

杨天沐, 王毅恒, 熊文广, 等. 基于 PCR-CRISPR/Cas12a 技术的肠炎沙门菌快速检测方法 [J]. 华南农业大学学报, 2025, 46(3): 311-318.
YANG Tianmu, WANG Yiheng, XIONG Wenguang, et al. A fast method for detecting *Salmonella enteritidis* based on PCR-CRISPR/Cas12a[J]. Journal of South China Agricultural University, 2025, 46(3): 311-318.

基于 PCR-CRISPR/Cas12a 技术的 肠炎沙门菌快速检测方法

杨天沐[†], 王毅恒[†], 熊文广, 郭剑英

(广东省兽药研制与安全评价重点实验室/国家兽药安全评价(环境评估)实验室/国家兽医微生物耐药性
风险评估实验室/华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】针对食源性病原菌肠炎沙门菌 *Salmonella enteritidis*, 开发一种 CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) 技术结合聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 的检测方法, 以实现肠炎沙门菌的早期快速诊断和防控。【方法】根据保守基因 *sdh* 序列, 进行 PCR 引物筛选。使用不同质量浓度的肠炎沙门菌基因组进行灵敏度测试; 利用大肠埃希菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、多杀性巴氏杆菌 *Pasteurella multocida*、粪肠球菌 *Salmonella choleraesuis*、猪霍乱沙门氏菌 *Enterococcus faecalis* 基因组进行特异性检验。最后, 使用建立的方法检测小肠样品中肠炎沙门菌的污染情况。【结果】该方法可检出小肠样品中的肠炎沙门菌, 检测限为 $1.72 \times 10^0 \mu\text{L}^{-1}$, 特异性良好, 且与大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌、粪肠球菌、猪霍乱沙门氏菌均无交叉反应。【结论】本研究建立了一种较为轻便、可用于早期诊断肠炎沙门菌的方法, 具有良好的灵敏度和特异性, 为肠炎沙门菌快速诊断提供了新方法。

关键词: 肠炎沙门菌; *sdh* 基因; 聚合酶链式反应; CRISPR/Cas12a 系统

中图分类号: S852

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2025)03-0311-08

A fast method for detecting *Salmonella enteritidis* based on PCR-CRISPR/Cas12a

YANG Tianmu[†], WANG Yiheng[†], XIONG Wenguang, GUO Jianying

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation/National Laboratory of
Safety Evaluation (Environmental Assessment) of Veterinary Drugs/National Risk Assessment Laboratory for
Antimicrobial Resistance of Animal Original Bacteria/College of Veterinary Medicine, South China
Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To realize early detection, prevention and control of *Salmonella enteritidis*, a detection method was established by combining CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) technology with polymerase chain reaction (PCR). 【Method】PCR primers were screened based on the conserved *sdh* gene sequence. The sensitivity test was conducted using *S. enteritidis* genomes at different

收稿日期: 2024-03-22 网络首发时间: 2025-02-21 12:23:50

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.s.20250220.1736.002>

作者简介: 杨天沐, E-mail: 452574673@qq.com; 王毅恒, E-mail: ktr_angela@stu.scau.edu.cn; [†]表示同等贡献; 通信作者: 郭剑英, 主要从事动物营养代谢和细菌疾病研究, E-mail: jyguo@scau.edu.cn; 熊文广, 主要从事畜禽病原菌耐药性传播机制与控制研究, E-mail: xiongw@scu.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD1800400); 广东省基础与应用基础研究基金联合基金 (2023A1515030137)

concentrations, while the specificity tests were conducted using the genomes of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis* and *Enterococcus faecalis*. Subsequently, the developed method was applied for the detection of *S. enteritidis* in small intestinal samples. 【Result】 This method was capable of identifying *S. enteritidis* in small intestinal samples, with a detection limit of $1.72 \times 10^0 \mu\text{L}^{-1}$, showing excellent specificity and no cross-reactivity with *E. coli*, *S. aureus*, *P. multocida*, *S. choleraesuis* and *E. faecalis*. 【Conclusion】 This study develops a compact diagnostic method for the early detection of *S. enteritidis*, showing excellent sensitivity and specificity. This innovation presents a fresh perspective for the swift identification of *S. enteritidis*.

Key words: *Salmonella enteritidis*; *sdfl* gene; PCR; CRISPR/Cas12a system

禽肉和禽蛋是人类优质蛋白质的重要来源，禽生长迅速、出栏较快，在中国居民膳食的动物性食物中占较大比例。然而，禽养殖过程中会受到多种疾病威胁，肠炎沙门菌 *Salmonella enteritidis* 是其中之一。该细菌病虽不如禽流感、新城疫等烈性传染病，会在禽群中致暴发性死亡或对养禽业造成极大经济损失，但带菌肉制品或蛋制品进入市场，可能引起区域性食物中毒，给人类健康带来威胁。人感染肠炎沙门菌病后，表现为嗜睡、厌食等症状。较严重感染时，主要表现为中毒相关症状，如发烧、腹痛、呕吐和腹泻等^[1]。儿童、老人和免疫抑制的群体有病原扩散、全身传播的风险，严重者可恶化至败血症^[2]。

