

[文章编号] 1671-587X(2025)05-1399-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250529

LAMP联合CRISPR/Cas12a系统检测副溶血性弧菌*tlh*基因方法的建立及其评价

周钰娇, 杨继飞, 刘岩, 丁文博, 张先宇, 杨建宇, 高林然, 赵云冬, 孙丽媛
(北华大学医学技术学院临床病原学检验教研室, 吉林 吉林 132013)

[摘要] **目的:** 建立环介导等温扩增(LAMP)和簇状规则间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关蛋白12a(Cas12a)(CRISPR/Cas12a)系统相结合的病原微生物快速检测方法,并评价其检测副溶血性弧菌(*Vp*)不耐热溶血毒素(*tlh*)基因的效果。**方法:** 以*Vp*的*tlh*基因作为靶基因,设计LAMP引物和CRISPR RNA(crRNA),构建并优化LAMP-CRISPR检测体系各成分最佳浓度配比,以蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌为对照组,建立快速检测*Vp tlh*基因的LAMP-CRISPR/Cas12a方法,并对该方法的特异性、灵敏度、重复性和阳性符合率进行评价。**结果:** 该方法能特异性检出*Vp*,蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌均为阴性结果。*Vp* DNA提取浓度为 $190.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时吸光度(A)(260)/A(280)比值为1.84。在定量PCR(qPCR)仪 37°C 、80个循环、40 min反应条件下,LAMP-CRISPR/Cas12a体系中Cas12a蛋白和crRNA的浓度为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时肉眼亮度及相对荧光强度峰高,检测*Vp* DNA浓度灵敏度可达 $10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;重复性试验表明,不同实验人员在不同实验环境、不同时间重复检测结果一致。**结论:** 建立的LAMP-CRISPR/Cas12a方法可以快速检测*Vp*的*tlh*基因,其灵敏度高、特异度强,可实现现场短时间的可视化检测。

[关键词] 副溶血性弧菌; CRISPR-Cas12a系统; *tlh*基因; 环介导等温扩增; 核酸检测

[中图分类号] R446.5 **[文献标志码]** A

Establishment of LAMP combined with CRISPR/Cas12a system for detecting *tlh* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its evaluation

ZHOU Yujiao, YANG Jifei, LIU Yan, DING Wenbo, ZHANG Xianyu, YANG Jianyu, GAO Linran,
ZHAO Yundong, SUN Liyuan

(Department of Clinical Pathogen Laboratory, School of Medical Technology, Beihua University,
Jilin 132013, China)

ABSTRACT Objective: To establish a rapid detection method for pathogenic microorganisms by combining loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 12a (Cas12a) (CRISPR-Cas12a) system, and to evaluate its

[收稿日期] 2024-10-08 [录用日期] 2024-12-12

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(20230204085YY, 20230202059NC); 北华大学研究生创新计划项目([2023]071)

[作者简介] 周钰娇(1998—),女,吉林省吉林市人,在读硕士研究生,主要从事食源性微生物快速检测方面的研究。

[通信作者] 孙丽媛,教授,硕士研究生导师(E-mail: jlsunliyuan@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部,开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

efficacy for detecting the thermolabile hemolysin (*tlh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*). **Methods:** Using the *tlh* gene of *Vp* as the target gene, LAMP primers and CRISPR RNA (crRNA) were designed to construct and optimize the optimal concentration ratio of each component in the LAMP-CRISPR detection system. *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* were used as control groups, and the specificity, sensitivity, reproducibility and positive conformity rate were verified to establish a rapid LAMP-CRISPR/Cas12a method for detecting the *tlh* gene of *Vp*. **Results:** The method specifically detected *Vp*, while *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* yielded negative results. The DNA extraction concentration of *Vp* was $190.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with an A(260)/A(280) ratio of 1.84. Under the reaction conditions of $37 \text{ }^\circ\text{C}$ with 80 cycles for 40 min using quantitative PCR (qPCR) method, when the concentrations of Cas12a protein and crRNA in the LAMP-CRISPR/Cas12a system were $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the visual brightness and relative fluorescence intensity peaks were high. The sensitivity of LAMP CRISPR/Cas12a for detecting *Vp* DNA concentration could reach $10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The reproducibility test results showed that different experimenters had consistent results in different experimental environments and times. **Conclusion:** The established LAMP-CRISPR/Cas12a method can rapidly detect the *tlh* gene of *Vp* with high sensitivity and specificity, and can achieve short-term visual detection in the field.

