCAGAGTCGAAATGGCTTGG-MGB	

1.2.7 人工污染模拟实验

使用霍乱弧菌标准菌株接种于固体平板37℃培养16 h,挑取单菌落,用0.9%氯化钠水溶液配制菌液(浓度1×10⁵ CFU/mL和1×10³ CFU/mL)。使用本实验室保存的健康人粪便和本实验的粪便样品前处理方法制备粪便标本20份;将两种浓度水平的菌液和粪便标本进行1:1混匀,然后置于37℃震荡培养6 h得到20份粪便模拟标本,同时设置对应未染菌粪便标本20份作为阴性对照^[31-32]。粪便标本核酸使用DNA/RNA提取试剂盒提取,并对RAA-Cas13a与RT-qPCR两种检测方法结果对比。

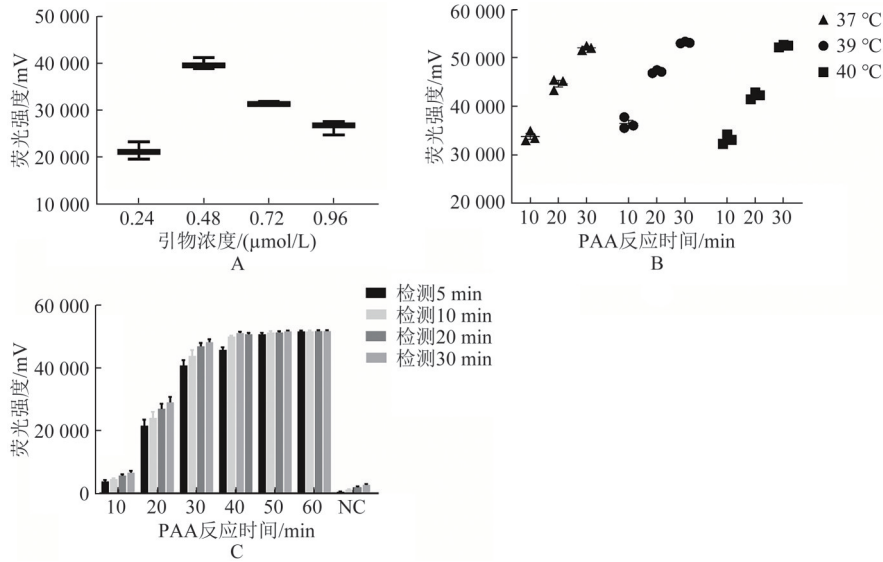
1.3 统计学分析

使用SPSS 24.0软件进行统计学分析。计量资料使用*t*检验,计数资料使用配对χ²检验(McNemar检验),当双尾*P*<0.05判定差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAA-Cas13a检测方法的建立

以CRISPR-Cas13a检测最短时间出现最强荧光信号为准则,对RAA引物浓度、反应时间和时间、检测时间进行筛选优化。以沙门菌为例,使用dsDNA标准品进行RAA-Cas13a方法学建立,在RAA引物浓度为0.48 μmol/L、反应温度为39℃、反应时间为30 min时,CRISPR-Cas13a检测扩增产物在5 min时即可出现最强信号(图1A),确定最优引物浓度为0.48 μmol/L。不同RAA反应温度(37℃、39℃和40℃)结果显示,39℃条件下检测信号最高(图1B),确定最优RAA反应温度为39℃。RAA反应时间及CRISPR-Cas13a检测时间结果显示CRISPR-Cas13a在5 min即可对RAA反应30 min的产物进行检测(图1C)。所以确定RAA-Cas13a检测最优



注:A为RAA引物浓度优化;B为RAA反应温度优化;C为RAA-Cas13a检测时间优化;检测5、10、20、30 min表示RAA-Cas13a方法检测时间;NC:阴性对照组(ddH₂O);误差线表示平均数±标准差,其中n=3,n为试验次数

