

RPA-CRISRP/Cas12a技术快速检测实验动物感染肺炎克雷伯杆菌方法的建立及应用

魏 迅, 张 曼, 彭丽娜*

上海交通大学实验动物中心, 上海

收稿日期: 2025年6月13日; 录用日期: 2025年7月18日; 发布日期: 2025年7月29日

摘 要

目的: 将RPA扩增技术与CRISPR/Cas12a检测技术相融合, 建立实时、灵敏、特异的检测肺炎克雷伯杆菌的快速方法。方法: 根据肺炎克雷伯杆菌`phoE`基因保守序列设计并合成特异性的RPA扩增引物和CRISPR RNA (crRNA), 通过RPA等温扩增技术放大待测靶标基因, 利用Cas12a蛋白的反式切割(trans-cleavage)活性检测靶标基因。对RPA-CRISPR/Cas12a检测体系的主要参数进行优化, 确定最佳反应体系。结果: 成功筛选出RPA扩增引物和crRNA, 优化了体系中三个重要参数的最佳反应浓度crRNA (40 uM)、Cas12a (250 nM)和ssDNA (10 uM)。肺炎克雷伯杆菌基因组DNA检测灵敏度可达 10^{-5} ng/uL, 与实验动物常见的致病菌无交叉反应。该方法应用于实验动物临床检测时, 具有较高的灵敏度和特异性。结论: 本研究建立的RPA-CRISRP/Cas12a检测方法, 操作简便、实时快速、成本低且特异性好, 能够实现对实验动物感染肺炎克雷伯杆菌的快速检测。

关键词

RPA, CRISPR/Cas12a, 肺炎克雷伯杆菌, 快速检测

Establishment and Application of RPA-CRISRP/Cas12a Technology for Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Laboratory Animals

Xun Wei, Man Zhang, Lina Peng*

Laboratory Animal Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai

Received: Jun. 13th, 2025; accepted: Jul. 18th, 2025; published: Jul. 29th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 魏迅, 张曼, 彭丽娜. RPA-CRISRP/Cas12a 技术快速检测实验动物感染肺炎克雷伯杆菌方法的建立及应用[J]. 生物医学, 2025, 15(4): 814-825. DOI: 10.12677/hjbm.2025.154087

Abstract

Objective: To integrate RPA amplification technology with CRISPR/Cas12a detection technology and establish a real-time, sensitive and specific rapid method for the detection of *Klebsiella pneumoniae*. **Methods:** Specific RPA amplification primers and CRISPR RNA (crRNA) were designed and synthesized based on the conserved sequence of the *phoE* gene of *Klebsiella pneumoniae*. The target gene to be tested was amplified by RPA isothermal amplification technology, and the trans cleavage activity of Cas12a protein was used to detect the target gene. The main parameters of the RPA-CRISPR/Cas12a detection system were optimized to determine the optimal reaction system. **Result:** RPA amplification primers and crRNA were successfully screened out, and the optimal reaction concentrations of three important parameters in the system, namely crRNA (40 μ M), Cas12a (250 nM), and ssDNA (10 μ M), were optimized. The genomic DNA detection sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* can reach 10^{-5} ng/ μ L, and there is no cross-reaction with the common pathogenic bacteria in experimental animals. When this method is applied to the clinical detection of experimental animals, it has high sensitivity and specificity. **Conclusion:** The RPA-CRISPR/Cas12a detection method established in this study is simple to operate, real-time and rapid, low in cost and good in specificity, and can achieve rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* infection in experimental animals.

Keywords

RPA, CRISPR/Cas12a, *Klebsiella pneumoniae*, Rapid Detection

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是呼吸道感染最常见的病原菌之一, 主要通过接触和空气传播, 具有较强的致病性, 危害人类健康。实验大、小鼠在机体免疫功能下降或处于应激状态时感染此菌, 会影响动物健康以及干扰动物实验, 严重时甚至造成动物死亡[1]。近几年我国实验动物质量监测结果显示, 肺炎克雷伯杆菌是目前啮齿类实验动物感染率较高的病原体[2][3]。我校实验动物中心在新进动物质量控制过程中, 从国内供应商以及其他机构引进的实验动物中曾多次检出肺炎克雷伯杆菌, 对我中心的实验动物存在一定的安全隐患。

肺炎克雷伯杆菌常见的检测方法有分离培养、生化鉴定等国标方法以及 PCR 等分子核酸检测技术。培养方法虽然经典, 但是操作繁琐, 检测周期比较长。PCR 技术灵敏度高, 特异性好, 在核酸诊断中应用最为广泛。但是 PCR 技术存在对温控设备过度依赖, 扩增时间长, 对专业要求高, 难以应用于现场检测等缺点[4]。然而准确的判定致病微生物来源具有时间关键性(Time critical) [5] [6], 若不能及时得到检测结果, 很可能错过最佳时机。因此开发更为快速、操作简单、灵敏度高、特异性强的新一代检测技术, 是分子检测领域不断追求的目标[7] [8]。

重组酶聚合酶扩增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)是一种新型的等温扩增新技术, 具有扩增时间短、对设备要求低、操作简易等特点。成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated protein, Cas)系统, 简称 CRISPR/Cas 系统是一系列由 RNA 引导的核酸