KEYWORDS *Vibrio parahaemolyticus*; CRISPR-Cas12a system; *tlh* gene; Loop-mediated isothermal amplification; Nucleic acid test

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vp*) 是一种常见的食源性病原体, 主要存在于海产品和盐渍食品^[1]; 该菌可引发食物中毒并导致急性肠胃炎, 患者病情发展迅速, 不及时诊断干预有致死风险^[2-3]。*Vp* 基因包括不耐热溶血毒素 (*tlh*) 基因、耐热直接溶血素 (*tdh*) 基因和溶血相关溶血素 (*trh*) 基因, 其中 *tlh* 基因为该菌特有基因, 是被广泛用于检测 *Vp* 的靶基因^[4]。目前, 用于检测 *Vp* 引起食物中毒的国家标准方法为平板培养法^[5], 然而该方法检测周期长、操作繁琐且对工作人员专业性要求较高。其他快速检测技术包括质谱法^[6]、分子生物学法^[7] 和免疫学法^[8], 但均具有一定局限性。近年新兴的簇状规则间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /CRISPR 相关 (CRISPR-associated, Cas) 系统已成为病原微生物核酸检测技术的研发热点, 相关诊断方法日渐普及, 包括重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)-CRISPR 联用技术和环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)-CRISPR 联用技术^[9] 等。其中 LAMP-CRISPR 法因其较低的酶依赖性, 具有更高效和灵敏的特点^[10]。本研究对传统 LAMP-CRISPR 方法进行改良, 建立一种 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法, 可快速精准检测 *Vp* 的 *tlh* 基因, 为食品安全监控和公共卫生管理提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株、主要试剂和仪器

Vp 菌株 ATCC17802 购自广东环凯微生物有限公司, 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌均为北华大学医学技术学院病原微生物检验研究室保存菌种。2×Taq PCR Master Mix 购自北京天根生化科技有限公司, 10×LbCas12a 裂解缓冲液、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LbCas12a 核酸酶、 $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ crRNA 和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 报告分子均购自广州艾迪基因科技有限责任公司, 通用型等温扩增 PCR 混合液购自生工生物工程(上海)股份有限公司。生物安全柜(浙江苏净净化设备有限公司), 细菌培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂), BSA124S 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司), ETC811 PCR 扩增仪(苏州东胜兴业科学仪器有限公司), DS-11FX+ 微量核酸蛋白检测仪(美国 Denovix 公司), UV752N 紫外透射仪(上海佑科仪器仪表有限公司)。

1.2 煮沸法提取菌株 DNA

复苏 *Vp*、蜡样芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌, 取 $50 \mu\text{L}$ ddH₂O 于 EP 管中, 用接种环挑取标准菌株, 紧贴管壁于液面处研磨, 至液体浑浊, 形成菌液。轻微振荡混匀后放置金属浴 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 10 min, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 10 min, $12\ 000 \text{ g}$ 离心 10 min, 弃去沉淀, 分离上清, 即为目的 DNA, 依次分装, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。煮沸法提取 DNA,

检测 260 和 280 nm 处吸光度 (A) 值, 微量核酸蛋白检测仪测定提取 DNA 的浓度和纯度, 以 A(260)/A(280) 的比值代表 DNA 纯度。

1.3 引物和探针设计

以 *Vp* 的 *tlh* 基因为靶基因设计 LAMP 特异性引

物和 CRISPR RNA (crRNA) 及单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 探针, LAMP 引物由生工生物工程技术服务 (上海) 股份有限公司合成, crRNA 及 ssDNA 探针由广州艾迪基因科技有限责任公司合成。引物和探针序列见表 1。

表 1 LAMP 特异引物和 *Vp* 的 crRNA 及 ssDNA 探针序列

Tab. 1 Sequences of LAMP specific primers and crRNA and ssDNA probes for *Vp*

Primer	Sequence(5'-3')
LAMP- <i>tlh</i>	F3:GCGCAAGGTTACAACATCAC
	B3:AAACTTCTCAGCACCAGACG
	FIP:GCGTTCACGAAACCGTGCTCTTTGATACTCACGCCCTTGTTCC
	BIP:TTGGACATCAACCGCTCATCGTGCACACTCAGAGCGCAAT
crRNA	GGGUAUUUCUACUAAGUGUAGAUCUGGAGCACCAGACCGUUGU
ssDNA	TTTTTTT

1.4 LAMP-CRISPR 反应体系优化

LAMP 实验设置温度梯度, 分别为 56 °C、58 °C、60 °C 和 62 °C; 设置内、外引物 4 种浓度, 即 1:1、2:1、4:1 和 8:1; 设置反应体系中 Bst DNA 聚合酶的不同加入量依次为 0.5、1.0 和 1.5 μL。对每个优化项目设置 1 个空白基因对照组, 以确定最适宜的反应体系。

待 LAMP 扩增产物后, 分别加入 Cas12a 蛋白、crRNA 和 ssDNA 探针, 37 °C 反应 5 min。逐步调整 crRNA 和 Cas12a 蛋白的浓度, 分别为 20、30、40 和 50 nmol·L⁻¹, 通过电泳条带和荧光信号强度优化反应体系。确定 LAMP-CRISPR 反应体系后, 在 LAMP 扩增产物中加入 10× 裂解缓冲液、1 μmol·L⁻¹ Cas12a、500 nmol·L⁻¹ crRNA、2 μmol·L⁻¹ ssDNA 和一定量的 DEPC H₂O, 在定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 仪 37 °C、80 个循环、反应 40 min 后, 观察电泳条带和荧光信号强度来评价 LAMP-CRISPR 方法^[11]。