图1 RAA-Cas13a检测单因素筛选结果

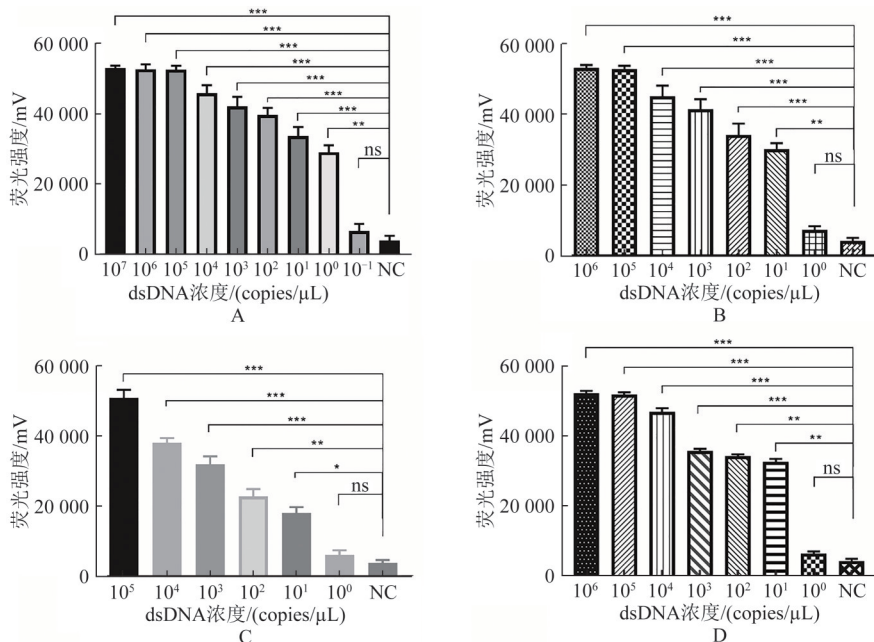
Figure 1 Single factor screening results of RAA-Cas13a detection

反应条件如下:RAA 引物浓度为 0.48 μmol/L,RAA 反应温度为 39 °C,RAA 反应时间为 30 min,CRISPR-Cas13a 检测时间为 5 min。其余 3 种细菌最优反应条件与沙门菌类似。

2.2 RAA-Cas13a 灵敏度试验

2.1 中建立的 RAA-Cas13a 方法对 4 种腹泻病原菌不同梯度稀释的 dsDNA 标准品进行检测,见图 2。结果显示,沙门菌 dsDNA 标准品 1 copy/μL

与阴性对照组(ddH₂O)检测荧光值具有显著性差异($P < 0.01$),确定沙门菌最低检测限为 1 copy/μL(图 2A);志贺菌 dsDNA 标准品 10 copies/μL 与阴性对照组(ddH₂O)检测荧光值具有显著性差异($P < 0.01$),确定志贺菌最低检测限为 10 copies/μL(图 2B);霍乱弧菌 dsDNA 标准品 10 copies/μL 与阴性对照组(ddH₂O)检测荧光值具有显著性差异($P < 0.05$),确定霍乱弧菌最低检测限为 10 copies/μL(图 2C);



注:A为沙门菌的dsDNA标准品(10⁷~10⁻¹ copies/μL);B为志贺菌的dsDNA标准品(10⁶~10⁰ copies/μL);C为霍乱弧菌的dsDNA标准品(10⁵~10⁰ copies/μL);D为大肠杆菌O157:H7的dsDNA标准品(10⁶~10⁰ copies/μL);NC:阴性对照组(ddH₂O);误差线表示平均数±标准差,其中n=3,n为试验次数;与阴性对照组(NC)比较,*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$,***: $P < 0.001$,ns:没有显著性差异

图2 RAA-Cas13a检测4种腹泻病原菌灵敏度试验

Figure 2 Sensitivity tests of RAA-Cas13a detection for four diarrheal bacteria

大肠杆菌 O157:H7 dsDNA 标准品 10 copies/ μ L 与阴性对照组(ddH₂O)检测荧光值具有显著性差异($P < 0.01$),确定大肠杆菌 O157:H7 最低检测限为 10 copies/ μ L(图 2D)。

2.3 RAA-Cas13a 特异性试验

以建立的 RAA-Cas13a 方法分别对沙门菌、志贺菌、霍乱弧菌、大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、粪肠球菌、副溶血性弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌、空肠弯曲菌及创伤弧菌进行检测。结果显示,建立的不同腹泻病原菌检测方法特异性强,与其余 10 种对照细菌均无交叉反应(图 3)。