内切酶,存在于约 40%的细菌和 90%的古细菌中,是细菌抵御外源物质(如噬菌体和质粒)入侵的获得性免疫系统[9]。现有多种类型的 CRISPR/Cas 系统,包括 Cas9、Cas9、Cas12a、Cas12b、Cas13、Cas14 用于细菌、病毒和寄生虫检测[10]。Cas12 又称为 Cpf1,是属于 II 类 V 型 CRISPR/Cas 系统的核酸内切酶。Cas12a 在执行靶向切割 dsDNA 的功能时,通过 RNA 引导的 DNA 结合来进行任意单链 DNA 切割活动从而完全降解单链 DNA 分子。CRISPR/Cas12 系统通过改变引导 RNA (guide RNA, gRNA)序列,达到易被重新编码以检测目标核酸的目的,并且对外源核酸高度特异,不对内源 DNA 和转录产物造成损害,在室温下即可反应[11] [12],已被逐渐应用到识别核酸检测的生物传感器中[13]。因此,利用此切割活性,能够有效识别和降解反应体系中目的靶标的单链 DNA 分子,从而完成对病原微生物的快速检测[14] [15]。

本研究通过 RPA 等温扩增技术放大待测靶标基因,利用 Cas12a 蛋白的反式切割(trans-cleavage)活性有效识别和降解反应体系中目的靶标的单链 DNA 分子。当 Cas12a 蛋白与靶标序列进行碱基互补配对形成 crRNA-CRISPR/Cas12a-DNA 三元复合物后,该复合物能够激活 Cas12a 蛋白的反式剪切活性,对反应体系内任意的 ssDNA 进行反式切割。在 ssDNA 的两端加入荧光显色基团与淬灭基团,通过检测荧光信号强度实现对靶标序列的检测。通过 RPA 和 CRISPR-Cas12a 技术相融合,建立 PRA-CRISPR/Cas12a 检测体系,实现对肺炎克雷伯杆菌实时、准确、快速的检测,为实验动物病原微生物监测领域提供重要的快速检测技术手段。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

本实验所用实验动物饲养于上海交通大学实验动物中心 SPF 屏障设施内,使用许可证编号为[SYXK (沪) 2023-0042]。本研究方案经上海交通大学实验动物伦理与使用委员会(IACUC)批准,并获取研究计划编号(A2024073)。

2.2. 菌株

本实验所用肺炎克雷伯杆菌(ATCC 46117)和金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)购自广东省微生物菌种保藏中心,绿脓杆菌和嗜肺巴斯德杆菌由本实验室分离保存。肺炎链球菌(ATCC 49619)、鼠伤寒沙门氏菌(SL 1344)、大肠杆菌(CMCC 44102)由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠。

2.3. 主要试剂与仪器

营养肉汤培养基购自海博生物技术有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒和 100 bp DNA Ladder 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;粪便基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;2x ES Tag Master Mix (Dye)购自北京康为世纪生物技术有限公司;琼脂糖和 Sybr safe 核酸染料购自英潍捷基(上海)贸易有限公司。T7 RNA 聚合酶体外转录试剂盒, Lb Cas12a Nucleas 和单链 DNA 寡核苷酸探针购自上海吐露港生物技术有限公司;RPA 等温扩增试剂盒购于英国 TwistDX 公司;ERA 基础型核酸扩增试剂盒购自苏州先达基因科技有限公司;新加坡 ESCO Class II BSC 生物安全柜;德国 Eppendorf Innova 40 恒温摇床;美国 Thermo NanoDrop 2000 分光光度计;美国 Bio-Rad CFX Opus 96 实时荧光定量 PCR 仪、S1000 PCR 仪和 Gel Doc imaging System;德国 Eppendorf 5425R 台式低温高速离心机;上海长肯试验设备有限公司 DNP-9082-1A 微生物培养箱。

2.4. 实验方法

2.4.1. 基因组 DNA 的提取

细菌 DNA 试剂盒提取法:将 KP 接种于营养肉汤液体培养基中,于恒温摇床中,37℃,180 r/min,

培养 16 h。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。

粪便 DNA 试剂盒提取法：用粪便基因组 DNA 提取试剂盒按照说明书提取粪便样本中的 DNA 并于 -20℃ 保存备用。

粪便 DNA 培养煮沸法：用无菌枪头沾取少量新鲜粪便样本分别接种普通营养肉汤培养基，37℃，180 r/min 培养 16~18 h，取 1 mL 菌液经 4℃、8000 r/min 离心 3 min 后弃上清，加入 100 μLTE，100℃煮沸 2 min 后放冰上 5 min，4℃、12000 r/min 离心 5 min 后取上清后于 -20℃ 保存备用。

提取的 DNA 用 NanoDrop 2000 分光光度计测定浓度，并于 -20℃ 冰箱保存备用。

2.4.2. RPA 引物、crRNA 及 ssDNA 荧光探针的设计及合成

在 GenBank 网站获得 KP 的 phoE 基因序列，DNA STAR 进行序列比对分析，选择基因的特异性保守位点，根据 RPA 引物设计原则，使用 Primer 5.0 软件设计 RPA 上下游引物(见表 1)。根据 Cas12a 蛋白 crRNA 识别靶序列的特性，在 RPA 扩增靶标基因序列中设计 crRNA (见表 2)。在 ssDNA 的两端加入荧光显色基团(FAM)与淬灭基团(BHQ1)制备荧光探针。

Table 1. The RPA primer sequences
表 1. RPA 引物序列表

引物序号	引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度
RPA-PhoE1	RPA-PhoE-1F	CTACCTGGCGACCATGTACTCTGAAACCCG	134 bp
	RPA-PhoE-1R	CATAGCCGAGGGACGGACGCAGACCGAAGT	
RPA-PhoE2	RPA-PhoE-2F	ATGTACTCTGAAACCCGCAAGATGACCCCG	121 bp
	RPA-PhoE-2R	CATAGCCGAGGGACGGACGCAGACCGAAGT	
RPA-PhoE3	RPA-PhoE-3F	CATGTACTCTGAAACCCGCAAGATGACCCC	122 bp
	RPA-PhoE-3R	CATAGCCGAGGGACGGACGCAGACCGAAGT	

