

基于MIRA-CRISPR/Cas12a技术的苏黎世克罗诺杆菌快速检测方法建立

杨亚玲¹, 赵欣², 亓梦¹, 李晓燕³, 郭峻^{1*}

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457)

(2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176) (3. 天津市疾病预防控制中心微生物检验检测所, 天津市疾病预防控制中心天津市传染病病原微生物重点实验室, 天津 300011)

摘要: 该研究针对婴幼儿配方奶粉中重点监测的致病性苏黎世克罗诺杆菌, 利用多酶恒温快速扩增技术 (Multienzyme Isothermal Rapid Amplification, MIRA) 和 CRISPR/Cas12a 检测系统, 开发了一种快速检测体系。基于苏黎世克罗诺杆菌的 CTU_22970 基因序列, 设计了特异性 MIRA 引物和 CrRNA, 通过 MIRA 技术扩增得到靶标 DNA, 靶标 DNA 的存在可以激活 CrRNA-Cas12a 复合物的反式切割活性, 最后通过胶体金侧向流层析试纸条技术实现检测信号的读出。该研究所构建的检测体系具有良好的特异性与灵敏度, 经验证, 克罗诺杆菌属内不同菌种与非克罗诺杆菌株的存在均不会激活 Cas12a 的反式切割功能。该体系可在 1.5 h 内完成检测, 对纯培养物的检出限为 1 CFU/mL, 对实际样品的检测, 初始含菌量为 10^5 CFU/g 的奶粉样品不增菌即可检出, 初始含菌量为 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 CFU/g 的奶粉样品分别需要预孵育 2、4、6、8、10 h 检出。检测过程操作简单, 不依赖大型仪器设备, 无需专业培训, 适用于现场化的检测应用, 对食品中苏黎世克罗诺杆菌的控制具有重要的实际意义。

关键词: 苏黎世克罗诺杆菌; CRISPR/Cas12a; 胶体金侧向流层析; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2025)06-276-285

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0490

Establishment of A Rapid Detection Method for *Cronobacter turicensis* Based on Multienzyme Isothermal Rapid Amplification-CRISPR/Cas12a

YANG Yaling¹, ZHAO Xin², QI Meng¹, LI Xiaoyan³, GUO Jun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)(2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)(3. Institute of Microbiology, Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin Key Laboratory of Pathogenic Microbiology of Infectious Disease, Tianjin 300011, China)

Abstract: A rapid method for detecting pathogenic *Cronobacter turicensis* in infant formula milk powder was developed by combining multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) with the CRISPR/Cas12a system. Based on the

引文格式:

杨亚玲,赵欣,亓梦,等.基于MIRA-CRISPR/Cas12a技术的苏黎世克罗诺杆菌快速检测方法建立[J].现代食品科技, 2025,41(6):276-285.

YANG Yaling, ZHAO Xin, QI Meng, et al. Establishment of a rapid detection method for *Cronobacter turicensis* based on multienzyme isothermal rapid amplification-CRISPR/Cas12a [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 276-285.

收稿日期: 2024-04-15

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFC2605100)

作者简介: 杨亚玲 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食品安全, E-mail: yyl5421@163.com

通讯作者: 郭峻 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与食品安全, E-mail: guojun@tust.edu.cn

CTU_22970 gene sequence of *C. turicensis*, specific MIRA primers and CRISPR RNA (CrRNA) sequences were designed. The target DNA of *C. turicensis* was amplified using the highly efficient and sensitive MIRA method. The presence of the target DNA activated the trans-cleaving activity of the CrRNA-Cas12a complex. The detection signal was then read using colloidal gold-based lateral flow immunochromatography. The detection system developed in this study had good specificity and sensitivity. The presence of other species of *Cronobacter* and non-*Cronobacter* strains were verified to not activate the trans-cleavage activity of Cas12a. Detection was completed within 1.5 h, and the detection limit for *C. turicensis* (for pure cultures) was 1 CFU/mL. For actual samples, milk powder with an initial bacterial count of 10^5 CFU/g can be detected without enrichment, while samples with initial bacterial counts of 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , and 100 CFU/g need pre-incubation for 2, 4, 6, 8, and 10 h, respectively, for successful detection of *C. turicensis*. The detection process is simple and requires no large devices or equipment and professional training. It is suitable for on-site detection and of significant practical importance for controlling and monitoring *C. turicensis* in food.

Key words: *Cronobacter turicensis*; CRISPR/Cas12a; colloidal gold-based lateral flow immunochromatography; rapid detection

克罗诺杆菌 (*Cronobacter*) 是一种常见的食源性致病菌, 可存在于婴幼儿配方奶粉 (PIF)、肉类、水果、蔬菜等多种食品中^[1]。婴幼儿配方奶粉被确定为克罗诺杆菌属的主要来源, 婴幼儿是感染克罗诺杆菌的主要群体^[2,3]。婴幼儿在感染克罗诺杆菌后会引发严重脑膜炎、败血症和坏死性小肠结肠炎, 死亡率高达 33% 至 80%^[4]。研究指出, 阪崎克罗诺杆菌 (*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌 (*C. turicensis*) 是致病性最强的菌种^[5]。目前已有针对 *C. sakazakii*、*C. malonaticus* 的快速检测方法^[6-11], 但缺乏针对 *C. turicensis* 的快速检测方法。因此, 开发相应的检测方法以进行及时、快速、准确的风险评估、应急处置, 对保证食品安全、预防和控制食源性疾病的爆发具有重要意义^[12]。

克罗诺杆菌相关检测方法主要包括生化鉴定、免疫学方法、分子生物学方法^[13]。传统的生化鉴定检测周期长, 通量低^[14,15]; 免疫学检测技术已将检测时间缩短至几小时^[16], 但也存在抗体制备过程复杂, 成本高, 运输和保存条件苛刻等问题; 目前, 常用的分子生物学方法有聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)、实时定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR)、多重 PCR (multiplex Polymerase Chain Reaction, mPCR) 等^[17], 但以上技术依赖昂贵仪器设备和专业技术人员^[18], 无法满足现场化快速检测的需求。随着新检测技术的不断出现, 针对食品安全微生物的检测方法逐渐摆脱实验室检测条件的局限性^[19], 环介导等温扩增反应 (Loop-mediated Isothermal Amplification,