1.5 LAMP-CRISPR 方法学评价

1.5.1 特异性评价 依次将提取的 *Vp*、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和蜡样芽孢杆菌 DNA 原液稀释至 10 mg·L⁻¹, 按照“1.4”步骤中的最佳反应体系进行 LAMP-CRISPR 反应, 采用琼脂糖凝胶电泳与紫外透视仪的实时荧光数据评价特异性。

1.5.2 灵敏度评价 将 *Vp* 的 DNA 模板分别稀释 8 个不同浓度梯度 (10⁻⁸ mg·L⁻¹~10² mg·L⁻¹), 按照“1.4”步骤中的最佳反应体系进行 LAMP-CRISPR 反应, 采用琼脂糖凝胶电泳与紫外透视仪

的实时荧光数据评价灵敏度。

1.5.3 重复性评价 分别在 3 个不同实验室由 3 名不同检测人员操作的条件下, 按照“1.4”步骤中的最佳反应体系进行 LAMP-CRISPR 反应, 采用琼脂糖凝胶电泳与紫外透视仪的实时荧光数据评价重复性。

1.5.4 阳性符合率检验 按照“1.4”中的最佳反应体系进行 LAMP-CRISPR 反应检测模拟标本, 并将检测结果与实时荧光 qPCR (real-time fluorescence qPCR, RT-qPCR) 检测结果进行对比, 计算阳性符合率。阳性符合率 = [真阳性数 / (真阳性数 + 假阴性数)] × 100%。

2 结果

2.1 菌株 DNA 提取纯度和浓度

提取菌株基因组 DNA 的 A(260)/A(280) 比值均在 1.8~2.0, 且 DNA 浓度均超过 150 mg·L⁻¹。见表 2。满足 PCR 等扩增实验要求。

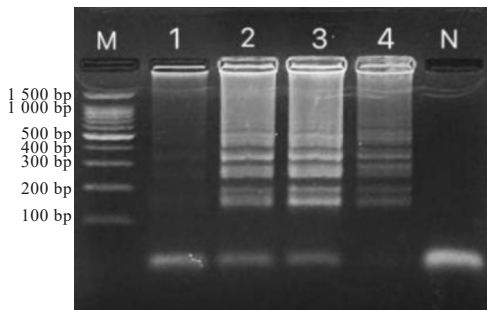
表 2 各菌株 DNA 提取纯度和浓度

Tab. 2 DNA extraction purities and concentrations of each bacterial strain

Bacterial strain	A(260)/A(280)	Concentration [ρ _B /(mg·L ⁻¹)]
<i>Vp</i>	1.84±0.01	190.67±0.05
<i>Bacillus cereus</i>	1.88±0.02	248.26±2.45
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.95±0.01	155.87±4.70
<i>Escherichia coli</i>	1.82±0.03	177.64±3.35

2.2 LAMP-CRISPR 实验最佳条件和反应体系

LAMP 实验结果显示: 反应温度为 60 °C 时条带最清晰 (图 1); 内、外引物比例为 4 : 1 和 8 : 1 时可见清晰条带 (图 2); Bst DNA 聚合酶加入量为 0.5、1.0 和 1.5 μL 时均可见清晰条带 (图 3)。因此最佳实验条件确定为反应温度 60 °C, 内、外引物比例为 4 : 1 且 Bst DNA 聚合酶加入量为 0.5 μL 。后续 LAMP 实验总反应体系 (25 μL) 设定为: 2 \times LAMP Mix 12.5 μL , 外引物 F3 和 B3 各 0.5 μL , 内引物 FIP 和 BIP 各 2 μL , DNA 2 μL , Bst DNA 聚合酶 0.5 μL , DEPC 水 5 μL 。

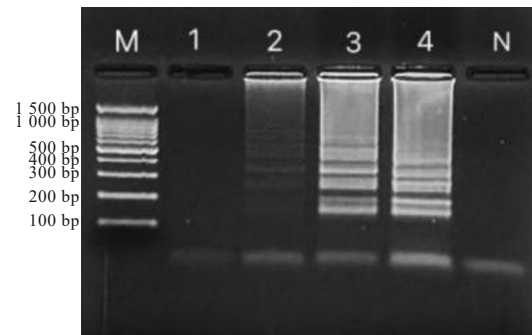


M: 100 bp marker; Lane 1: 56 °C; Lane 2: 58 °C; Lane 3: 60 °C; Lane 4: 62 °C; N: Blank control.