Table 2. The crRNA primer sequences
表 2. crRNA 引物序列表

crRNA	引物名称	引物序列(5'-3')	碱基数
crRNA1	T7-12a-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAATTTCTACTAAGTGTAG	43
	Spacer-1-R	TCAAAGTTCTGCGCTTTGTTGGCATCTACACTTAGTAGAAATTCC	45
crRNA2	T7-12a-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAATTTCTACTAAGTGTAG	43
	Spacer-2-R	GATCAGCGGCGGCTTTGCCAACATCTACACTTAGTAGAAATTCCC	45

2.4.3. RPA 扩增体系的建立

PCR 验证引物特异性：以 KP 基因组 DNA 为模板，先用普通 PCR 方法，对设计的 RPA 引物特异性进行验证。PCR 反应采用 50℃、52℃、54℃、56℃、58℃、60℃ 共六个退火温度进行扩增。PCR 扩增体系(20 uL)包括：2 × ES Tag Master Mix (Dye) 10 uL，引物浓度 0.30 umol/L，DNA 模板 20 ng。反应条件：95℃ 5 min；94℃ 30 s，50℃~60℃退火 30 s，72℃ 30 s，共 35 个循环；72℃ 10 min。PCR 扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳验证扩增效果。

RPA 扩增：以 KP 基因组 DNA 为模板进行 RPA 扩增，RPA 扩增体系(50 uL)包括：溶解剂 20 uL，上下游引物(10 uM)各 2.5 uL，DNA 模板 2 uL，无酶水 21 uL。将上述预混液转移至冻干反应管中混匀并短暂离心，然后在管盖上加入 2 uL 激活剂，小心盖紧管盖，短暂振荡混匀并瞬时离心。RPA 反应条件为：37℃ 孵育 20 min。扩增结束后，用 PCR 纯化试剂盒纯化 RPA 产物，并进行琼脂糖凝胶电泳验证扩增效果。

2.4.4. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的建立

CRISPR/Cas12a 反式切割体系(20uL)包括：10xHOLMES Buffer 2 uL，LbCas12a Nuclease (250 nM) 0.5 uL，crRNA (10 uM) 0.5 uL，RPA 扩增产物 1 uL (10 ng)，ssDNA Reporter (10 uM) 1 uL，用无酶水补足体积至 20 uL。将上述溶液混匀后，在 qPCR 仪上，37℃，每隔 30 s 作为一个循环，采集一次荧光信号，采集时间为 30~40 min。

2.4.5. CRISPR/Cas12a 检测体系的优化

根据建立好的 CRISPR/Cas12a 反式切割体系，对体系中 crRNA、Cas12a、ssDNA 三个主要反应条件的浓度进行优化，从而确定 RPA-CRISPR/Cas12a 检测 KP 的最佳反应体系。

crRNA 浓度的优化：保持 CRISPR/Cas12a 反式切割体系其他参数不变，将 crRNA 浓度调整为 7 个浓度梯度，分别为 80 uM，40 uM，20 uM，10 uM，5 uM，2.5 uM，1.25 uM 进行 crRNA 的浓度优化。

Cas12a 浓度的优化：确定最佳的 crRNA 的浓度后，保持 CRISPR/Cas12a 反式切割体系其他参数不变，将 Cas12a 的浓度调整为 7 个浓度梯度，分别为 25 nM，50 nM，100 nM，150 nM，200 nM，250 nM，500 nM 进行 Cas12a 的浓度优化。

ssDNA 浓度的优化：确定最佳的 crRNA 和 Cas12a 的浓度后，保持 CRISPR/Cas12a 反式切割体系其他参数不变，将 ssDNA 的浓度调整为 7 个浓度梯度，分别为 10 uM，5 uM，4 uM，3 uM，2 uM，1 uM，0.5 uM 进行 ssDNA 的浓度优化。

2.4.6. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系灵敏度测试

将 KP 基因组 DNA 的 RPA 扩增产物浓度调整为 10 个浓度梯度，分 2.5×10^1 ng/uL， 5×10^0 ng/uL， 1×10^0 ng/uL， 2×10^{-1} ng/uL， 4×10^{-2} ng/uL， 8×10^{-3} ng/uL， 1.6×10^{-3} ng/uL， 3.2×10^{-4} ng/uL， 6.4×10^{-5} ng/uL， 1.28×10^{-5} ng/uL，进行 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系灵敏度测试。

2.4.7. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性验证

将绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜肺巴斯德杆菌-J 型、肺炎链球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌等 7 种致病菌进行 RPA 扩增，将扩增产物加到 CRISPR/Cas12a 检测体系中，以验证该体系的特异性。