LAMP)、重组酶聚合酶扩增反应 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA)、多酶恒温快速扩增反应 (Multienzyme Isothermal Rapid Amplification, MIRA) 等技术可实现恒定温度下对目标序列的快速扩增^[20-22], 其中 LAMP 技术涉及到 4~6 条引物, 设计难度大、成本高、扩增温度相对较高 (60 °C), 难以实现现场快速检测^[23]。RPA 和 MIRA 技术对扩增温度要求低, 引物设计相对容易, 在现场即时检测方面具有更大的优势。

CRISPR 系统 (规律间隔成簇短回文重复序列) 是分子生物学诊断领域的新型技术^[24,25], 不仅具有基因编辑的功能, 而且在核酸检测领域也显示出巨大的潜力。CRISPR/Cas12a 已被证明, 核酸靶标的存在可激活 Cas12a-CrRNA 复合物的反式切割功能, 实现对单链 DNA 的非特异性切割^[26]。通过非特异性单链 DNA 两端标记荧光基团和淬灭基团/生物素, CRISPR/Cas12a 可以转化为便携式的生物分析检测平台, 不依赖昂贵的大型仪器设备, 通过试纸条或借助便携式的紫外/蓝光激发源实现信号读出^[27], 适用于即时诊断以及仪器设备资源匮乏环境下的检测。Liu 等^[28]将 RPA 与 CRISPR/Cas12a 技术相结合, 构建了一种现场检测食品中沙门氏菌的新方法, 该方法与 qPCR 的灵敏度相当, 但操作更简单、更快捷, 检测结果借助便携式蓝光透射仪直接判读。Yang 等^[29]将 MIRA 与 CRISPR/Cas13a 技术相结合, 开发了一种阴道毛滴虫检测方法, 该方法与巢式聚合酶链式反应的灵敏度一致, 试纸条提供了一种快速、准确且便携的判读方式。Wang 等^[30]基于 MIRA-CRISPR/Cas12a 技术, 开发了一种区分野生

型与基因缺失型伪狂犬病毒的检测方法，结果在便携式蓝光灯的照射下即可判读，其灵敏度与 qPCR 一致，检测用时仅为 qPCR 所需时间的一半。

本文将 MIRA 技术与 CRISPR/Cas12a 系统相结合，以 FAM-ssDNA-Biotin 作为检测体系内的报告探针，利用目标核酸在与之匹配的 CrRNA 条件下，能激发 Cas12a 反式切割报告探针的功能，建立一种针对苏黎世克罗诺杆菌的快速检测方法，检测结果通过胶体金侧向流层析试纸条（Lateral Flow Dipstick, LFD）实现信号输出。所构建的检测方法可以实现对苏黎世克罗诺杆菌的定性检测，检测过程耗时短，灵敏度高，为现场化的检测应用提供了技术方案。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苏黎世克罗诺杆菌（*C. turicensis*）（CICC24178）购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC）；阪崎克罗诺杆菌（*C. sakazakii*）（ATCC29544）、丙二酸盐克罗诺杆菌（*C. malonaticus*）（CICC24177）、莫金斯克罗诺杆菌（*C. muytjensii*）（ATCC51329）、大肠杆菌（*E. coli*）、金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）、沙门氏菌（*Salmonella*），天津科技大学食品营养与安全国家重点实验室留存；本项目所用寡核苷酸（表1）均由北京擎科生物科技有限公司合成；Lba Cas12a, NEBuffer 2.1, Monarch RNA Cleanup Kit, TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit 购买于美国 New England Biolabs 公司；MIRA 试剂盒购买于潍坊安普未来生物公司，胶体金侧向流层析试纸条购买于苏州博奥龙公司。

TC-96/G/H（b）B 型基因扩增仪，杭州博日科技公司；MQT-60R 震荡培养箱，上海旻泉仪器

有限公司；Fresco 17 台式高速冷冻离心机，美国 Thermo 公司；EMS-30 数显磁力搅拌水浴锅，上海乔跃电子公司；LBI-250 生化培养箱，上海龙跃仪器设备公司；Nano Drop 2000 分光光度计，美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌培养及计数

克罗诺杆菌菌株接种在 TSA 培养基平板上，37℃倒置培养 24 h。挑取平板上的单个菌落接种至 5 mL 缓冲蛋白胨水 BPW 中，220 g，37℃恒温震荡培养 12 h。取 100 μL 菌液，采用无菌生理盐水对其进行 10 倍梯度稀释，制得不同浓度梯度的菌悬液。每个梯度的菌悬液取 50 μL 涂布在 TSA 培养基平板上，重复三次，37℃倒置培养 24 h 后选取菌落数在 20~200 CFU 之间的平板进行计数。

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌的培养与计数参考国标法。

1.2.2 人工污染的奶粉样品制备

从当地超市购买婴幼儿配方奶粉，参考美国食品药品监督管理局（FDA）中相关方法^[31]，无菌条件下，称取 10 g PIF 溶解于 89 mL 缓冲蛋白胨水 BPW 中，以不添加任何菌液作为对照组，其余组别中分别加入 1 mL 不同浓度（10⁸~10² CFU/mL）的苏黎世克罗诺杆菌菌悬液，充分混匀后，将其置于 37℃下恒温孵育，每隔 2 h 取一次样，取样后，样品立即冻存于 -20℃冰箱备用。

1.2.3 核酸提取

1.2.3.1 菌液样品

采用高温水煮法提取细菌的核酸，取 1 mL 菌液，100℃高温煮沸 10 min，裂解细胞，裂解液作为 MIRA 的扩增模板。

表 1 核苷酸序列表
Table 1 Oligonucleotide sequences

名称	序列信息（5'-3'）	序列长度/bp
MIRA-F	TCTGTAGTAAGCACCGACACCAATTCTGTA	30
MIRA-R	AACGGACAGTAGAGGAGTTTACATTTACGC	30
CrRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGTAATTTCTACTAAG TGTAGATTCGCCAGGCGATAAGCTCACT	65
CrRNA-R	AGTGAGCTTATCGCCTGGCGAATCTACACTTAGTAGA AATTACTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	65
FAM-ssDNA-Biotin	6-FAM-TTTTTTTTATTTTTTT-Biotin	15