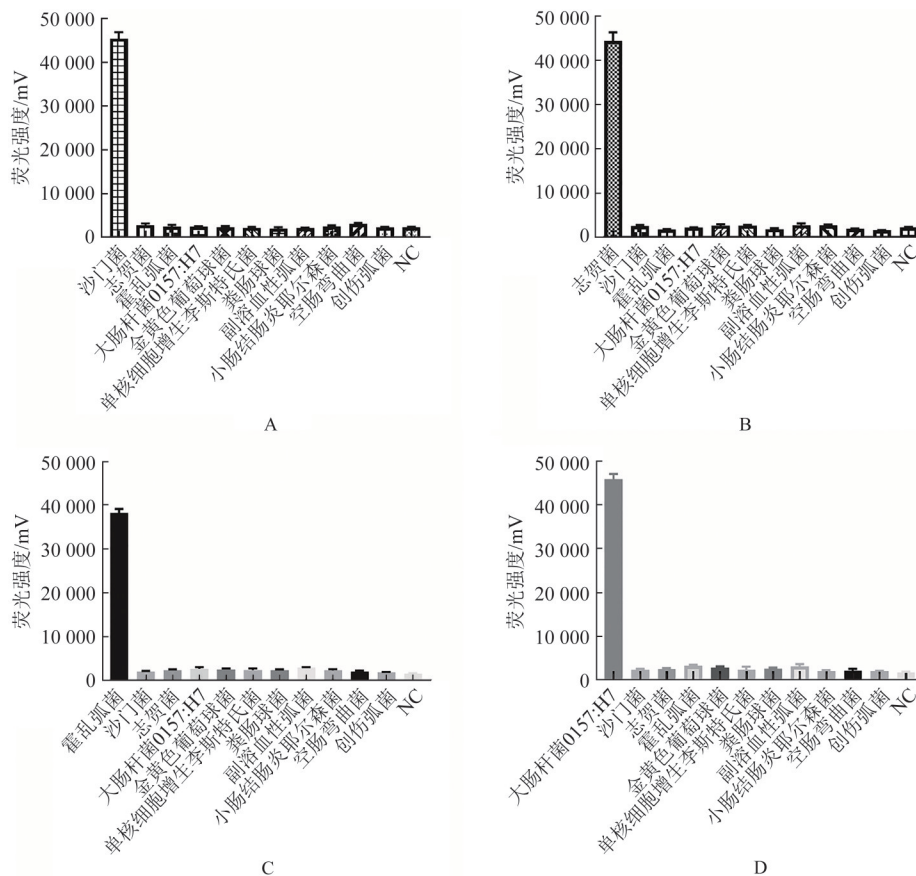
2.4 RAA-Cas13a 与 RT-qPCR 检测结果的一致性比较

提取 200 份实际样本 DNA 核酸,用 RAA-Cas13a 和 RT-qPCR 两种方法分别检测样本中的沙门菌、志贺菌、霍乱弧菌和大肠杆菌 O157:H7。结果显示,RAA-Cas13a 检出沙门菌阳性样本 17 份,阳性率

8.5%;志贺菌阳性样本 18 份,阳性率 9.0%;霍乱弧菌阳性样本 0 份,阳性率 0%;大肠杆菌 O157:H7 阳性样本 6 份,阳性率 3.0%,与 RT-qPCR 相比,可以检测到更低感染量的样本(5 个样本通过 Sanger 测序技术鉴定为对应细菌的阳性样本,表 3)。统计数据表明两种方法的检测差异无统计学意义($P = 0.063$),检测结果具有良好的一致性(Kappa=0.927),不同样本类型的具体信息见表 3,4 种腹泻病原菌检测样本阳性率见表 4。

2.5 人工污染模拟实验

40 份提取的人工模拟粪便样本核酸,利用本实验建立的霍乱弧菌 RAA-Cas13a 方法进行检测,并与 RT-qPCR 方法进行比较。结果显示,20 份粪便模拟标本在两种方法中均显示阳性,20 份阴性对照粪便标本在两种方法均显示阴性。统计分析结果表明两种方法的检测结果的一致性高(Kappa=1.000),霍乱弧菌粪便模拟实验具体信息见表 5。



注:A为沙门菌的特异性试验;B为志贺菌的特异性试验;C为霍乱弧菌的特异性试验;D为大肠杆菌 O157:H7 的特异性试验; NC: 阴性对照组(ddH₂O);误差线表示平均数±标准差,其中n=3,n为试验次数