图 1 LAMP 最适反应温度优化

Fig. 1 Optimization of optimal reaction temperature for LAMP

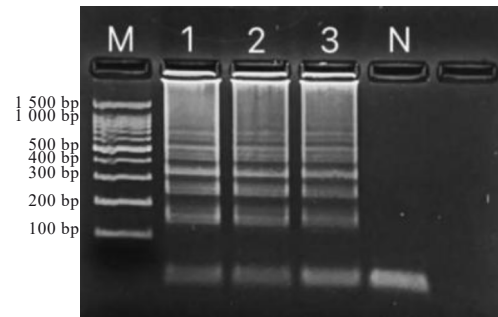
LAMP-CRISPR 反应体系优化结果显示: Cas12a 蛋白和 crRNA 浓度设定为 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 320 nm 紫外光下肉眼荧光亮度和荧光仪检测相对



M: 100 bp marker; Lane 1: 1:1; Lane 2: 2:1; Lane 3: 4:1; Lane 4: 8:1; N: Blank control.

图 2 LAMP 最适引物比优化

Fig. 2 Optimization of optimal primer ratio for LAMP

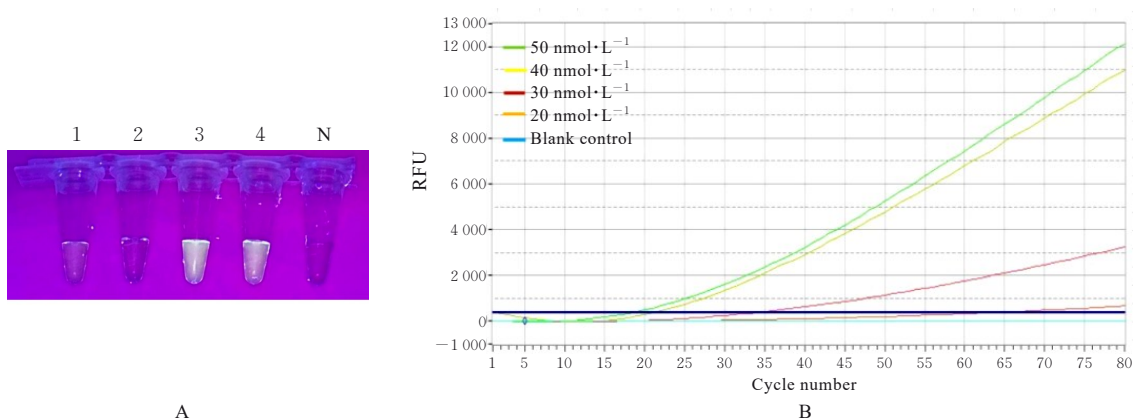


M: 100 bp marker; Lane 1: 0.5 μL ; Lane 2: 1.0 μL ; Lane 3: 1.5 μL ; N: Blank control.

图 3 LAMP Bst DNA 聚合酶加入量优化

Fig. 3 Optimization of Bst DNA polymerase dosage for LAMP

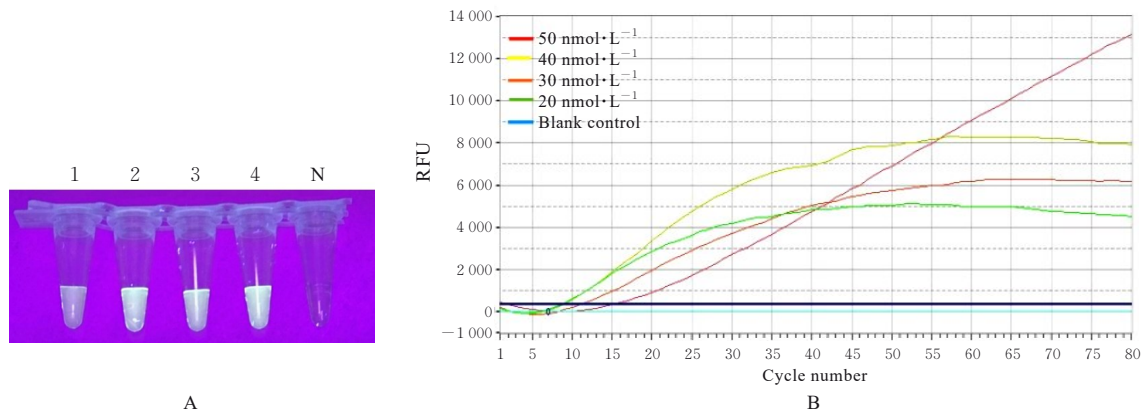
荧光强度值均最高。见图 4 和 5。基于优化结果, LAMP-CRISPR 最佳反应体系设定见表 3。



A: Visualization results under 320 nm ultraviolet light (1: 20 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 2: 30 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: 40 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 4: 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; N: Blank control); B: Amplification fluorescence curves.

图 4 LAMP-CRISPR 反应中 Cas12a 蛋白最佳终浓度的确定

Fig. 4 Determination of optimal final concentration of Cas12a protein in LAMP-CRISPR reactions



A: Visualization results under 320 nm ultraviolet light (1: $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2: $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3: $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; N: Blank control); B: Amplification fluorescence curves.