1.2.3.2 人工污染的奶粉样品

取 1 mL 人工污染的奶粉样品, 4 °C, 10 000 g 下冷冻离心 10 min, 弃掉废液, 使用无菌棉签清除离心管侧壁上的脂肪沉淀。将离心管底部所得沉淀重新悬浮在 1 mL 的生理盐水中, 以最大速度涡旋至少 20 s, 将离心管置于水浴锅中, 100 °C 高温煮沸 10 min, 冷却至室温后, 4 °C, 10 000 g 下再次离心 10 min, 上清液可作为 MIRA 的模板进行扩增。

1.2.4 MIRA引物和CrRNA的设计

采用 CTU_22970 作为苏黎世克罗诺杆菌的靶基因^[32], 设计 MIRA 特异性引物, 并针对 MIRA 法得到的特异性序列, 优化 PAM (前间隔序列邻近基序) 位点, 设计可特异性识别 MIRA 扩增序列的 CrRNA, 具体序列信息见表 1。

1.2.5 CrRNA的合成与纯化

CrRNA 转录模板制备: 由含有 T-7 启动子序列的 DNA 寡核苷酸链 CrRNA-F (10 μmol/L) 与 CrRNA-R (10 μmol/L) 退火形成双链, PCR 仪设定退火程序: 95 °C 变性 5 min, 每分钟降 1 °C, 降至 25 °C, 退火产物作为 CrRNA 转录模板。CrRNA 转录: 30 μL 转录体系包括 2 μL T7 RNA 聚合酶, 5 μL 转录模板, 10 μL NTP 缓冲液, 13 μL 无菌无酶水。组装好后, 37 °C 恒温孵育 12 h。转录结束后, 加入 2 μL DNase I, 37 °C 孵育 15 min 以去除转录模板得到初步的转录产物。CrRNA 纯化: 采用美国 New England Biolabs 公司 RNA 纯化试剂盒 (Monarch RNA Cleanup Kit) 对转录产物进行纯化, 对纯化后的 CrRNA 测定浓度后分装, 冻存于 -80 °C 备用。

1.2.6 反应体系

1.2.6.1 MIRA 扩增体系

50 μL 扩增反应体系包括: 2 μL 上游引物 MIRA-F (10 μmol/L) 与 2 μL 下游引物 MIRA-R (10 μmol/L), 29.4 μL A Buffer, 2.5 μL B Buffer, 12.1 μL 无菌无酶水, 2 μL 不同菌株的 DNA。反应条件为: 37 °C 水浴 30 min。

1.2.6.2 CRISPR/Cas12a-LFD 反应体系

20 μL 反应体系包括: 4 μL LbCas12a (1 μmol/L), 4 μL CrRNA (1 μmol/L), 0.8 μL FAM-ssDNA-Biotin (100 nmol/L), 3 μL MIRA 扩增产物, 6.2 μL 无菌无酶水和 2 μL 10×NEBuffer 2.1 (50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 100 μg/mL

Recombinant Albumin, pH 值 7.9)。组装完毕后, 37 °C 恒温反应 60 min。反应结束后, 取 5 μL 反应产物加入到 45 μL 试纸条上样缓冲液中, 混匀后缓慢滴加在试纸条上样区, 5 min 后判读结果。判读方式为: 质控线与检测线都出现明显的紫红色条带, 结果判定为阴性; 检测线不呈现色带, 或相对于阴性对照检测线色带颜色显著降低, 结果判定为阳性; 质控线没有出现紫红色条带, 结果无效。

1.2.7 特异性检测

按照 1.2.1 对实验室留存的阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌进行活化培养, 选取 10⁷ CFU/mL 浓度的菌液, 高温煮沸法提取核酸后, 验证本文所构建方法的特异性。

1.2.8 灵敏度检测

按照 1.2.1 制备不同浓度 (10⁸~10⁰ CFU/mL) 的苏黎世克罗诺杆菌菌液, 高温煮沸法提取核酸后, 验证检测体系的灵敏度。

1.2.9 实际样品检测

按照 1.2.2 制备人工污染的奶粉样品。以未经人为污染的奶粉样品作为对照组, 参考 1.2.3.2 的方法提取人工污染奶粉样品的核酸, 基于本研究建立的检测方法, 评估其在实际样品检测中的灵敏度。

1.2.10 数据处理

每个样品用试纸条重复测定 3 次, 重复测定后结果一致, 展示其中一次的实验结果。

2 结果与讨论

2.1 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD检测原理

基于 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD 对苏黎世克罗诺杆菌的检测流程如图 1 所示, 包括基因组 DNA 的快速提取、MIRA 恒温扩增、CRISPR/Cas12a 系统检测、LFD 信号输出四步。首先, 对待测样品进行简单预处理, 高温热裂解提取基因组 DNA; 然后利用 MIRA 技术特异性扩增裂解液中的核酸, 扩增产物加入相应的 CRISPR/Cas12a 系统, Cas12a-CrRNA 复合物识别并靶向目标位点, 激活 Cas12a 的反式切割功能, 切割体系内的报告探针; 反应完毕后将反应产物加入到试纸条上样区进行检测。其中阴性体系中报告探针不被切割, 随着层析作用, 报告探针与金标垫上的 FAM 抗体结合后, 层析至

检测线，被 Biotin 抗体捕获聚集形成紫色免疫印记，与此同时金标垫上的另一鸡源抗体层析至质控线被其二抗捕获显色，检测线与质控线均呈现紫红色；阳性体系中报告探针被切割成 FAM 与 Biotin 两部分，金标 FAM 抗体只能捕获 FAM，未能与报告探