图3 RAA-Cas13a检测4种腹泻病原菌特异性试验

Figure 3 Specify tests of RAA-Cas13a detection for 4 diarrheal bacteria

3 讨论

近年来,新型核酸等温扩增技术在病原菌快速

检测领域中优势明显,其能在恒定温度下实现特定 DNA 或 RNA 的快速扩增。相较于 PCR 方法,其优

表3 RAA-Cas13a 和 RT-qPCR 检测样本一致性比较
Table 3 Consistency comparison of RAA-Cas13a and RT-qPCR methods test

	RT-qPCR		总数	灵敏度/%(95% CI)	特异性/%(95% CI)	Kappa
	+	-				
患者粪便	+	28	31	100	97.40	0.936
	-	0	114			
动物粪便	+	8	9	100	96.40	0.923
	-	0	27			
食物	+	1	2	100	94.40	0.642
	-	0	17			
总数	37	163	200			

表4 不同病原菌中 RAA-Cas13a 和 RT-qPCR 的阳性率
Table 4 Positive rates of RAA-Cas13a and RT-qPCR in different pathogenic bacteria

细菌类型	RAA-Cas13a/%	RT-qPCR/%
沙门菌	8.5(17/200)	7.5(15/200)
志贺菌	9.0(18/200)	8.5(17/200)
霍乱弧菌	0.0(0/200)	0.0(0/200)
大肠杆菌 O157:H7	3.0(6/200)	2.0(4/200)

点在于灵敏度高、特异性强、可使用便携式恒温仪器进行检测,从而降低了扩增目标产物的仪器要求。其中,RAA/RPA 技术具有引物设计简单、反应温度低、操作简易、检测时间短等特点,在检验检疫、食品安全、环境微生物检测以及体外诊断等领域广泛应用。但是,RPA 试剂依赖进口、价格昂贵;而 RAA 是国内自主研发的新型核酸等温扩增技术,价格合理,扩增效果与 RPA 相当,通常与琼脂凝胶电泳、荧光探针检测方法相结合^[33-35]。然而,凝胶电泳方法有分辨率低、易污染等情况;荧光探针检测方法的报告探针序列较长,3'端及中间段需要进

行特殊修饰,存在设计困难,研发成本较高等问题。

近几年来,利用 CRISPR-Cas 酶的附带切割活性,研究人员实现了对核酸靶标片段的检测。CRISPR-Cas13a 的 crRNAs 靶向性强,设计难度低,仅需 24 个碱基,通过富含尿嘧啶的茎环结构使 Cas13a 蛋白酶构象发生改变,以此切割靶标 RNA;另外,CRISPR-Cas13a 的 RNA 报告探针设计容易,成本合理。但是仅使用 CRISPR 方法直接检测靶标样本灵敏度较低,鉴定耗时长,易受到样本类型的影响^[21-22]。国外 MYHRVOLD C 研究团队^[23]基于 CRISPR-Cas13a 与 RPA 技术相结合建立的 SHERLOCK 平台可以在现场快速的检测患者样本中的寨卡病毒(ZIKV)和登革热病毒(DENV),并且检测限低至 1 copy/ μ L。本实验室前期利用 CRISPR-Cas13a 与 RAA 技术建立了针对金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌的检测方法,其灵敏度高,特异性强,30 min 内完成检测^[24-25]。

表5 RAA-Cas13a 和 RT-qPCR 检测霍乱弧菌粪便模拟样本一致性比较

Table 5 Consistency comparison of RAA-Cas13a and RT-qPCR in detecting *Vibrio cholerae* stool samples

	RT-qPCR		总数	灵敏度/%(95% CI)	特异性/%(95% CI)	Kappa
	+	-				
1 \times 10 ⁵ CFU/mL	+	10	10	100	100	1.000
	-	0	10			
1 \times 10 ³ CFU/mL	+	10	10	100	100	1.000
	-	0	10			
总数	20	20	40			

注: +表示阳性; -表示阴性; CI 表示置信区间

本研究中包含 T7 启动子序列的 RAA 引物,通过 T7 RNA 聚合酶大量扩增靶标片段,提高了检测灵敏性;利用 RAA 对目标片段的指数扩增和 CRISPR 技术对靶标基因的荧光切割信号指数放大,RAA-Cas13a 对 4 种病原菌的检测灵敏度强于 RT-qPCR^[28-30],沙门菌最低检测限可达 1 copy/ μ L,其余 3 种病原菌的检测灵敏度均达到 10 copies/ μ L。本研究方法特异性强,每种病原菌与其余 10 种对照细菌不存在交叉反应。CRISPR-Cas13a 检测步骤简易,温度