图5 LAMP-CRISPR反应中crRNA最佳终浓度的确定

Fig. 5 Determination of optimal final concentration of crRNA in LAMP-CRISPR reactions

表3 LAMP-CRISPR最佳反应体系

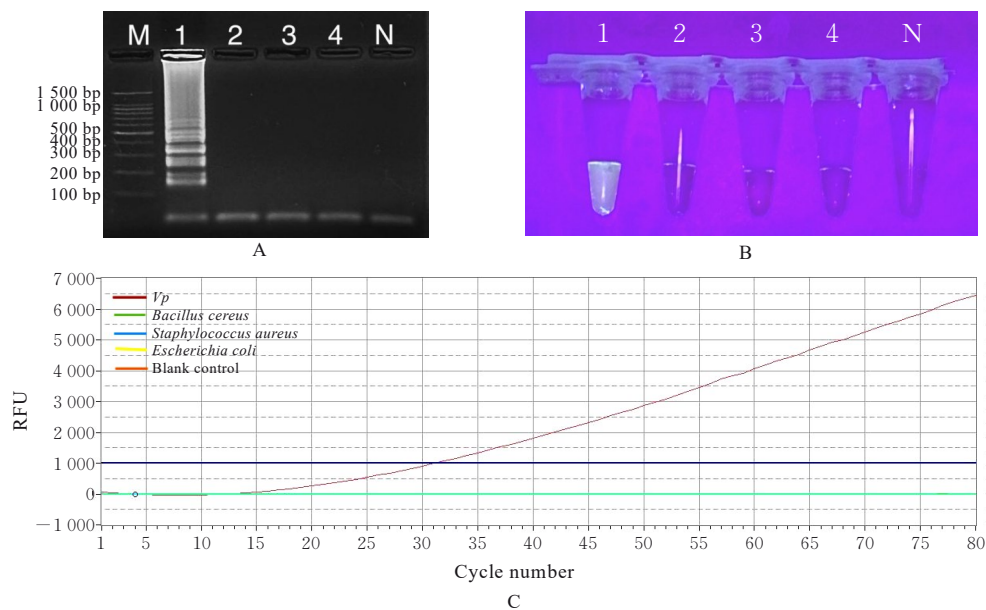
Tab. 3 Optimal reaction system of LAMP-CRISPR

Reaction system	Volume ($V/\mu\text{L}$)	Reaction condition
$10\times$ Cleavage buffer	3.0	Temperature: 37°C 30 s per cycle 80 cycles 40 min
$1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cas12a	1.5	
$500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ crRNA	2.4	
$2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ssDNA	6.0	
$1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA	2.0	
DEPC H_2O	15.1	

2.3 LAMP-CRISPR方法学评价

2.3.1 特异性评价 对不同菌株开展LAMP-CRISPR反应方法检测, 仅*Vp*显示出清晰电泳条带和较强荧光信号, 其他菌株和空白对照均无电泳条带及荧光信号, 证明该方法对*Vp*检测具有良好特异性。见图6。

2.3.2 灵敏度评价 将*Vp*的基因组DNA进行倍比稀释, 结果显示: DNA浓度稀释至 $10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 琼脂糖凝胶电泳仍可观察到清晰目的条带, 且



A: LAMP-CRISPR electrophoretic result (M: 100 bp marker; Lane 1: *Vp*; Lane 2: *Bacillus cereus*; Lane 3: *Staphylococcus aureus*; Lane 4: *Escherichia coli*; N: Blank control); B: Visualization results under 320 nm ultraviolet light (1: *Vp*; 2: *Bacillus cereus*; 3: *Staphylococcus aureus*; 4: *Escherichia coli*; N: Blank control); C: Amplification fluorescence curves.