肠炎沙门菌感染具有隐蔽性。在我国华中地区一项检测中发现，肠炎沙门菌的感染多见于健康鸡，故需要更为严格的防控措施^[3]。该病的防治原则是预防致病菌感染，清除带菌鸡群，执行严格的消毒和隔离制度^[4]。最简洁的防治方法是保证养殖场环境整洁，并对禽进行疫苗接种。在封闭式饲养条件下，沙门菌流行和卫生情况密切相关，如啮齿类动物控制、养殖设备清洁和工人卫生等^[5]。针对肠炎沙门菌的疫苗，如 ELANCO 肠炎沙门菌弱毒活疫苗等，可尽早预防肠炎沙门菌在体内的黏附和定植^[6]。但由于禽副伤寒沙门菌的血清型极多，疫苗预防在实际应用中难尽如人意。为防止肠炎沙门菌病持续对动物和人类健康造成威胁，需加强各层面对该病的检测和预防，一种灵敏、特异、快速的检测方法亟须建立。

肠炎沙门菌侵染给禽养殖业带来经济损失，且污染食品对人类健康造成严重威胁。由于该菌血清型众多，疫苗预防效果较差，且细菌耐药性逐渐增强，疾病防控更依赖于早期诊断^[7]。近年来，随着诊断技术的不断创新，针对肠炎沙门菌，目前已有一套包括临床症状、病理变化、细菌学、免疫学和分子检测的诊断手段。然而，这些方法或检测时间较

长，或灵敏度较低，或操作复杂，这意味着诊断耗时，诊断效果和人员需求可能难尽如人意^[8-9]。

1987 年，日本科学家 Ishino 等^[10] 在 K19 大肠埃希菌的碱性磷酸酶基因附近发现了一组特殊序列，并发现其广泛存在于细菌之中，这段序列被命名为“成簇的规律间隔的短回文重复序列”(Clustered regularly inter spaced short palindromic repeat, CRISPR)，由 CRISPR 簇、前导序列 L 和 Cas 蛋白组成。Cas12a 是一种由 crRNA 引导的核酸内切酶，具有切割 DNA 的能力。Cas12a 不需要 tracrRNA 的协助，自身含有 RNA 内切酶活性；其识别的 PAM 序列灵敏度更高，是一段富含胸腺嘧啶的序列，故在胸腺嘧啶或腺嘌呤较集中的区域应用广泛^[11-12]。此外，Cas12a 的切割位点在 PAM 序列的远端^[13]，为多轮基因编辑提供了可能。

CRISPR/Cas12a 在检测上有严格的操作步骤。临床样本采集后，需要抽提核酸。根据检测场所的设施情况，选择合适的核酸扩增反应，以提高待测样本中核酸含量。随后，将待测样本、Cas12a-crRNA 复合体和探针进行孵育。通过荧光检测、侧向层析^[14]等方法，判断待测样本中是否存在所检测的病原。

前期研究中，得益于扩增原理简单、所需材料轻便，PCR 技术已经较广泛地应用于病原的快速检测，但该方法灵敏度较低，且具有假阴性等风险。CRISPR/Cas12a 方法应用于检测亦较为轻便，且准确性较高，对检测资源匮乏的地区同样适用。本研究应用上述 2 种检测技术，联合 PCR 扩增技术和 CRISPR/Cas12a 的切割反应，建立一种操作简单、质检合格且能用于临床检测的肠炎沙门菌检测方法，通过荧光强度判断目标病原肠炎沙门菌的污染情况。并对该方法的灵敏性、特异性进行评估，以期肠炎沙门菌的早期诊断提供技术手段，具有重要的实践意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

肠炎沙门菌 *Salmonella enteritidis* S2e、大肠埃希菌 *Escherichia coli* 标准菌株 (ATCC 25 922)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 标准菌株 (ATCC 29 213)、多杀性巴氏杆菌 *Pasteurella multocida* 标准菌株 (CVCC 434)、粪肠球菌 *Salmonella choleraesuis* (GDF22P19-1)、猪霍乱沙门氏菌 *Enterococcus faecalis* 标准菌株 (ATCC 13312) 由华南农业大学兽医学院药理教研室提供。

1.2 细菌培养和基因组提取

菌株解冻, 接种于 5 mL LB 肉汤培养基中, 在恒温摇床中复苏。S2e 株接种于 SS 琼脂培养基 37 ℃ 恒温培养 24 h 后, 挑取金属黑色单菌落, 使用 LB 营养培养基 37 ℃ 恒温培养 24 h 增菌。大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、多杀性巴氏杆菌、粪肠球菌和猪霍乱沙门氏菌菌株活化后使用 LB 营养琼脂培养基 37 ℃ 恒温培养 24 h 扩繁。使用 TIANGENTM 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 提取各菌株基因组, 并使用 NanoDrop2000 分光光度计测量 DNA 质量浓度。

1.3 主要仪器和试剂

SS 琼脂培养基、LB 营养琼脂培养基和 LB 肉汤培养基购自青岛海博生物技术有限公司; Cas12a 蛋白和对应 Buffer 购自广州艾迪基因科技有限责任公司; PCR 引物、crRNA 和 ssDNA-reporter 在手动设计后交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。PCR 仪购自北京东胜创新生物科技有限公司; 凝胶成像仪购自伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司; NanoDrop2000 分光光度计购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Revvity EnSightTM 多功能酶标仪购自珀金埃尔默股份有限公司。