条件与 RAA 一致,35 min (RAA 30 min、CRISPR-Cas13a 5 min)内完成检测,相比环介导等温扩增技术和 RT-qPCR 方法用时更短。

在 200 份实际样本的检测中,RAA-Cas13a 方法与 RT-qPCR 一致性高(Kappa=0.927),在 3 种腹泻病原菌中能检测到更低感染量的样本,证明了 RAA-Cas13a 的可靠性;但两种方法均未检测出霍乱弧菌,因此采用人工模拟实验进行回收验证。结果表明,建立的霍乱弧菌 RAA-Cas13a 与 RT-qPCR

检出率一致($Kappa=1.000$),达到了检测要求。本研究的 RAA-Cas13a 方法先进行 RAA 扩增,然后将扩增产物加入 CRISPR-Cas13a 管内进行检测,实验的加样操作容易出现气溶胶污染,为此我们在检测管中覆盖了一层无干扰油性物质,减少了扩增产物的干扰,后续我们将进一步探究整合核酸 RAA 扩增与 CRISPR-Cas13a 检测为单个反应管的方法,以节省操作步骤和避免污染。

综上所述,本研究将 CRISPR-Cas13a 与 RAA 扩增技术相结合,建立了 4 种腹泻病原菌的检测新方法,丰富了 4 种细菌的分子检测方法,同时减少了昂贵热循环仪的使用,为基层实验室和现场检测提供了一个经济、高效、简便的平台。另外,RAA-Cas13a 方法还可为其他病原菌检测方法的研发提供参考。

参考文献

- [1] AUTHORITY E F S, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union one health 2019 zoonoses report [J]. EFSA Journal European Food Safety Authority, 2021, 19(2): e06406.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella [EB/OL]. (2021-10-23)[2022-02-02]. <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>.
- [3] KHALIL I A, TROEGER C, BLACKER B F, et al. Morbidity and mortality due to shigella and *Enterotoxigenic Escherichia coli* diarrhoea: The Global Burden of Disease Study 1990-2016 [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2018, 18(11): 1229-1240.
- [4] 黄永亮, 杨天佑. 一起福氏志贺菌 X 变种暴发流行的病原学鉴定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 646-647.
HUANG Y L, YANG T Y. Etiological Identification of an Outbreak of *Shigella flexneri* Variation X [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2011, 21(3): 646-647.
- [5] 赵怀龙, 付留杰, 唐功臣. 我国主要的食源性致病菌 [J]. 医学动物防制, 2012, 28(11): 1212-1216.
ZHAO H L, FU L J, TANG G C. Main foodborne pathogenic bacteria in my country [J]. Medical Animal Control, 2012, 28(11): 1212-1216.
- [6] TARRPI, GORDON C A, CHANDLER W L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome [J]. Lancet: London, England, 2005, 365(9464): 1073-1086.
- [7] 詹初航. 为了明天的食品更安全: 陈君石教授谈我国食品安全的现状问题 [J]. 中国卫生, 2004(3): 32-34.
ZHAN C H. For safer food tomorrow: Professor Chen Junshi talks about the current situation of food safety in my country [J]. China Health, 2004(3): 32-34.
- [8] 王燕, 谢贵林, 杜琳. 大肠杆菌 O157:H7 感染流行概况 [J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(1): 51-58.
WANG Y, XIE G L, DU L. Epidemiological situation of *Escherichia coli* O157:H7 infection [J]. Advances in Microbiology and Immunology, 2008, 36(1): 51-58.
- [9] ALI M, NELSON A R, LOPEZ A L, et al. Updated global burden of cholera in endemic countries [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2015, 9(6): e0003832.
- [10] World Health Organization. Cholera Annual Report 2019. Weekly Epidemiological Record 31 September [J]. 2020, 95(38): 441-448.
- [11] 逢波, 阙颀. 新中国的霍乱防控 [J]. 疾病监测, 2021, 36(9): 869-872.
PANG B, KAN B. Cholera prevention and control in New China [J]. Disease Surveillance, 2021, 36(9): 869-872.
- [12] MAKAROVA K S, KOONIN E V. Evolution and classification of CRISPR-Cas systems and Cas protein families [M]. Springer Berlin Heidelberg: CRISPR-Cas Systems, 2013: 341-381.
- [13] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL M R, BURSTEIN D, et al. RNA targeting by functionally orthogonal type VI-A CRISPR-Cas enzymes [J]. Molecular Cell, 2017, 66(3): 373-383.
- [14] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL M R, KNIGHT S C, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. Nature, 2016, 538(7624): 270-273.
- [15] KNOTT G J, EAST-SELETSKY A, COFSKY J C, et al. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2017, 24(10): 825-833.
- [16] ZUO X L, FAN C H, CHEN H Y. Biosensing: CRISPR-powered diagnostics [J]. Nature Biomedical Engineering, 2017, 1(6): 91.
- [17] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. Science, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [18] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442.
- [19] ARSLAN Z, HERMANN S, WURM R, et al. Detection and characterization of spacer integration intermediates in type I-E CRISPR-Cas system [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(12): 7884-7893.
- [20] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL M R, KNIGHT S C, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. Nature, 2016, 538(7624): 270-273.
- [21] FOZOUNI P, SON S, DE LEÓN DERBY M D, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy [J]. Cell, 2021, 184(2): 323-333.e9.
- [22] STEENS J A, ZHU Y F, TAYLOR D W, et al. SCOPE enables type III CRISPR-Cas diagnostics using flexible targeting and stringent CARF ribonuclease activation [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 5033-5045.
- [23] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. Science, 2018, 360(6387): 444-448.
- [24] 苏璇, 葛以跃, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a 辅助 RAA 快速检测