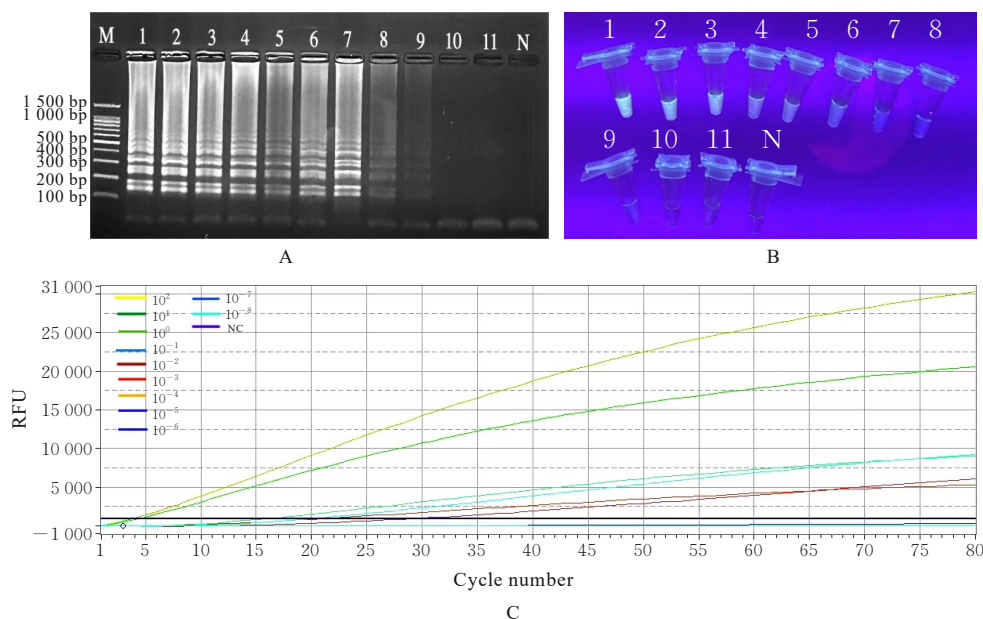
图6 LAMP-CRISPR特异性评价

Fig. 6 Evaluation on specificity of LAMP-CRISPR

紫外光下肉眼可见荧光。见图7。

2.3.3 重复性评价 由3名实验操作人员在不同实验室采用LAMP-CRISPR/Cas12a检测 *Vp* 阳性

标本, 检测结果一致, 琼脂糖凝胶电泳均可观察到清晰目的条带, 且紫外光下肉眼可见荧光, 证明该方法重复性较好。见图8。



A: LAMP-CRISPR electrophoretic result (M: 100 bp marker; Lane 1: $10^2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 2: $10^1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 3: $10^0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 4: $10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 5: $10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 6: $10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 7: $10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 8: $10^{-5} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 9: $10^{-6} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 10: $10^{-7} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 11: $10^{-8} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; N: Blank control); B: Visualization results under 320 nm ultraviolet light (1: $10^2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 2: $10^1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 3: $10^0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 4: $10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 5: $10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 6: $10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 7: $10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 8: $10^{-5} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 9: $10^{-6} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 10: $10^{-7} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 11: $10^{-8} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; N: Blank control); C: Amplification fluorescence curves.

图7 LAMP-CRISPR灵敏度评价

Fig. 7 Evaluation on sensitivity of LAMP-CRISPR

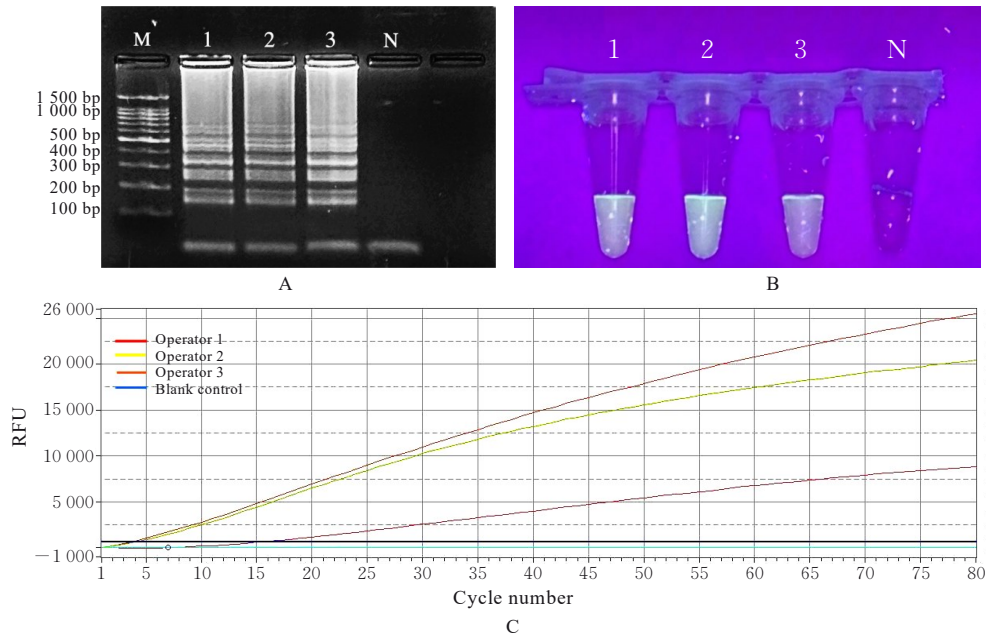
2.3.4 阳性符合率分析 分别使用建立的LAMP-CRISPR/Cas12a方法和RT-qPCR方法对临床疑似 *Vp* 病例进行检测, 比较2种方法的检测结果并分别计算阳性符合率, 结果显示: LAMP-CRISPR/Cas12a方法的阳性符合率和RT-qPCR法的阳性符合率结果一致, 准确率一致, 证明LAMP-CRISPR方法可行。见表4。