1.4 PCR 引物、crRNA 的设计与合成

将获取的肠炎沙门菌基因组序列 (GenBank 数据库登录号为 CP011942.1、CP007468.2、CP007378.2、CP007433.2、CP007368.2) 进行比对, 设计符合 *sdfl* 基因区域的多对 PCR 引物和 crRNA 引物 (表 1)。

1.5 PCR 引物筛选

S2e 细菌全基因组稀释至 $10^7 \mu\text{L}^{-1}$ 。设计引物对 F1、R1, F2、R1, F1、R3, F2、R3, F4、R1, F4、R4, F2、R5, F3、R2, F1、R6, F2、R6 和 F4、R6, 参与 PCR 反应。退火温度设置 8 个梯度, 分别为 52.0、52.5、53.3、54.7、56.3、57.6、58.5 和 59.0 ℃。采用 20 μL 反应体系: 10 μL TAKARA Ex TaqTM、1 μL

表 1 PCR 和 crRNA 引物设计
Table 1 Design of PCR primers and crRNA primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
Se F1	GCGGTTTGATGTGGTTGG
Se F2	GGGGAGGGAGGAGCTTTA
Se F3	CCTTGACGCTGATACAGATA
Se F4	CGAGCATGTTCTGGAAAG
Se R1	TGGCTGGCGAATGGTGAG
Se R2	TGGCGCGTTATATTTGTCAT
Se R3	AGGTGGTGGCTGGCGAAT
Se R4	CAGACAACAGGCTGATTTA
Se R5	AACATGCTCGCTGCACAA
Se R6	AAGAGTTACGACCGGATTTG
crRNA1-262fw	UAAUUUCUACUAAGUGUAG AUGUAAAUCAGCCUGUUGUCUG
crRNA2-207fw	UAAUUUCUACUAAGUGUAG AUCAGAACAUGCUCGUCGCACAA
crRNA3-177rev	UAAUUUCUACUAAGUGUAG AUAGCCGGUCAAUAGAGUUUUUCU

DNA 模板、上下游引物各 0.5 μL 、8 μL ddH₂O。扩增条件: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 30 s, 各温度梯度退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 34 个循环; 72 ℃ 再延伸 5 min。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 排除扩增失败、存在非特异性扩增的组别后, 使用 ImageJ 软件根据灰度值测定最佳反应条件。

1.6 PCR-CRISPR/Cas12a 检测方法的建立与评价

50 μL Cas12a 反应体系需在暗环境下配制: 5 μL NEBuffer3、2 μL PCR 扩增产物、1 μL crRNA、0.5 μL ssDNA-reporter (5'-FAM-TTATT-BHQ1-3')、1 μL LbsCas12a、40.5 μL ddH₂O。短暂离心, 于 37 ℃ 恒温水浴锅中水浴 10 min。水浴完成后, 再次短暂离心, 将 50 μL 反应体系避光转移至棕色 96 孔板中。

灵敏度评价和 crRNA 筛选: 将 S2e 基因组浓度从 $10^8 \mu\text{L}^{-1}$ 逐级稀释至 $10^{-2} \mu\text{L}^{-1}$ 。各稀释度核酸以最佳的 PCR 引物和温度组合, 使用 3 条 crRNA 完成 2 组扩增, 一组用于 PCR 灵敏度检测, 另一组用于 PCR 与 CRISPR/Cas12a 的联合检测。前者根据条带情况判断灵敏度; 后者在体系配制完全后, 使用 Revvity EnSightTM 多功能酶标仪对荧光强度进行检测。各稀释度测试结果与阴性结果均进行独立样本 *t* 检验, 以与阴性对照组有显著差异 ($P<0.05$) 的最低稀释度为其灵敏度。

特异性评价: 使用未经稀释的 S2e、ATCC 25922、ATCC 29213、CVCC 434、GDF22P19-1、ATCC 13312 细菌全基因组在最佳 PCR 反应条件下, 使用灵敏度最佳的 crRNA 完成扩增。一组扩增产物直

接根据条带判断特异性,另一组配制 Cas12a 反应体系,使用 Revvity EnSight™多功能酶标仪对荧光强度进行检测。各细菌基因组测试结果与阴性结果均进行独立样本 *t* 检验,以与阴性对照组有显著差异 ($P<0.05$) 的最低稀释度为其特异性。

1.7 样品的采集与 PCR-CRISPR/Cas12a 检测

从广东省广州市天河区的长湴农贸市场、国六宝肉菜市场、上元岗农贸市场;越秀区的东富肉菜市场、东山肉菜市场、共和西市场;白云区的梅花园农贸市场、云苑农贸市场;荔湾区的西华肉菜市场、龙津肉菜市场,共采集 40 枚禽小肠样品。40 枚禽小肠,编号 1~40,剪取约 1 cm³ 可疑组织,浸泡于 LB 肉汤培养基中,37 ℃ 摇床孵育 24 h。取各组肉汤培养基各 1 mL,103 ℃ 金属浴 15 min,以肉汤培养基为模板,完成 PCR 扩增和 CRISPR/Cas12a 检测。