针形成完整的 FAM 抗体 -FAM-ssDNA-Biotin 结合物，无法在检测线上聚集显色，此时只有质控线才能形成免疫印记，呈现紫红色；若只有检测线呈现紫红色或者检测线与质控线均不显色，则结果判定为无效。

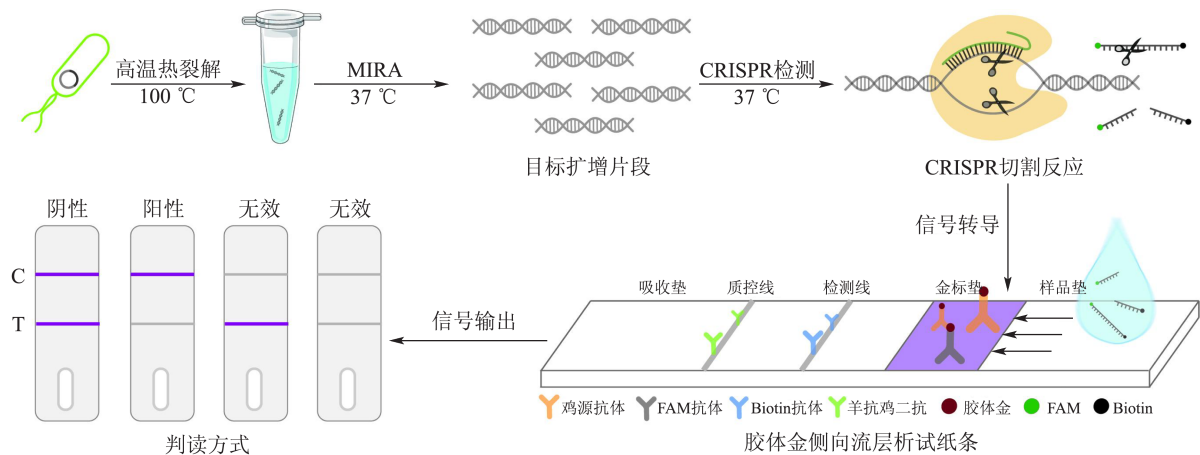


图 1 检测原理图
Fig.1 Detection schematic

2.2 CrRNA 合成和纯化结果

首先使用超微量分光光度计测定纯化后的 CrRNA 浓度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 与 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 的比值均在正常范围内。如图 2 所示，进一步对纯化后的 CrRNA 进行电泳验证，电泳结果显示 CrRNA 所在泳道条带未发生弥散与拖尾，证实 CrRNA 无降解，条带明亮，表明经纯化后，CrRNA 浓度较高，稀释后可用于后续 CRISPR/Cas12a 检测实验。

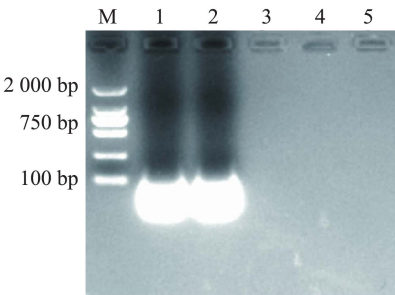


图 2 CrRNA 纯化电泳结果
Fig.2 CrRNA purification electrophoresis results
注：泳道 1、2 为纯化后的 CrRNA。

2.3 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD检测 苏黎世 克罗诺杆菌的特异性结果

2.3.1 MIRA扩增苏黎世克罗诺杆菌的特异性结果
为了对所构建方法的特异性进行评估，选取实验室留存的阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌、

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌进行特异性验证实验。首先将设计的苏黎世克罗诺杆菌特异性 MIRA-F、MIRA-R 引物用 Primer BLAST (NCBI 数据库) 比对，数据库中的比对结果初步表明所设计的引物序列特异性良好。公司合成引物后，对 MIRA 扩增过程进行特异性评估，以苏黎世克罗诺杆菌的特异性引物 MIRA-F/R 扩增不同属种的菌株，电泳结果如图 3 所示，预计扩增产物大小为 302 bp，结果显示只有苏黎世克罗诺杆菌所在泳道有目的条带且位置正确，这表明所设计的苏黎世克罗诺杆菌的 MIRA 引物具有较高的特异性。

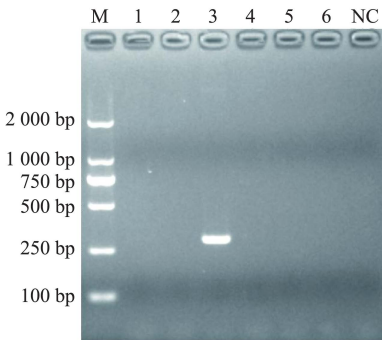


图 3 MIRA 特异性扩增产物电泳结果
Fig.3 MIRA specific amplification results

注：图中是以不同菌株的核酸为模板扩增后的电泳结果。其中 1 为阪崎克罗诺杆菌，2 为丙二酸盐克罗诺杆菌，3 为苏黎世盐克罗诺杆菌，4 为大肠杆菌，5 为金黄色葡萄球菌，6 为沙门氏菌，NC 为无菌无酶水。

2.3.2 CRISPR/Cas12a检测苏黎世克罗诺杆菌的特异性结果

在确保扩增过程特异性的基础上，进一步验证下游 CRISPR/Cas12a 检测体系的特异性，图 4 为基于 MIRA-CRISPR/Cas12a 的试纸条特异性检测结果，结果显示仅苏黎世克罗诺杆菌的检测结果显示阳性，阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌的检测结果显示均为阴性。因此，表明所构建的苏黎世克罗诺杆菌检测体系具有较好的特异性。

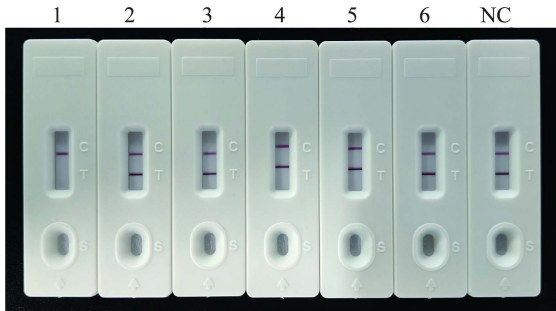


图 4 试纸条特异性检测结果

Fig.4 Specific detectin of lateral flow dipstick

注：图 4 是基于 MIRA-CRISPR/Cas12a 对不同菌株的试纸条检测结果。其中 1 为苏黎世克罗诺杆菌，2 为阪崎克罗诺杆菌，3 为丙二酸盐克罗诺杆菌，4 为大肠杆菌，5 为金黄色葡萄球菌，6 为沙门氏菌，NC 为无菌无酶水。