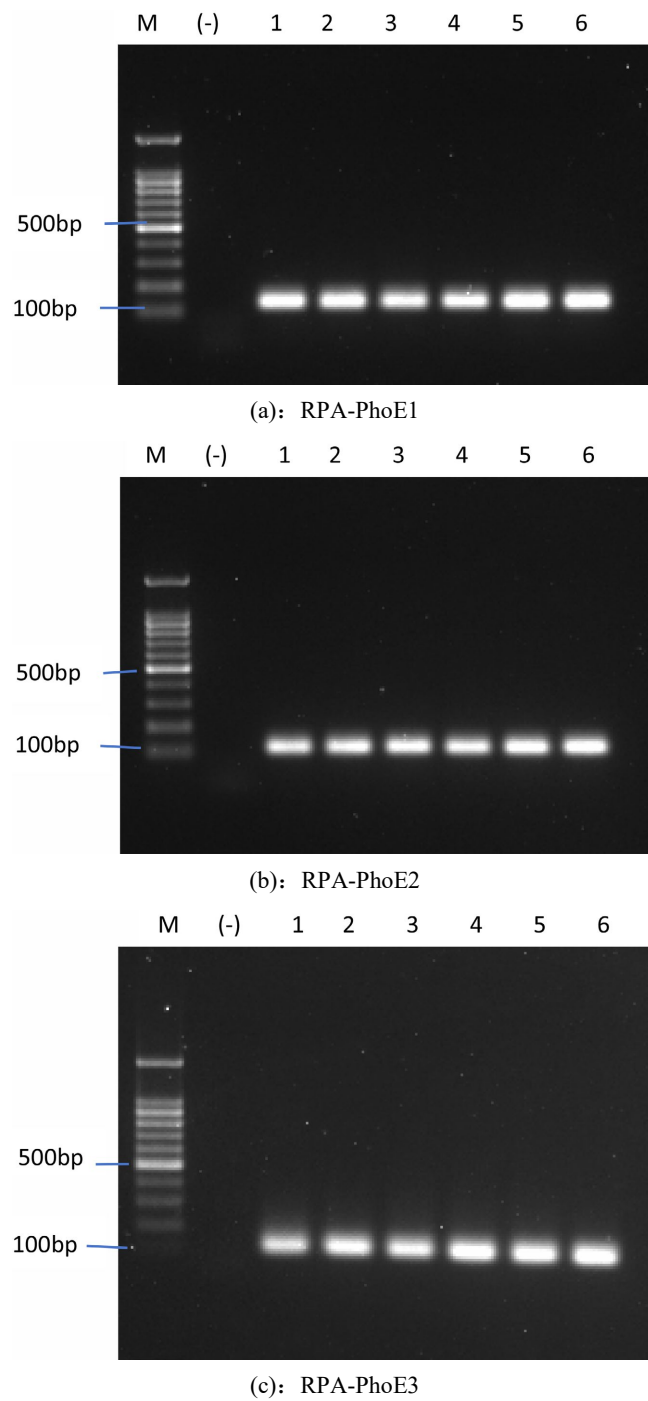
2.4.8. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的临床应用

采集隔离饲养的 KP 感染阳性的实验小鼠的新鲜粪便。分别采取两种方法提取粪便中的基因组 DNA，随后进行 RPA 扩增。将扩增产物加到 CRISPR/Cas12a 检测体系中，进行该体系的临床检测应用。

3. 结果与分析

3.1. PCR 扩增结果

将设计好的 3 对 RPA 引物先用普通 PCR 方法进行引物特异性验证。PCR 结果显示(如图 1)，三对引物在 50℃~60℃退火温度下，扩增条带单一，无特异性条带产生，均可用于 RPA 扩增。



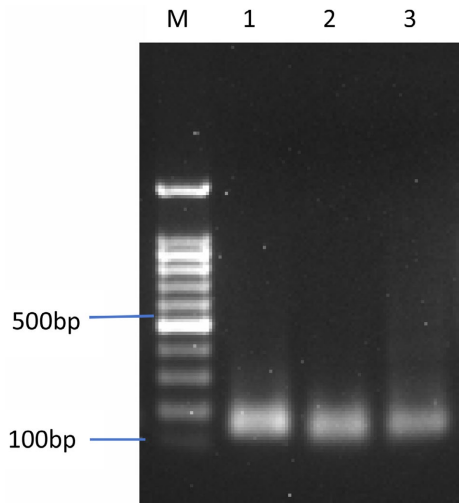
M: 100 bp DNA Ladder; 1~6: 退火温度分别为 50℃~60℃。

Figure 1. Specificity verification of RPA primers

图 1. RPA 引物特异性验证

3.2. RPA 扩增结果

将 PCR 验证好的 RPA 引物，进行 RPA 扩增。结果显示(如图 2)，3 对 RPA 引物均可成功扩增出与目的条带大小相符的 DNA 片段，且第一对引物扩增效果最好，因此选用 RPA-PhoE1 引物进行后续实验。



M: 100 bp DNA Ladder; 1~3: RPA-PhoE1; RPA-PhoE2; RPA-PhoE3。

Figure 2. Amplification results of the detection target RPA for *Klebsiella pneumoniae*

图 2. 肺炎克雷伯杆菌检测靶标 RPA 扩增结果

3.3. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的建立

以 KP 基因组 DNA 为模板,以 RPA-PhoE1 为引物先进行 RPA 扩增。然后将扩增产物加入到 CRISPR/Cas12a 检测体系中,用设计好的 crRNA1 和 crRNA2 两种 crRNA 分别进行切割反应,同时将产品自带的 Cas12a control target and crRNA 设为阳性对照,用无酶水设为阴性对照。结果显示(如图 3),利用 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系能够成功检测到目标靶 DNA 的荧光信号,且 crRNA1 检测效果比 crRNA2 更好,荧光值更高,因此后续均选用 crRNA1 进行实验。