2 结果与分析

2.1 细菌基因组提取

使用 TIANGEN™细菌基因组 DNA 提取试剂

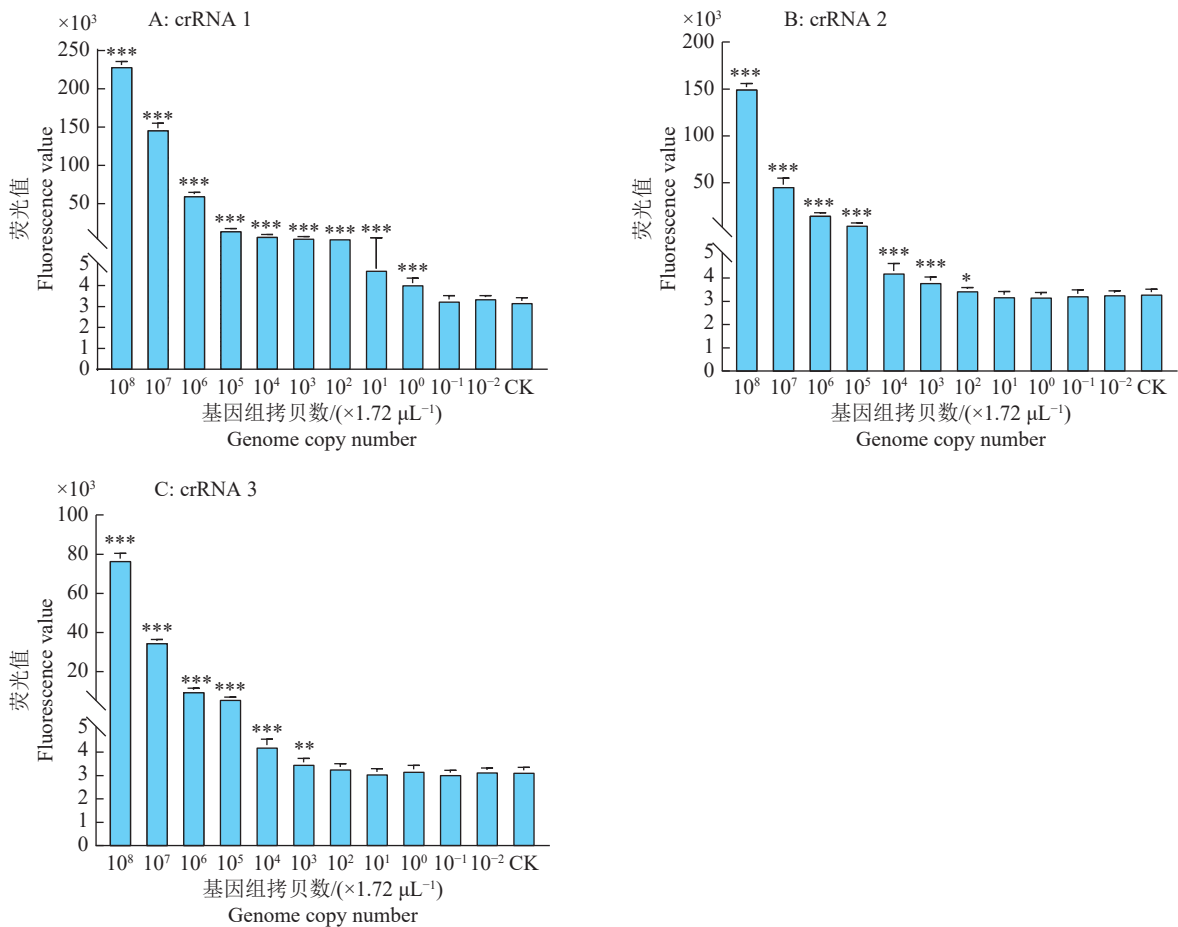
盒(离心柱型)提取肠炎沙门菌基因组后,测量得到 DNA 质量浓度为 884.2 ng·μL⁻¹。根据肠炎沙门菌全基因组大小,折算拷贝数为 1.72×10⁸ μL⁻¹。大肠埃希菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、多杀性巴氏杆菌 CVCC 434、粪肠球菌 GDF22P19-1、猪霍乱沙门氏菌 ATCC 13312 的基因组提取后,测量质量浓度分别为 283.1、190.9、255.7、291.5 和 337.0 ng·μL⁻¹。

2.2 PCR 引物筛选

电泳完成后发现,引物组 F1、R1, F2、R1, F1、R3, F4、R1, F4、R4, F4、R6 有杂带或条带逸散的情况。在 ImageJ 中框选一定面积矩形范围,测量剩余组别各条带灰度值。引物组 F1、R6 在退火温度 57.6 ℃ 时灰度值最高,故后续 PCR 扩增反应沿用此条件。

2.3 crRNA 筛选和灵敏度检测

各稀释度的基因组 DNA 经多次 PCR 联合 CRISPR/Cas12a 检测后,荧光值与阴性对照组(CK)分别进行独立样本 *t* 检验(图 1),结果表明采



“*” “**” “***” 分别表示处理与阴性对照(CK)在 0.05、0.01、0.001 水平差异显著(*t* 检验)。

“*” “**” “***” indicate significant differences between treatment and the negative control at the 0.05, 0.01, and 0.001 levels, respectively(*t* test).