2.4 检测限结果

制备不同浓度苏黎世克罗诺杆菌菌悬液，高温热裂解后作为模板，对检测体系的灵敏度进行评估。结果如图 5 所示，结果显示基于 MIRA-CRISPR/Cas12a 对苏黎世克罗诺杆菌的检测灵敏度为 10^0 CFU/mL，这表明所构建的检测方法具有较高的灵敏度。对于纯菌液样本，本研究所建立检测方法与传统的平板菌落计数法（图 6）相比，检测限降低了两个数量级。Akineden 等^[33]基于试纸条免疫层析技术建立的针对阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌的检测方法，对纯菌液样品的检测限为 10^4 CFU/mL。Qin 等^[34]基于脱氧核糖核酸酶（DNAzyme）和不对称重组酶聚合酶扩增（aRPA），构建了用于检测 PIF 中的阪崎克罗诺杆菌的检测方法，在纯菌液中的检测限为 2.2 CFU/mL。与现有检测方法相比，本研究所建立的检测方法灵敏度更高。张懿翔等^[35]将 LAMP 与 CRISPR/Cas12b 相结合开发了一种针对乳粉中克罗诺杆菌属的检测方法，该

方法对纯菌液的检测限为 1×10^2 CFU/mL，但该方法需依赖 qPCR 仪测定结果，尽管该方法高度可靠、稳定，但耗时的操作过程、对专业设备和训练有素的专业人员的要求通常限制了其在现场检测中的应用。本研究所形成的检测方法可达到更低的检测限，并可摆脱对实验室仪器的依赖，更有望成为传统方法的良好补充或替代方法。

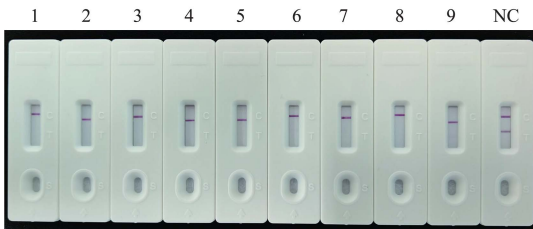


图 5 检测限结果

Fig.5 Detection sensitivity

注：图 5 是基于 MIRA-CRISPR/Cas12a 对不同浓度苏黎世克罗诺杆菌菌株的试纸条检测结果。其中 1~9 分别为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 CFU/mL，NC 为无菌无酶水。

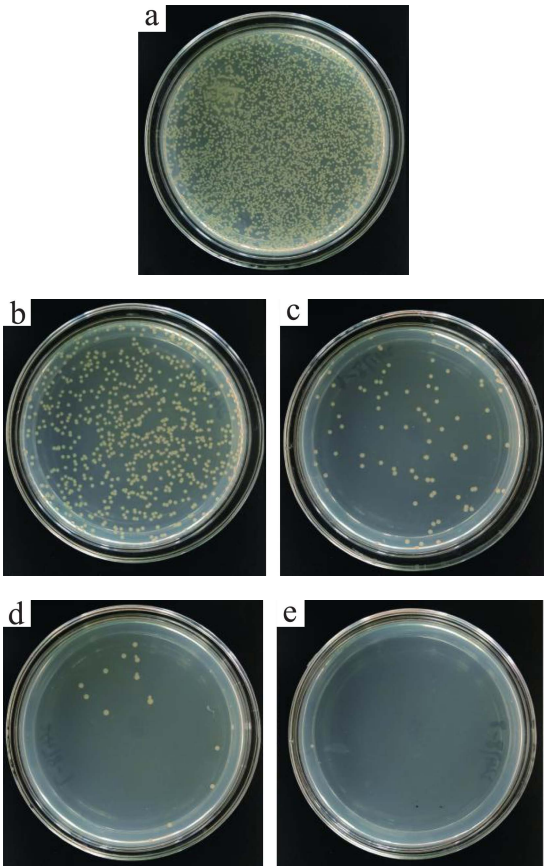


图 6 苏黎世克罗诺杆菌菌落计数结果

Fig.6 Colony counting of *C. turicensis*

注：a~e 分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU/mL。

2.5 检测体系优化结果

2.5.1 报告探针浓度筛选

为保证 Cas12a 对报告探针的充分切割, 确保试纸条判读结果的准确性, 采用文献中报道的检测条件, 验证本研究设计的苏黎世克罗诺杆菌 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测方案, 具体为 CRISPR/Cas12a 检测部分的反应时间为 90 min, 报告探针工作浓度为 40 nmol/L^[27]。为进一步优化检测效率, 确保准确性的前提下, 最大限度的缩短检测时间, 通过调整报告探针的工作浓度, 对 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系进行优化。MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系只能实现对 CRISPR/Cas12a 反应中的某一时间点进行结果判读, 而 Cas12a 对报告探针的切割效率直接影响检测结果的判定, 探针浓度偏高时, 需要 Cas12a 充分长时间切割才能使得检测线不显色, 因此, 需要寻找可使检测线显色的最低报告探针浓度, 从而提高检测效率。