- 金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(3): 253-258.
- SU X, GE Y Y, ZHANG Q, et al. CRISPR-Cas13a-assisted RAA rapid detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Pathogenic Biology, 2020, 15(3): 253-258.
- [25] 葛以跃, 苏璇, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a 结合重组酶介导的扩增快速检测副溶血性弧菌方法的建立[J]. 现代预防医学, 2019, 46(20): 3777-3781.
- GE Y Y, SU X, ZHANG Q, et al. Establishment of a rapid detection method for *Vibrio parahaemolyticus* by combining CRISPR-Cas13a with recombinase-mediated amplification [J]. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(20): 3777-3781.
- [26] 耿多, 陈辉, 罗瑞明, 等. 基于基因检测方法快速鉴别不同种类畜肉[J]. 食品工业科技, 2019, 40(15): 66-71, 187.
- GENG D, CHEN H, LUO R M, et al. Rapid identification of different types of livestock meat based on genetic testing methods [J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(15): 66-71, 187.
- [27] YIN J L, SHACKEL N A, ZEKRY A, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I [J]. Immunology and Cell Biology, 2001, 79(3): 213-221.
- [28] HEIN I, FLEKNA G, KRASSNIG M, et al. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(3): 538-547.
- [29] HARDEGEN C, MESSLER S, HENRICH B, et al. A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital [J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2010, 9: 5.
- [30] LIU J, GRATZ J, AMOUR C, et al. A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(2): 472-480.
- [31] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口行业标准 进出口食品中霍乱弧菌检验方法: SN/T 1022—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Import and export industry standards *Vibrio cholerae* inspection methods in imported and exported foods: SN/T 1022—2010 [S]. Beijing: China Standard Press, 2010.
- [32] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口行业标准 食品微生物检验方法确认技术规范: SN/T 3266—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Import and Export Industry Standards-Technical Specifications for Confirmation of Food Microbiological Testing Methods: SN/T 3266—2012 [S]. Beijing: China Standard Press, 2012.
- [33] SHEN X X, QIU F Z, SHEN L P, et al. A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay to detect hepatitis B virus without DNA extraction [J]. BMC Infectious Diseases, 2019, 19(1): 229.
- [34] 王金凤, 项佳林, 孙晓霞, 等. 铜绿假单胞菌实时荧光重组酶介导链置换核酸扩增方法建立及应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(5): 524-529.
- WANG J F, XIANG J L, SUN X X, et al. Establishment and application of real-time fluorescent recombinase-mediated strand replacement nucleic acid amplification method for *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(5): 524-529.
- [35] 张学勇, 简莹娜, 郭志宏, 等. 基于重组酶介导等温扩增技术的 3 种棘球绦虫核酸检测方法的建立及初步应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2021, 33(4): 339-345.
- ZHANG X Y, JIAN Y N, GUO Z H, et al. Establishment and preliminary application of three *Echinococcus* nucleic acid detection methods based on recombinase-mediated isothermal amplification technology [J]. Chinese Journal of Schistosomiasis Control, 2021, 33(4): 339-345.