图 1 PCR-CRISPR/Cas12a 检测方法的定量评价

Fig. 1 Quantitative evaluation of PCR-CRISPR/Cas12a detection method

用 crRNA1 参与检测时, 灵敏度最高: 肠炎沙门菌基因组含量为 $1.72\times10^0\ \mu\text{L}^{-1}$ 时, $P<0.01$; 基因组含量为 $1.72\times10^{-1}\ \mu\text{L}^{-1}$ 或更低时, $P>0.05$ 。联合检测时灵敏度可达 $1.72\times10^0\ \mu\text{L}^{-1}$ 。而采用 crRNA2 和 crRNA3 参与联合检测时, 灵敏度分别达 1.72×10^2 和 $1.72\times10^3\ \mu\text{L}^{-1}$, 均次于 crRNA1, 故后续评价和临床样品

检测环节, 沿用 crRNA1 来建立检测体系。

PCR 灵敏度检测结果 (图 2) 表明, 肠炎沙门菌基因组含量为 $1.72\times10^7\ \mu\text{L}^{-1}$ 时条带可见, $1.72\times10^6\ \mu\text{L}^{-1}$ 或更低时条带不显现, 因此 PCR 灵敏度为 $1.72\times10^7\ \mu\text{L}^{-1}$ 。

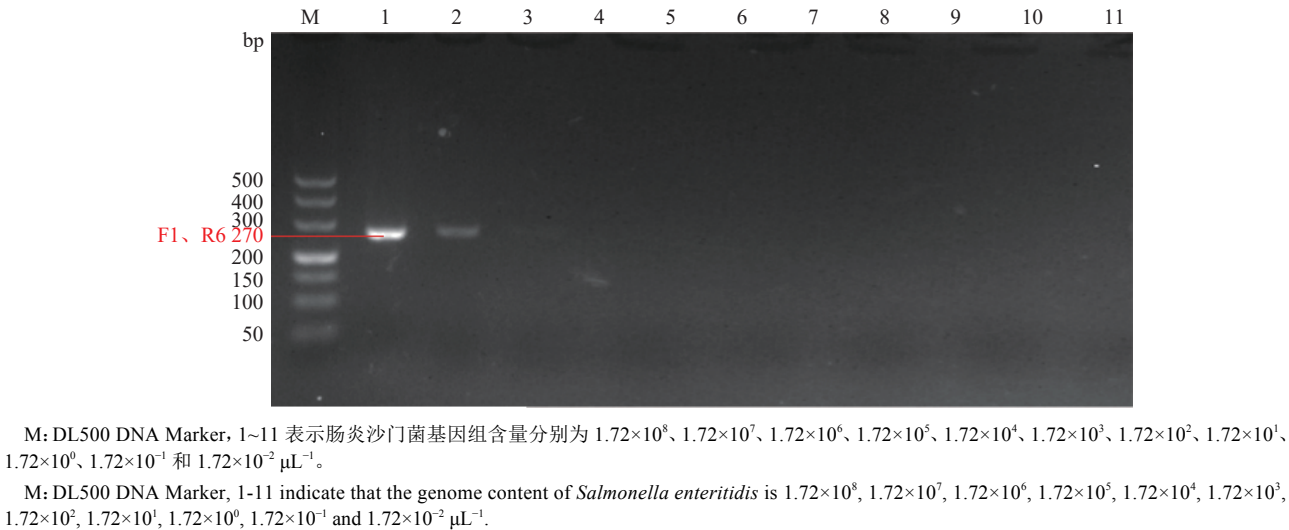


图 2 PCR 灵敏度检测

Fig. 2 Sensitivity detection of PCR

2.4 PCR-CRISPR/Cas12a 特异性检测

PCR 扩增后, 只有肠炎沙门菌组产生明显条带, 且与其他细菌组别发生交叉反应 (图 3); CRISPR/Cas12a 检测后, 仅肠炎沙门菌组的荧光值与阴性对照组有显著差异 ($P<0.05$, 图 4), 说明检测方法特异性良好。