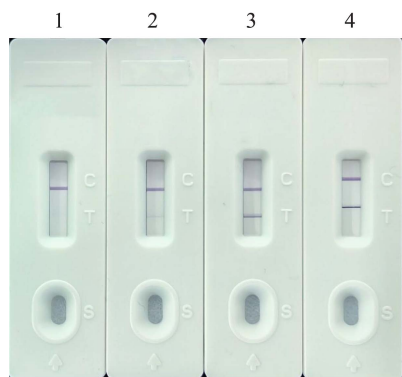


图 7 报告探针浓度筛选结果

Fig.7 Reporter probe concentration screening results

注: 1~4 分别为 0.02、0.2、0.4、2 nmol/L。

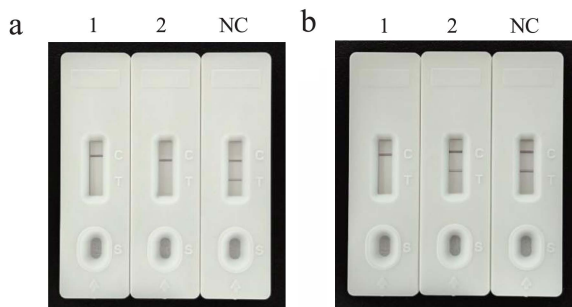


图 8 报告探针工作浓度优化结果

Fig.8 Optimised results of reporter probe working concentrations

注: a 为 CRISPR/Cas12a 体系反应 90 min 时的试纸条检测结果, b 为 CRISPR/Cas12a 体系反应 60 min 时的试纸条检测结果。1 为 0.4 nmol/L, 2 为 40 nmol/L, NC 为无菌无酶水。

共选取 0.02、0.2、0.4、2 nmol/L 四个不同工作浓度的报告探针, 用试纸条进行验证。阴性体系下的正确结果为质控线与检测线均呈现紫红色, 图 7 结果显示, 探针浓度为 0.02 nmol/L 时, 检测线不显色; 探针浓度为 0.2 nmol/L 时, 检测线开始出现免疫印记, 但并不清晰; 探针浓度高于 0.2 nmol/L 时, 检测线均正确显色。因此, 为确保判读结果的稳定性, 选用 0.4 nmol/L 作为报告探针的最低工作浓度。

基于此, 进一步验证 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD 系统在报告探针的最低工作浓度下的检测效率, 以 10^6 CFU/mL 的菌液样品为检测靶标, 设置 0.4、40 nmol/L 两个不同探针浓度下的酶切反应, 分别取 60、90 min 两个时间点的酶切产物用试纸条进行验证。结果 (图 8) 表明, 报告探针浓度在 40 nmol/L 时, 需要反应 90 min 才能出具准确结果, 而将报告探针浓度降低至 0.4 nmol/L 时出具准确结果只需要 60 min, 这表明降低 CRISPR/Cas12a 反应体系中的报告探针浓度能有效节省检测时间, 提高检测效率。

2.5.2 不同浓度苏黎世盐克罗诺杆菌检测时间

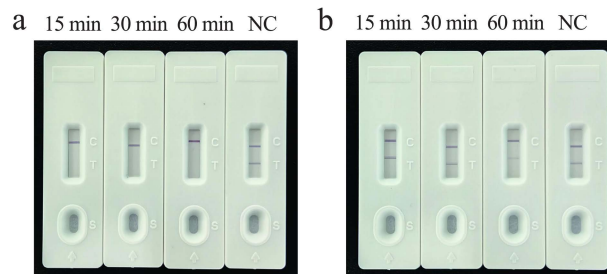


图 9 不同浓度苏黎世盐克罗诺杆菌检测时间的验证

Fig.9 Validation of detection time of *C. turicensis* at different concentrations (probe concentration 0.4 nmol/L)

注: 探针浓度 0.4 nmol/L。a 为 10^8 CFU/mL, b 为 10^0 CFU/mL, NC 为无菌无酶水 (60 min)。

基于以上优化结果, 又进一步探究了高浓度菌液与低浓度菌液在优化条件下的检测结果, 选取 10^8 CFU/mL 与 10^0 CFU/mL 这两个梯度的菌液样品进行验证, 结果如图 9 所示, 分别取 15、30、60 min 这三个时间点的酶切产物用试纸条进行验证, 结果表明, 探针工作浓度调整为 0.4 nmol/L 时, 对于 10^8 CFU/mL 的菌液样品可在酶切反应 15 min 时出具准确结果, 而对于 10^0 CFU/mL 的菌液样品至少需要 60 min 检测线才与对照组的检测线有显著差异。这说明在降低 CRISPR 体系的探针浓度后能有效缩短检测时间, 提高试纸条可视化体系的检测

效率。考虑实际检测中对样品的含菌量未知,因此,选择 60 min 这一时间点的 CRISPR 反应产物用作试纸条的信号输出,以确保检测结果的准确性,后续检测体系中报告探针均采用优化后的工作浓度。

2.5.3 优化后的检测限结果

基于优化后的检测体系,进行检测限的重复性实验,结果如图 10 所示,检测限为 10^0 CFU/mL。

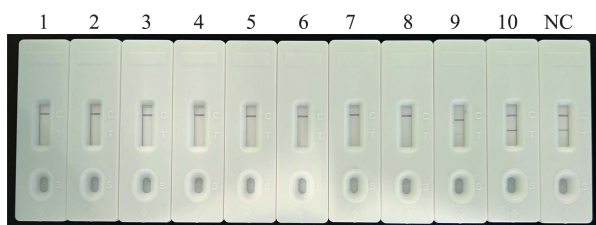


图 10 优化体系下的检测限结果

Fig.10 Detection limit results under optimized system

注: 1~10 分别为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 、 10^{-1} CFU/mL, NC 为无菌无酶水。

2.6 实际样品检测结果

为了验证所构建的检测方法对实际样品的检测情况,根据 1.2.2 的方法,制备人工污染的奶粉样品,对于初始含菌量为 ($10^7 \sim 10^0$ CFU/g) 的奶粉样品, 37°C 恒温孵育,每隔 2 h 取一次样。按照 1.2.3.2 对不同浓度下不同孵育时间点的奶粉样品提取核酸后,基于 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测体系对其灵敏度进行表征。

结果如图 11 所示,对于初始含菌量不同的奶粉样品,分别需要孵育不同的时间检出。初始含量为 10^5 CFU/g 的奶粉样品不增菌即可检出,初始含量为 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 CFU/g 的奶粉样品分别需要预孵育 2、4、6、8、10 h 检出。