3 讨论

食源性致病菌 *Vp* 引发的食物中毒事件呈现逐年增长趋势, 严重威胁人类健康。目前, 检测 *Vp* 的国家标准方法是平板培养法, 该方法为 *Vp* 检测的金标准^[12]。传统检测时效性差, 无法有效应对食源性疾病突发情况下快速鉴定的需求。因此, 研发快速、精确的 *Vp* 定量检测技术迫在眉睫^[13]。分子学方法相对来说更适合食源性致病菌的检测, 近年来国内外学者^[14] 积极研发快速检测手段, 如PCR-凝胶电泳技术、RT-qPCR、基因指纹图谱识

别法以及ELISA法等, 其各有独特的优点但同时有一定的局限性。PCR-凝胶电泳法快速且成本效益高, 但仍因步骤繁琐以及易产生气溶胶并成为显著污染源而受到限制, 且其灵敏度相对有限。RT-qPCR技术虽然具备高度特异性和灵敏度, 但仍面临检测费用昂贵和荧光探针储存期短的问题。基因指纹图谱分析法因试剂盒成本高^[15] 而受限。

LAMP是一种创新的分子生物学鉴定手段, 具备显著的高效性、高灵敏度和高度特异性^[16], 是一种独特的核酸等温扩增技术。与传统核酸扩增手段相比, 该技术特别设计了针对目标DNA序列的6个特定区域的4组独特引物。只需将样品DNA在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境下, 配合引物、高效链置换DNA聚合酶以及dNTPs等试剂, 单一步骤即可实现核酸的迅速扩增, 无需依赖复杂的热循环设备, 显著提升了操作的简易性。LAMP也有一定的缺点, 容易污染, 结果呈现假阳性, 针对如何通过优化引物设计、改良实验流程及开发新型检测手段,



A: LAMP-CRISPR electrophoretic result (M: 100 bp marker; Lane 1: Operator 1; Lane 2: Operator 2; Lane 3: Operator 3; N: Blank control); B: Visualization results under 320 nm ultraviolet light (1: Operator 1; 2: Operator 2; 3: Operator 3; N: Blank control); C: Amplification fluorescence curves.

图8 LAMP-CRISPR重复性评价

Fig. 8 Evaluation on repeatability of LAMP-CRISPR

表4 2种方法阳性符合率

Tab. 4 Positive conformity rates of two methods

Method	Positive	Feminine	Conformity rate(η /%)
RT-qPCR	25	0	100
LAMP-CRISPR/Cas12a	25	0	100

以实现扩增产物源头的特异性识别, 仍需深入研究^[17]。CRISPR系统, 特指细菌和古菌中的一种适应性免疫机制, 基于该系统开发的CRISPR/Cas技术是近几年新兴的基因编辑技术。近年来Cas12、Cas13和Cas14蛋白不仅展现出针对特定靶序列的高效顺式核酸内切酶性能, 而且还表现出对非特异性ssDNA和单链RNA的反向切割特性^[18], 研究者可使用高灵敏度的Cas变体(如Cas12a或Cas13a)改进引导RNA(guide RNA, gRNA)设计, 增强靶标识别效率。其中Cas12a蛋白具有相对较小的尺寸, 有利于其高效地进入细胞内部, 且其对广泛的邻间隔基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)具有高度识别能力。*Vp*的相关检测主要利用Cas12a或Cas13a蛋白的反式切割活性, crRNA与目标DNA(如*tdh*基因或*trh*基因)互补配对, 结合Cas蛋白形成复合物。Cas12a在切割靶标双链DNA

(顺式切割)后, 激活ssDNA反式切割活性, 切断荧光标记(如FAM-BHQ1)的探针, 从而释放荧光信号达成可视化的效果。检测流程分为核酸提取、恒温扩增和CRISPR反应, 将扩增产物与Cas12a-crRNA复合物及荧光探针混合, 通过荧光强度判断结果。该技术的优势为具有高灵敏度与特异性, 检测时间缩短至1 h内, 远快于传统培养法。同时具有现场适用性, 免疫层析试纸条或便携式荧光仪支持现场检测, 适用于港口和养殖场等场景。但其也有一定的局限性, 需精准设计靶向基因的crRNA。CRISPR基因编辑技术为*Vp*的检测与防控提供了高精度工具^[19]; 其核心优势在于快速、灵敏的靶标识别能力, 但需进一步解决活菌检测、设备成本及标准化问题。未来研究可聚焦于多技术联用(如CRISPR-LAMP-微流控)和跨学科整合(如One Health策略), 推动从实验室到产业化的转化。

本研究建立一种新兴的LAMP-CRISPR/Cas12a方法检测*Vp*的*tlh*基因, 检测体系在恒温37℃反应20~40 min即可完成检测, 结果现场可视化, 该方法具有简单、快速和可视化等优点。该系统还可与便携式恒温加热器一起使用, 无需昂贵复杂的设备和技术成熟的专业人员。但Cas蛋白会切