2.5 PCR-CRISPR/Cas12a 对临床样品检测效果的评价

从市场上采回禽小肠后, 剪取可疑病灶或污染

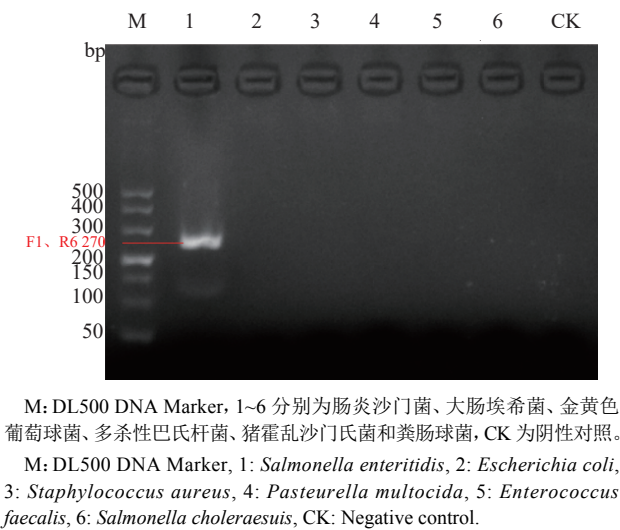


图 3 PCR 特异性检测

Fig. 3 Specificity detection of PCR

部位, 在 LB 肉汤中培养, 培养完成后, 金属浴裂解细胞, 直接将处理后的培养液扩增并进行检测。结果 (图 5) 显示, 40 个样品中, 有 6 个样品有一定程度肠炎沙门菌污染现象 ($P<0.05$), 使用 PCR 方法对其进行检验, 结果 (图 6) 与图 5 结果保持一致。

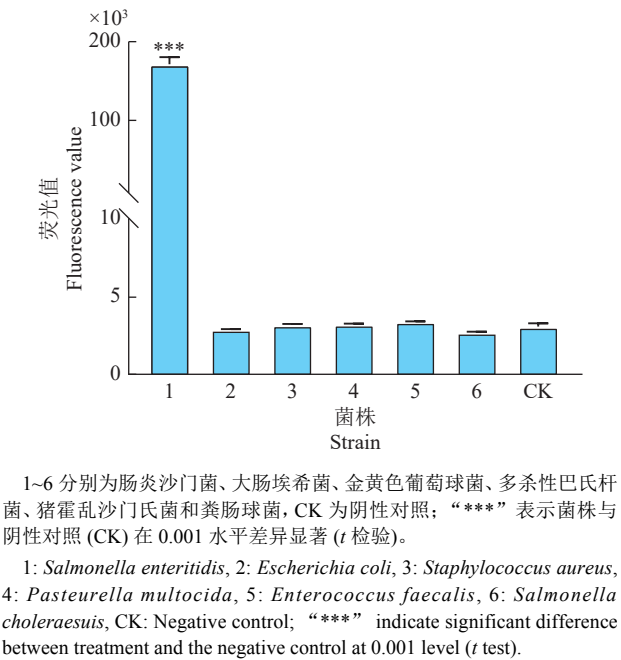
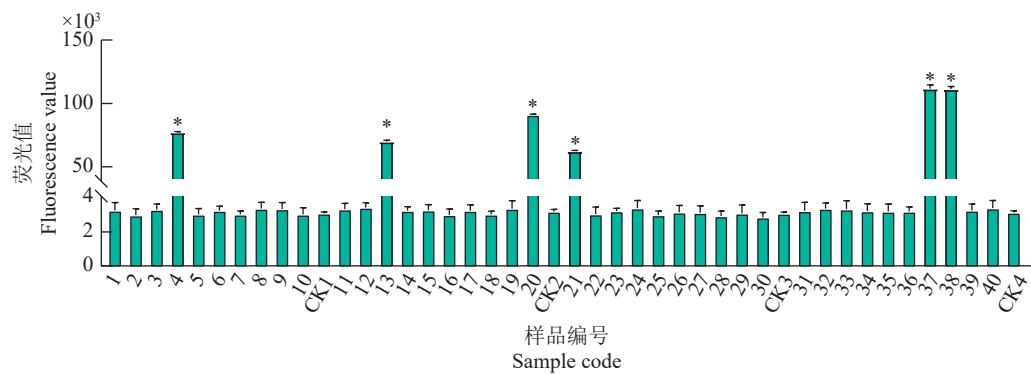


图 4 CRISPR/Cas12a 特异性检测

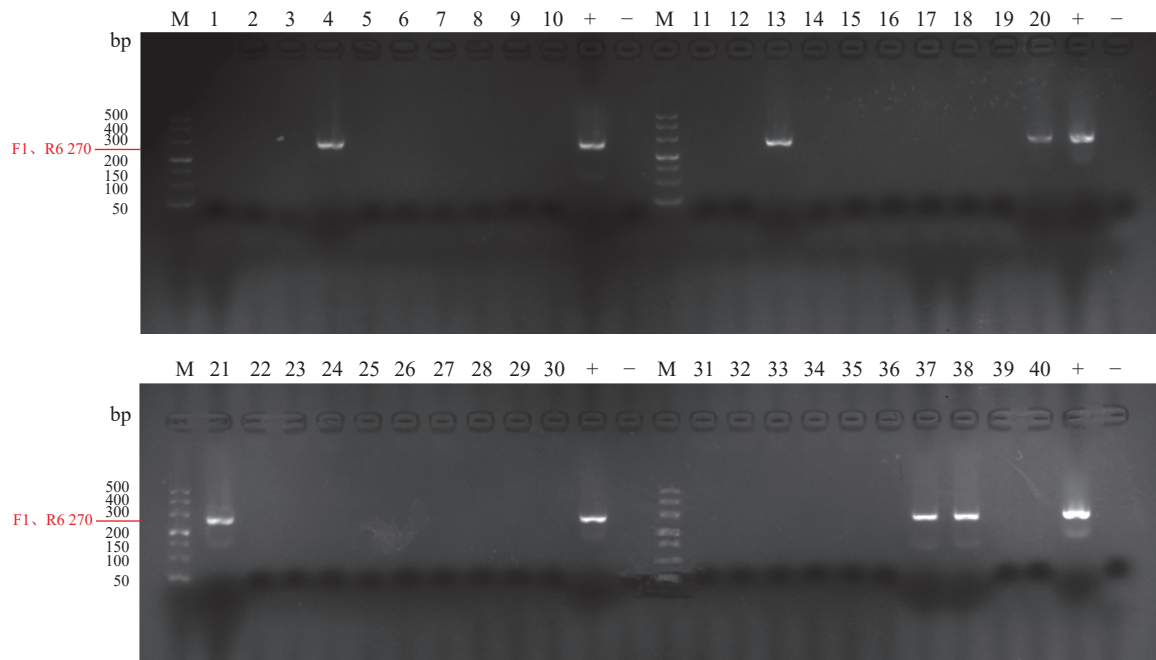
Fig. 4 Specificity detection of CRISPR/Cas12a