Qin 等^[34]开发了一种基于脱氧核糖核酸酶 (DNAzyme) 和不对称重组酶聚合酶扩增 (aRPA) 的检测方法用于检测阪崎克罗诺杆菌,在人工污染奶粉中的检测限为 5.4×10^1 CFU/g。Akineden 等^[33]将 PCR 技术与试纸条免疫层析技术结合建立了针对阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌的检测方法,对于婴儿配方奶粉中浓度为 $10^0 \sim 10^1$ CFU/g 的阪崎克罗诺杆菌或丙二酸盐克罗诺杆菌,需要在 37°C 下复溶并孵育 24 h 后可检测到。目前,基于 CRISPR 系统对克罗诺杆菌的检测报道相对缺乏。张懿翔等^[35]基于 CRISPR/Cas12b 建立的针对乳粉中克罗诺杆菌属的检测方法,在 36°C 条件下增菌 12 h 后,通过 qPCR 仪可检测到初始菌量 < 10 CFU/g 的人工污染

样品,检测方法的检出限 < 10 CFU/100 g。本研究建立的检测方法可以在相对较短的孵育时间内以高灵敏度检测奶粉中的苏黎世克罗诺杆菌,同时不依赖 qPCR 仪等大型仪器设备,检测结果肉眼可直接判读,在现场化的检测应用方面具有更大的优势。

目前,采用核酸方法检测食品中克罗诺杆菌相较于传统食品微生物的检测方法具有快速、灵敏性高等特点,已被广泛应用于行业标准,但基于核酸检测的方法无法判定是否为有活性的克罗诺杆菌,目前常用的方法为在核酸检测结果为阳性的基础上,进一步采用传统方法确认,已达到对克罗诺杆菌食品安全风险的精准评估。

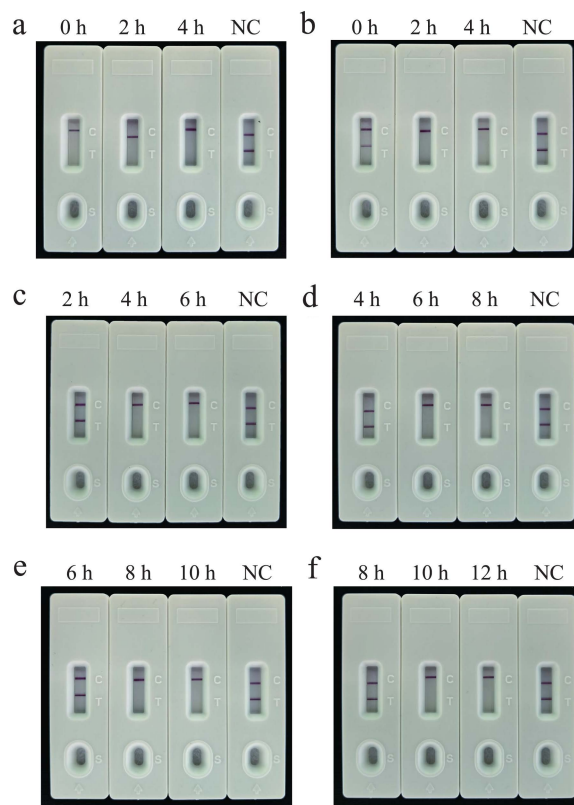


图 11 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD 检测奶粉样品中的苏黎世克罗诺杆菌

Fig.11 MIRA-CRISPR/Cas12a-LFD detects *C. turicensis* in milk powder samples

注: a~e 的初始含菌量分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 CFU/g, NC 为阴性对照。

3 结论

本研究将 MIRA 恒温扩增技术与 CRISPR/Cas12a 系统相结合,以 LFD 作为信号输出元件,可实现对苏黎世克罗诺杆菌的定性检测,检测方

法具有较高的特异性与灵敏度,对纯菌液的检测限为1 CFU/mL。经过优化,检测体系报告探针浓度确定为0.4 nmol/L,该浓度下,本方法对于 10^8 CFU/mL的菌液样品可在CRISPR/Cas12a检测体系反应15 min时出具准确结果,对于 10^0 CFU/mL的菌液样品,CRISPR/Cas12a系统的反应时间从1.5 h缩短至1 h。对于实际样品的检测,初始含量为 10^5 CFU/g的奶粉样品不增菌即可检出,初始含量为 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 CFU/g的奶粉样品分别需要预孵育2、4、6、8、10 h检出。本方法有以下多个优势:前处理采用高温热裂解法,简单、快速、成本低;不依赖昂贵的仪器设备与技术人员;对设备要求低,操作简单、便携,适用于现场化的检测应用;能在较短的时间内鉴别出待测样品中是否存在苏黎世克罗诺杆菌污染,可为相关部门提供及时有效的传染病风险评估和疾病控制方案,为特殊群体的生命健康提供技术保障。此外,本文所构建的检测方法,只需要更换相应的靶核酸序列以及CrRNA序列,可实现对多种微生物的检测,应用范围广,具有重要的实际意义。