割反应体系中作为扩增模板的靶标基因,导致该方法无法实现精确有效检测。在核酸检测方面,未来可以选择次优的 crRNA,利用耐热性更佳的 Cas 蛋白,优化扩增缓冲液和酶切缓冲液以实现两者兼容,令扩增反应和酶切反应同步进行,从而缩短反应时间,提高检测效率^[20]。

综上所述,本研究建立了 LAMP-CRISPR/Cas12a 方法用于检测 *Vp* 的 *tlh* 基因,为进出口食品中 *Vp* 的快速检测提供了简便高效的新方法,有助于行业工作者对产品的即时筛查,具有广阔的应用潜力。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

周钰娇参与实验研究设计和论文撰写,杨继飞、刘岩、丁文博和张先宇参与研究数据收集及整理,杨建宇、高林然和赵云冬参与数据分析,孙丽媛参与论文修改和审阅。

[参考文献]

- [1] 贾博涵,张琳,陈耀,等.环介导等温扩增技术结合乳胶微球试纸条检测副溶血性弧菌[J].食品安全质量检测学报,2024,15(1):74-84.
- [2] 黎艳萍.TDH和TRH阴性的食源性副溶血性弧菌遗传多样性和毒力研究[D].广州:华南农业大学,2020.
- [3] 广敏,靳洪振,彭康尧,等.联合环介导等温扩增和横向流动试纸条可视化检测副猪嗜血杆菌[J].中国农业大学学报,2023,28(1):180-189.
- [4] 于耀鲜,邢冉冉,邓婷婷,等.基于重组酶介导等温扩增-CRISPR/Cas12a的青鱼物种快速鉴定研究[J].食品安全质量检测学报,2024,15(4):40-48.
- [5] 符天晓,吴育忠,高士玲.恒温荧光核酸检测与国标法在副溶血性弧菌检验能力验证中的应用与分析[J].食品安全质量检测学报,2019,10(1):252-255.
- [6] JIANG M C, HU Z X, WANG K X, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *SLC15A4* gene involved in the immune response in bovine rumen epithelial cells[J]. J Integr Agric, 2023, 22(10): 3148-3158.
- [7] SI X X, ZHANG Q, LUO Z D, et al. A rapid and accurate CRISPR/Cas12b-mediated genotyping assay for the methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism C677T [J]. Biomed Environ Sci, 2023, 36(6): 561-565.
- [8] JU Y, KIM H Y, AHN J K, et al. Ultrasensitive version of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) utilizing a nicking and extension chain reaction system[J]. Nanoscale, 2021, 13(24): 10785-10791.
- [9] KUTI K A, NUR R A, DONKA G M, et al. Predictors of intestinal parasitic infection among food handlers working in madda walabu university, Ethiopia: a cross-sectional study [J]. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2020, 2020: 9321348.
- [10] WANG S, HU J H, XIAO S, et al. Fluorescent/electrochemical dual-signal response biosensing strategy mediated by DNAzyme-ferrocene-triggered click chemistry for simultaneous rapid screening and quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Sens Actuat B Chem, 2023, 380: 133393.
- [11] 伍辉. LAMP结合CRISPR技术用于致病微生物集成检测的研究[D].杭州:浙江大学,2022.
- [12] SHEN Z K, LIU Y, CHEN L M. Qualitative and quantitative detection of potentially virulent *Vibrio parahaemolyticus* in drinking water and commonly consumed aquatic products by loop-mediated isothermal amplification[J]. Pathogens, 2021, 11(1): 10.
- [13] ANUPAMA K P, NAYAK A, KARUNASAGAR I, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay along with conventional and real-time PCR assay for sensitive detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood sample without enrichment[J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(1): 1009-1016.
- [14] 刘涛,俞骅,张蔚,等.免疫磁珠-环介导等温扩增联用技术快速检测副溶血性弧菌方法的建立[J].中国预防医学杂志,2017,18(4):266-271.
- [15] 马琳琳,刘珍,马腾州,等.实时荧光PCR技术快速检测食品中的蜡样芽孢杆菌[J].理化检验-化学分册,2022,58(12):1461-1465.
- [16] 王宇,邢文革,刘中夫,等.丙型肝炎病毒感染的实验室检测方法策略[J].临床肝胆病杂志,2024,40(4):672-678.
- [17] MAFFERT P, REVERCHON S, NASSER W, et al. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(10): 1717-1731.
- [18] 毛首会,杜国玉,刘晓波,等.猪圆环病毒2型LAMP-CRISPR/Cas12a检测方法的建立与应用[J].中国兽医科学,2024,54(6):728-734.
- [19] 吉兴坤.基于LAMP-CRISPR/Cas12a的GMO核酸快速检测方法的研究[D].济南:山东师范大学,2023.
- [20] LIN Z Q, LU J F, WU S H, et al. A novel detection method for the pathogenic *Aeromonas hydrophila* expressing *aerA* gene and/or *hlyA* gene based on dualplex RAA and CRISPR/Cas12a[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 973996.