“*”表示编号 4、13、20、21、37、38 的样品与阴性对照 (CK) 差异显著 ($P<0.05$, t 检验), 表明有肠炎沙门菌污染现象。

“*” indicates that the samples with code 4, 13, 20, 21, 37 and 38 were significantly different from the negative control, indicating that these samples were infected with *Salmonella enteritidis*.

图 5 PCR-CRISPR/Cas12a 联合检测方法的应用
Fig. 5 Application of the PCR-CRISPR/Cas12a combined assay method



M: DL500 DNA Marker; “+” “-” 分别表示阳性和阴性对照; 样品 4、13、20、21、37、38 检出肠炎沙门菌污染。

M: DL500 DNA Marker; “+” “-” indicate positive control and negative control; The samples with code 4, 13, 20, 21, 37 and 38 were infected with *Salmonella enteritidis*.

图 6 PCR 检测禽小肠样本肠炎沙门菌的污染情况
Fig. 6 Detection of *Salmonella enteritidis* in small intestine samples by PCR

3 讨论与结论

肠炎沙门菌是当前最重要的食源性病原体之一,同时也是导致传染性胃肠炎的重要病原。有学者对国内部分地区沙门菌进行血清型分析,发现鸡源沙门菌血清型中肠炎约占 60%,猪源沙门菌血清型中肠炎约占 12%^[15]。从世界范围来看,肠炎沙门菌感染泛滥。欧盟地区,原鸡繁殖群、蛋鸡、肉鸡沙门菌感染率分别为 0.36%、0.95%、3.63%,其中分别有 54.70%、80.96% 和 73.40% 是由肠炎沙门菌感染引起^[16];东亚地区,如韩国,禽肉沙门菌感染率为

2.2%,每年有约 25 000 人因此中毒,其中约 500 人因此死亡^[17];在美国,据报道,因鸡蛋引起的肠炎沙门菌中毒占食源性疾病的 24%^[18];非洲地区常年受非伤寒性沙门菌影响,一大部分源于肠炎沙门菌的致病变异,成人相关继发性疾病的死亡率达 37% 以上^[19]。

由此可见,该细菌对禽养殖业和人类健康危害严重。目前检测肠炎沙门菌的方法主要有生化试验、PCR 后测序比对等。以上常规检测方法特异性均可得到保障,但在细菌培养后,生化试验需要使用多种生化反应管进行检测;PCR 测序比对在

GC 含量较高的区域容易产生偏差。本研究结合 PCR 和 CRISPR/Cas12a 技术, 开发了 1 种可快速、灵敏地检测肠炎沙门菌的方法。

利用 PCR 扩增与 CRISPR/Cas12a 检测技术相结合建立的快速检测方法, 可完善肠炎沙门菌监测体系, 并可作为技术储备, 在养殖场预防疾病、兽医治疗疾病及检疫等环节发挥重要作用。本研究所建立的方法是通过荧光强度判断病原是否存在。PCR 扩增和 CRISPR/Cas12a 技术联合后, 荧光检测的灵敏度可达 $10^0 \mu\text{L}^{-1}$, 而单纯的 PCR 检测方法仅可达 $10^7 \mu\text{L}^{-1}$ 。检测时长上, CRISPR/Cas12a 仅多 1 轮体系配制和孵育时间 (约 15 min), 而灵敏度有较大改善, 可以满足对隐性、弱阳性感染的检测需求。特异性检测方面, *sdft* 基因专一性强, PCR 检测和 2 种方法联合检测结果均显示, 有且仅有肠炎沙门菌在扩增后表现为阳性。总而言之, 方法的建立较为成功, 可用于后续的临床检测。

试验建立的诊断方法由 2 个步骤组成。首先, 通过 PCR 扩增, 实现目标病原基因组的放大。对实验室菌株和临床样品进行检测的过程中均可发现, 所选用的 F1、R6 引物对, 无论对纯净的基因组还是组织中较为杂乱的基因组进行扩增, 均可完成检测。如禽小肠临床样品的检测中, 细菌培养时未进行纯化, 对组织和肉汤采用金属浴, 不妨碍 PCR 扩增和 CRISPR/Cas12a 技术检测。其次, 利用 CRISPR/Cas12a 的切割原理, 对目的样本进行检测。Cas12a 正确识别 crRNA 和 PAM 位点, 核酸酶区域得到激活, 开始对 DNA 进行切割。其中, ssDNA-reporter 同时含有荧光基团 FAM 和淬灭基团 BHQ1, 在 Cas12a 蛋白切割活性被激活时, 该 DNA 片段也会被切割, 荧光基团与淬灭基团分离, 从而通过酶标仪检测到荧光^[20]。