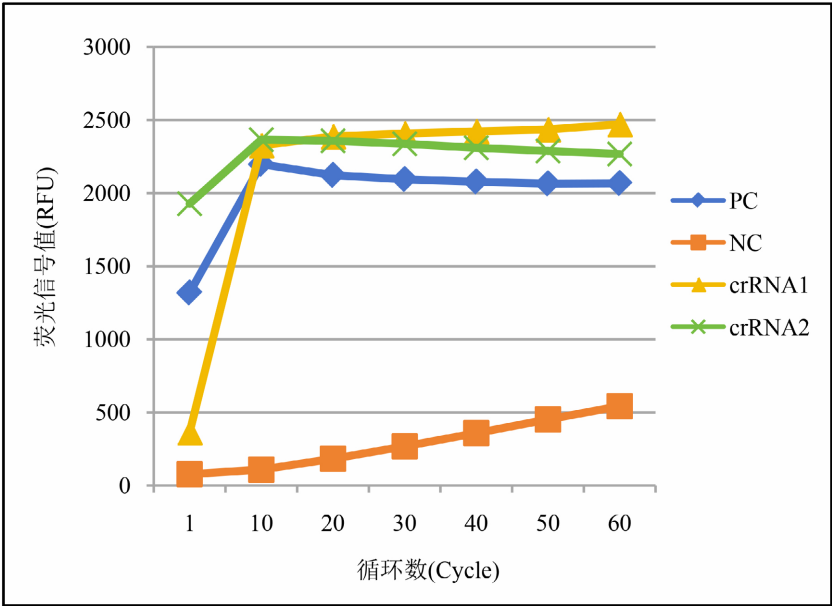


Figure 3. Amplification of the RPA-CRISPR/Cas12a detection system

图 3. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的扩增

3.4. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的优化

以 KP 基因组 DNA 为模板, 以 RPA-PhoE1 为引物进行 RPA 扩增。将扩增产物作为模板, 加入到 CRISPR/Cas12a 检测体系中, 然后对体系中 crRNA、Cas12a 和 ssDNA 三个主要参数的浓度进行优化, 达到最佳检测效果。首先进行 crRNA 的浓度优化, 由结果(如图 4)可知, 体系中 crRNA 浓度为 40 μM 时, 检测到的荧光信号值最高。然后进行 Cas12a 的浓度优化, 由结果(如图 5)可知, 体系中 Cas12a 浓度在 250 nM 时, 检测到的荧光信号值最高。确定好体系中 crRNA 和 Cas12a 的最佳浓度后, 最后进行 ssDNA 的浓度优化。由结果(如图 6)可知, 当 ssDNA 探针浓度在 10 μM 时, 相对于其他测试组, 荧光信号值最高。

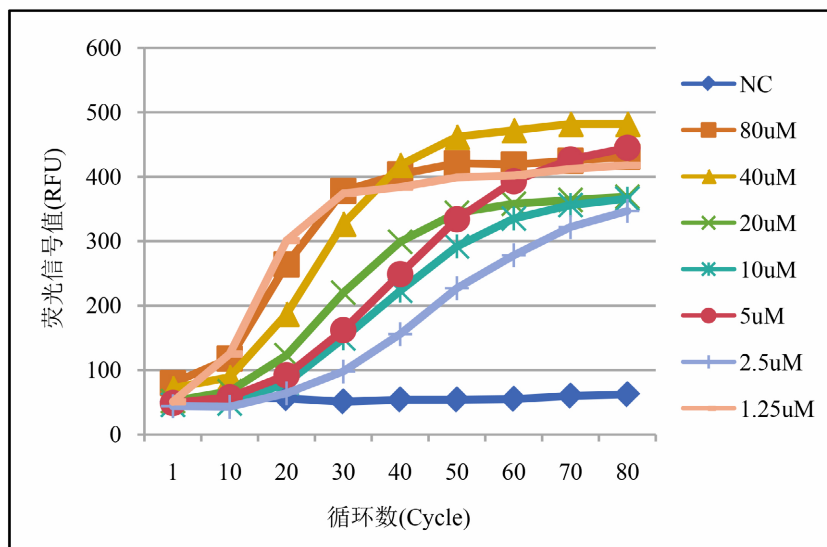


Figure 4. Fluorescence signal intensities of different concentrations of crRNA in the RPA-CRISPR/Cas12a detection system

图 4. 不同浓度 crRNA 在 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系中的荧光信号强度

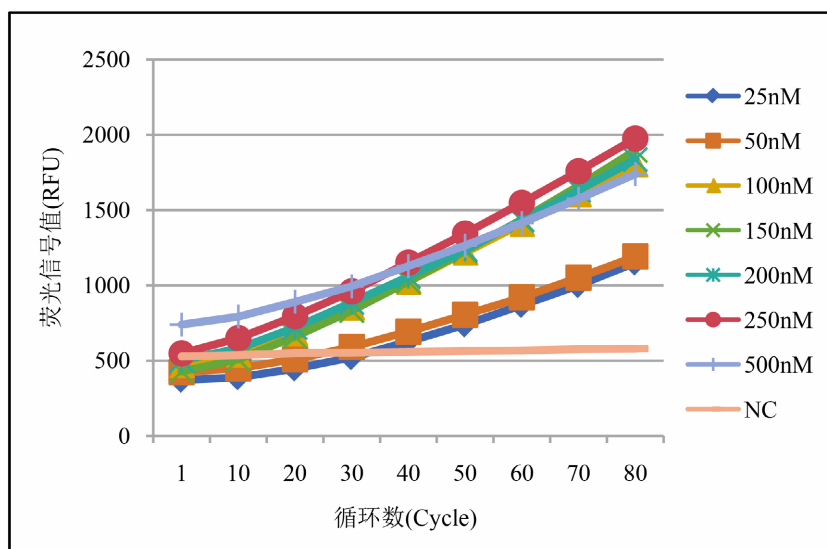


Figure 5. Fluorescence signal intensity of different concentrations of Cas12a in the RPA-CRISPR/Cas12a detection system