参考文献

- [1] LIU S Y, GENG Y Y, LIU L B, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid detection of *Cronobacter* spp [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(6): 4914-4922.
- [2] LEPUSCHITZ S, RUPPITSCH W, PEKARD-AMENITSCH S, et al. Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans, Europe, 2017 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2019, 25(3): 515-522.
- [3] 黄燕,贾媛,宋丹靓敏,等.克罗诺杆菌在婴儿配方奶粉及其加工环境中耐受性和耐药性研究进展[J].现代食品科技,2023,39(7):336-343.
- [4] 陈雪峰,郭玉曦,曾海燕,等.阪崎克罗诺杆菌物理和化学防控方法的研究进展[J].现代食品科技,2022,38(1):1-10,421.
- [5] CHAUHAN R, SINGH N, PAL G K, et al. Trending biocontrol strategies against *Cronobacter sakazakii*: A recent updated review [J]. Food Research International, 2020, 137: 109385.
- [6] FU S Q, QIN X, WANG Z H, et al. Screening of specific nucleic acid targets for *Cronobacter sakazakii* and visual detection by loop-mediated isothermal amplification and lateral flow dipstick method in powdered infant formula [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(5): 5152-5165.
- [7] 王彦人,焦敬波,张钧森,等.LAMP在阪崎克罗诺杆菌检测中的研究进展[J].食品与生物技术学报,2022,41(2):1-7.
- [8] LIANG T B, ZHOU P, ZHOU B Q, et al. Simultaneous quantitative detection of viable *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter* spp., and *Salmonella* spp. Using sodium deoxycholate-propidium monoazide with multiplex real-time PCR [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(4): 2954-2965.
- [9] LV X R, WANG L, ZHANG J F, et al. Quantitative detection of trace VBNC *Cronobacter sakazakii* by immunomagnetic separation in combination with PMAxx-ddPCR in dairy products [J]. Food Microbiology, 2021, 99: 103831.
- [10] QIN H, SHI X Q, YU L, et al. Multiplex real-time PCR coupled with sodium dodecyl sulphate and propidium monoazide for the simultaneous detection of viable *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in milk [J]. International Dairy Journal, 2020, 108: 104739.
- [11] YANG X Y, JIANG Y J, SONG Y, et al. Point-of-care and visual detection of *Salmonella* spp. and *Cronobacter* spp. by multiplex loop-mediated isothermal amplification label-based lateral flow dipstick in powdered infant formula [J]. International Dairy Journal, 2021, 118: 105022.
- [12] WEI X Y, ZHAO X H. Advances in typing and identification of foodborne pathogens [J]. Current Opinion in Food Science, 2021, 37: 52-57.
- [13] 林杰.克罗诺杆菌属快速检测技术的研究进展[J].现代食品,2022,28(2):115-117.
- [14] XU Y G, LIU Z M, ZHANG B Q, et al. Development of a novel target-enriched multiplex PCR (tem-PCR) assay for simultaneous detection of five foodborne pathogens [J]. Food Control, 2016, 64: 54-59.
- [15] LU L Y, ZHANG H M, LIN F H, et al. Sensitive and automated detection of bacteria by CRISPR/Cas12a-assisted amplification with digital microfluidics [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2023, 381: 133409.
- [16] BU S J, LIU X, WANG Z, et al. Ultrasensitive detection of pathogenic bacteria by CRISPR/Cas12a coupling with a primer exchange reaction [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2021, 347(15): 130630.
- [17] LI F, XIE G Y, ZHOU B Q, et al. Rapid and simultaneous detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* in infant food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 74: 176-182.
- [18] LIU H, WANG J B, ZENG H J, et al. RPA-Cas12a-FS: A frontline nucleic acid rapid detection system for food safety based on CRISPR-Cas12a combined with recombinase polymerase amplification [J]. Food Chemistry, 2021, 334: 127608.
- [19] LI X M, ZHENG T, GAO L, et al. Recombinase polymerase

- amplification: From principle to performance [J]. Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese, 2020, 41(12): 2587-2597.
- [20] ZHANG S S, DUAN M Y, LI S, et al. Current status of recombinase polymerase amplification technologies for the detection of pathogenic microorganisms [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2024, 108(1): 12.
- [21] SHIRSHIKOV F V, BESPATYKH J A. Loop-mediated isothermal amplification: From theory to practice [J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2022, 48(6): 1159-1174.
- [22] GUO Y, ZHANG L T, YANG Y, et al. Development and application of the MIRA and MIRA-LFD detection methods of *Spiroplasma eriocheiris* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2023, 201: 108017.
- [23] 卫艳珂,王强,徐向明,等.假禾谷镰刀菌RPA-CRISPR/Cas12a快速检测体系的建立与应用[J].菌物学报,2024, 43(8):171-179.
- [24] WENG Z Y, YOU Z, YANG J, et al. CRISPR-Cas biochemistry and CRISPR-based molecular diagnostics [J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2023, 62(17): 38.
- [25] ZHAO L X, QIU M Y, LI X J, et al. CRISPR-Cas13a system: A novel tool for molecular diagnostics [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 8, 13: 1060947.
- [26] MAO Z F, CHEN R P, WANG X J, et al. CRISPR/Cas12a-based technology: A powerful tool for biosensing in food safety [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 122: 211-222.
- [27] HUANG T J, LI L, LI J H, et al. Rapid, sensitive, and visual detection of *Clonorchis sinensis* with an RPA-CRISPR/Cas12a-based dual readout portable platform [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 249(30): 125967.
- [28] LIU L, ZHAO G, LI X M, et al. Development of rapid and easy detection of *Salmonella* in food matrices using RPA-CRISPR/Cas12a method [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 162: 113443.
- [29] YANG Z K, WANG J H, QI Y M, et al. A novel detection method based on MIRA-CRISPR/Cas13a-LFD targeting the repeated DNA sequence of *Trichomonas vaginalis* [J]. Parasites & Vectors, 2024, 17(1): 11.
- [30] WANG H, LI H Z, TANG B, et al. Fast and sensitive differential diagnosis of pseudorabies virus-infected versus pseudorabies virus-vaccinated swine using CRISPR-Cas12a [J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(1): 16.
- [31] CHEN Y, LAMPEL K, HAMMACK T BAM: *Cronobacter*, Bacteriological Analytical Manual [S]. United States of Food and Drug Administration, 2012, Chapter 29: *Cronobacter*.
- [32] 张菊梅,尚玉婷,叶青华,等.克罗诺杆菌属内4个种的特异性新分子靶标及其快速检测方法:中国,CN11095-1898B[P].2022-05-20.
- [33] AKINEDEN Ö, WITTWER T, GEISTER K, et al. Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFIA) with integrated DNA probe degradation for the rapid detection of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* in powdered infant formula [J]. Food Control, 2020, 109: 106952.
- [34] QIN X, WANG Y T, LI H X, et al. A sensitive visual DNAzyme-based strategy for *Cronobacter sakazakii* in PIF by aRPA [J]. Food Control, 2022, 138: 109035.
- [35] 张懿翔,张清平,刘洋.结合CRISPR/Cas12b与LAMP技术的乳粉中克罗诺杆菌属的检测[J].中国乳品工业,2023, 51(12):54-58.