图 5. 不同浓度 Cas12a 在 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系中的荧光信号强度

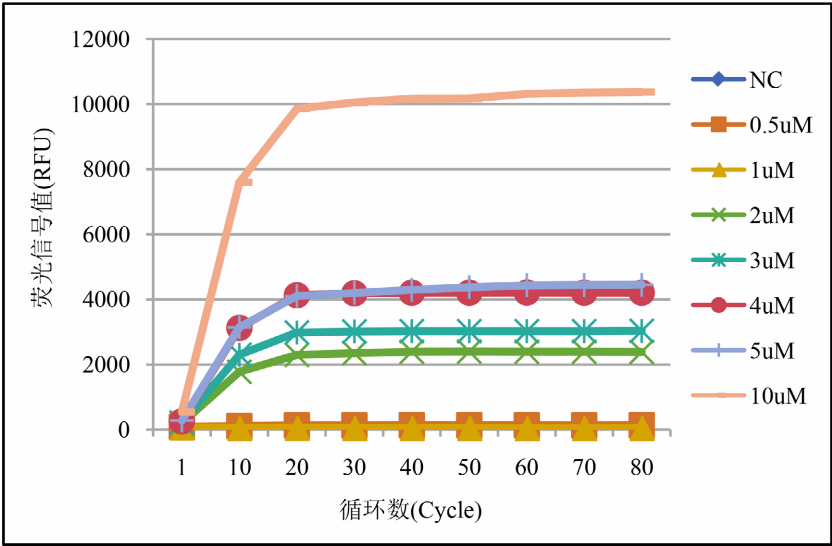


Figure 6. Fluorescence signal intensity of ssDNA at different concentrations in the RPA-CRISPR/Cas12a detection system

图 6. 不同浓度 ssDNA 在 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系中的荧光信号强度

3.5. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系灵敏度测试

将不同浓度的 KP 基因组 DNA 的 RPA 产物作为模板，加入到 CRISPR/Cas12a 体系中，测试 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的灵敏度。由结果(如图 7)可知，25 ng~ 1.28×10^{-5} 各个浓度梯度的检测模板均能检测出较高的荧光信号，表明利用该体系检测 KP 的 PhoE 基因检测灵敏度可达 1×10^{-5} 。

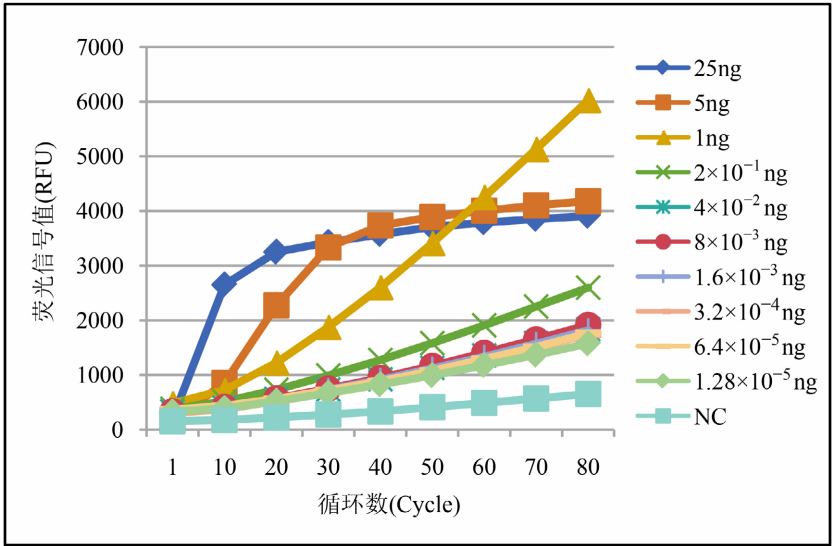


Figure 7. Fluorescence signal intensities of RPA products at different concentrations in the RPA-CRISPR/Cas12a detection system

图 7. 不同浓度的 RPA 产物在 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系中的荧光信号强度

3.6. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性验证

将绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜肺巴斯德杆菌-J 型、肺炎链球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌、肺

炎克雷伯杆菌等 7 种致病菌的基因组 DNA 先进行 RPA 扩增, 然后将扩增产物加到 CRISPR/Cas12a 检测体系中, 以验证该体系的特异性。由结果(如图 8)可知, 只有肺炎克雷伯杆菌的 RPA 产物能成功检测到较高的荧光信号, 其他细菌和阴性对照一样, 荧光信号值很低, 说明建立的 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系能准确的识别和切割 KP 的 PhoE 基因, 具有良好的特异性。

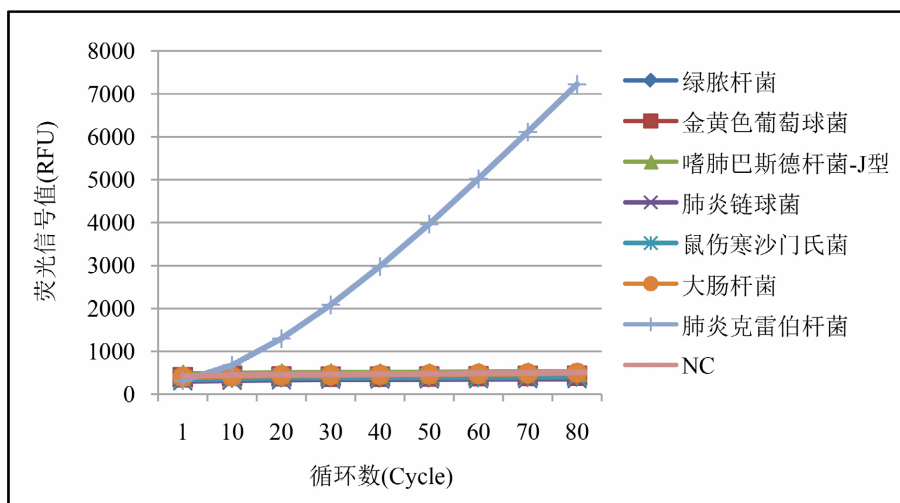


Figure 8. Specificity verification of the RPA-CRISPR/Cas12a detection system

图 8. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性验证

3.7. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系在实验动物临床检测中的应用

分别用培养煮沸法和试剂盒方法提取 KP 感染阳性实验小鼠的粪便 DNA, 进行 RPA 扩增后, 用 CRISPR/Cas12a 体系进行检测。由结果(如图 9)可知, 和产品自带的阳性对照(Cas12a control target and crRNA)相比较, 两种小鼠粪便 DNA 提取方法均能检测到较高的荧光信号。该方法不但适用于试剂盒法提取临床样本的 DNA, 同样也适用于简单快速的煮沸法提取小鼠粪便中的 DNA。表明建立的 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系应用于实验动物感染 KP 的临床检测中, 特异性好, 灵敏度高。

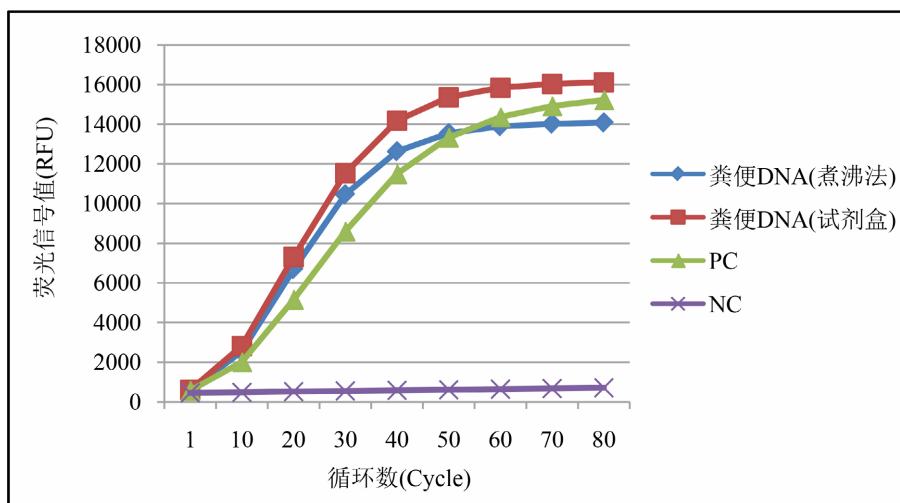


Figure 9. Clinical Detection application of RPA-CRISPR/Cas12a detection system

图 9. RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系临床检测应用

4. 分析与讨论

实验动物广泛应用于医学、生命科学、药学和公共卫生、食品科学等研究领域。近几年来随着实验动物的需求量和饲养规模日益扩大,检测数量也随之加大,检测任务越来越严重[16]。目前实验动物感染肺炎克雷伯杆菌的检测方法主要集中于传统培养法和 PCR、qPCR 等常规分子检测方法。这些方法虽然经典、敏感性高、特异性强,已被广泛应用于实验动物的日常健康监测中。但是,实验动物突发疾病或者异常死亡,需要快速检测来辅助兽医进行临床疾病诊断时,建立简单快速、灵敏特异的检测方法就显得尤为重要。

实验小鼠肠道中每克肠内容物含有上亿个菌体,可分为 10~15 个属,上百个种。肠道正常菌群的主要菌属有双歧杆菌、拟杆菌(类杆菌)、肠球菌、乳杆菌、梭杆菌、真杆菌[17]。在如此庞杂的肠道菌群中,能够排除其他细菌和物质的干扰,灵敏、特异的检测到肺炎克雷伯杆菌特异性的靶标 DNA,对粪便样本的处理和 DNA 的提取以及检测方法的建立都提出了较高的挑战。

近几年, Doudna 研究组和张锋研究团队等相继将 CRISPR/Cas 系统应用于核酸检测领域。Cas12a 具有非特异性切割单链 DNA 靶标的附带切割特性,利用此特性开发了基于 Cas12a 的分子检测平台——DETECTR。DETECTR 利用 RPA 等温扩增靶标 DNA,扩增产物与 Cas12a/crRNA 混合后启动特定靶标切割,并激活 Cas12a 的附带切割活性,反应体系中 DNA 荧光报告探针即可释放荧光信号[18]。CRISPR/Cas 通过与重组酶聚合酶扩增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)等温扩增反应相结合,实现了单个核酸分子的检测[19]。

CRISPR/Cas 核酸检测技术因其具有快速、准确和对环境、仪器、操作人员要求低等优点,已广泛应用于传染病(细菌、病毒等)以及遗传病和肿瘤相关(SNP、miRNAs 等)、耐药性微生物、寄生虫感染诊断、农业和转基因作物等领域[20]。但是目前在实验动物病原微生物监测领域还没有相关报道,因此利用 CRISPR/Cas 核酸检测技术建立实验动物的病原微生物的快速检测方法将是该领域的一个新的突破。

本研究首先用 PCR 方法和 RPA 方法筛选出最佳的 RPA 引物,然后通过优化 RPA-CRISPR-Cas12a 检测体系,摸索出该体系三个重要参数的最适反应浓度 crRNA (40 μ M)、Cas12a (250 nM)和 ssDNA (10 μ M),获得最佳检测反应体系。通过灵敏度测试和特异性验证,该体系对肺炎克雷伯杆菌的检测能够达到 10~5 ng 的灵敏度,且特异性好,与实验动物常见的致病菌无交叉反应。应用该体系进行临床检测应用时,通过培养煮沸法和粪便基因组 DNA 提取法两种方法提取 KP 感染阳性小鼠粪便中的 DNA,均能被成功检测到较高的荧光信号。说明快速简单的培养煮沸法利用该体系,能够达到和试剂盒提取方法一样的检测效果。培养煮沸方法不仅操作简便、缩短样本 DNA 提取时间和提高 KP 的检出准确率,还能大大节省检测成本。

本研究建立的 RPA-CRISPR-Cas12a 检测体系,不但灵敏度高、特异性好,能够有效地排除小鼠粪便中其他细菌和物质的干扰,高效的检出 KP 感染的低菌量实验动物样本。而且不需要复杂的实验操作,在 2 小时内即能完成实验动物粪便样本 DNA 的快速检测。该体系的建立,在实验动物病原微生物检测中有重要的应用前景。利用该体系逐步建立实验动物 SPF 国标规定的必须要排除的其他病原微生物的快速检测方法,最终达成对实验动物活体实现实时快速、准确简便的病原体健康监测,并应用到新进隔离检疫动物的快速检测中,为兽医临床疾病诊断提供重要的检测依据,为各科研人员提供质量保障的 SPF 级实验动物。

致 谢

感谢上海交通大学实验动物中心检测平台给予本项目的仪器设备使用支持。感谢给予转载和引用权

的资料、文献、研究思想的所有作者。

基金项目

上海交通大学校级决策咨询课题(编号: JCZXSJB2023-16)。

参考文献

- [1] 张诗渝, 黄克和. 肺炎克雷伯杆菌的分离鉴定及其对小鼠的致病性研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [2] 魏杰, 林建伟, 付瑞, 等. 2009-2013 年北京地区实验动物质量抽检结果分析[J]. 实验动物科学, 2014, 31(2): 1-6.
- [3] 葛文平, 张旭, 高翔, 等. 我国商业化 SPF 级小鼠病原体污染分析[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(3): 65-68.
- [4] 李丹, 袁梦君, 王恬, 等. 鼠伤寒沙门氏菌 CRISPR/Cas12a 检测方法的建立与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(12): 143-150.
- [5] Craw, P. and Balachandran, W. (2012) Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies for Point-of-Care Diagnostics: A Critical Review. *Lab on a Chip*, **12**, 2469-2486. <https://doi.org/10.1039/c2lc40100b>
- [6] Hassan, M.M., Ranzoni, A. and Cooper, M.A. (2018) A Nanoparticle-Based Method for Culture-Free Bacterial DNA Enrichment from Whole Blood. *Biosensors and Bioelectronics*, **99**, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.057>
- [7] Chertow, D.S. (2018) Next-Generation Diagnostics with Crispr. *Science*, **360**, 381-382. <https://doi.org/10.1126/science.aat4982>
- [8] Li, Y., Li, S., Wang, J. and Liu, G. (2019) Crispr/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. *Trends in Biotechnology*, **37**, 730-743. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.005>
- [9] Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., *et al.* (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes. *Science*, **315**, 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- [10] Xing, G., Shang, Y., Wang, X., Lin, H., Chen, S., Pu, Q., *et al.* (2023) Multiplexed Detection of Foodborne Pathogens Using One-Pot Crispr/Cas12a Combined with Recombinase Aided Amplification on a Finger-Actuated Microfluidic Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **220**, Article ID: 114885. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114885>
- [11] Chen, M., Calin, G.A. and Meng, Q.H. (2014) Circulating MicroRNAs as Promising Tumor Biomarkers. In: *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier, 189-214. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.09.007>
- [12] Finotti, A., Fabbri, E., Lampronti, I., Gasparello, J., Borgatti, M. and Gambari, R. (2019) MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs in Genetic Diseases. *Molecular Diagnosis & Therapy*, **23**, 155-171. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0380-6>
- [13] Bonini, A., Poma, N., Vivaldi, F., Kirchhain, A., Salvo, P., Bottai, D., *et al.* (2021) Advances in Biosensing: The Crispr/Cas System as a New Powerful Tool for the Detection of Nucleic Acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **192**, Article ID: 113645. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113645>
- [14] Swarts, D.C., van der Oost, J. and Jinek, M. (2017) Structural Basis for Guide RNA Processing and Seed-Dependent DNA Targeting by Crispr-Cas12a. *Molecular Cell*, **66**, 221-233.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.016>
- [15] Stella, S., Alcón, P. and Montoya, G. (2017) Structure of the Cpf1 Endonuclease R-Loop Complex after Target DNA Cleavage. *Nature*, **546**, 559-563. <https://doi.org/10.1038/nature22398>
- [16] 张越华, 郑秀青. SPF 级实验小鼠 4 种致病菌多重 PCR 方法的建立及优化[J]. 实验动物科学, 2018, 35(4): 49-55.
- [17] 袁杰利, 主编. 肠道菌群与微生态调节剂[M]. 大连: 大连海事大学出版社, 1996: 1-19, 44-57.
- [18] Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., *et al.* (2018) CRISPR-Cas12a Target Binding Unleashes Indiscriminate Single-Stranded DNase Activity. *Science*, **360**, 436-439.
- [19] 王雅轩, 朱晓雁, 苏建荣. CRISPR/Cas12a 系统在病原体检测方面的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(9): 839-844.
- [20] 王紫怡, 黄迪, 徐志南, 等. CRISPR 核酸检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6711-6719.