组内荧光检测结果有一定差异。由于受检测当天气温等因素影响, 切割活力有一定变化。重复检测结果发现, 使用相同的孵育和检测手段, 组内荧光值变异系数最高可达 15%, 属中等变异水平; 但在各项检测过程中, 该差异不影响结果判断, 故检测方法的建立较为成功。

本研究在方法建立后, 通过多次荧光值检测, 将各组结果与阴性对照组进行独立样本 *t* 检验后得出结论。在临床检测中, 若需要对样品进行简单的定性检测, 可采用侧向层析试纸条判读。使用生物素探针 biotin-DNA-FAM 配制体系, 通过吸附垫, C 线上抗体可与生物素发生特异性结合; 而仅当 Cas12a 被激活、探针被切割时, T 线上抗体才可与

FAM 发生特异性结合, 从而显现条带^[21]。此外, 扩增与 CRISPR/Cas12a 检测的孵育过程需要多次溶液转移, 而“一锅法”检测一次性配制体系, 减少了中途配置体系等人为干扰, 结果判读更精准。值得注意的是, 由于 CRISPR/Cas12a 反应混合物始终在反应管中, 故“一锅法”检测适用于 RPA、RAA 等恒温扩增, PCR 因其扩增过程中温度较高而不适用^[22-24]。

本研究成功建立了 1 种针对肠炎沙门菌的快速检测方法, 具有良好的灵敏度和特异性, 可对临床样品进行针对性的检测, 为禽肠炎沙门菌感染的早期预防提供了新的技术手段。

参考文献:

[1] 刘颜, 何玲玲, 王乐, 等. 一起学校肠炎沙门氏菌食源性疾病事件暴发的流行病学调查[J]. 实用预防医学, 2023, 30(1): 84-87.

[2] KNODLER L A, ELFENBEIN J R. *Salmonella enterica*[J]. Trends in Microbiology, 2019, 27(11): 964-965.

[3] WANG X, WANG H, LI T, et al. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from chickens in Central China[J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1): 299.

[4] 罗满林, 元文宝, 胡永浩, 等. 动物传染病学[M]. 2 版. 北京: 中国林业出版社, 2021: 98-103.

[5] SORNPLANG P, AIEAMSAARD J, SAKSANGA-WONG C, et al. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence, its antibiotic resistance, and egg antibiotic residues in the layer farming environment[J]. Veterinary World, 2022, 15(3): 543-550.

[6] HU J, CHE C, ZUO J, et al. Effect of antibiotics on the colonization of live attenuated *Salmonella enteritidis* vaccine in chickens[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 784160.

[7] COSBY D E, COX N A, HARRISON M A, et al. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review[J]. Journal of Applied Poultry Research, 2015, 24(3): 408-426.

[8] YOSHIDA C, FRANKLIN K, KONCZY P, et al. Methodologies towards the development of an oligonucleotide microarray for determination of *Salmonella* serotypes[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(2): 261-271.

[9] 牛瑞江. 沙门氏菌富集及 ELISA 检测方法的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.

[10] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433.

[11] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a

class 2 CRISPR-Cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771.

[12] MOON S B, LEE J M, KANG J G, et al. Highly efficient genome editing by CRISPR-CpfI using CRISPR RNA with a uridinylate-rich 3'-overhang[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3651.

[13] LING X, CHANG L, CHEN H, et al. Improving the efficiency of CRISPR-Cas12a-based genome editing with site-specific covalent Cas12a-crRNA conjugates[J]. Molecular Cell, 2021, 81(22): 4747-4756.

[14] LI X, CHEN X, MAO M, et al. Accelerated CRISPR/Cas12a-based small molecule detection using bivalent aptamer[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 217: 114725.

[15] 李月华, 赵建梅, 张青青, 等. 我国部分地区鸡、猪源沙门氏菌血清型与耐药性比较[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(6): 30-36.

[16] European Food Safety Authority. The European union one health 2019 zoonoses report[J]. EFSA Journal, 2021, 19(2): e06406.

[17] BAE D H, DESSIE H K, BAEK H J, et al. Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. isolated from poultry slaughterhouses in Korea[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2013, 75(9): 1193-1200.

[18] ALISHER A, MUSTAFA B E, GRADY S C, et al. Outbreaks of foodborne *Salmonella enteritidis* in the United States between 1990 and 2015: An analysis of epidemiological and spatial-temporal trends[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2021, 105: 54-61.

[19] GILCHRIST J J, MACLENNAN C A. Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease in Africa[J]. EcoSal Plus, 2019, 8(2). doi: 10.1128/ecosalplus.Esp-0007-2018.

[20] LUAN T, WANG L, ZHAO J. 基于 CRISPR/Cas12a 快速识别 *apxIVA* 的胸膜肺炎放线杆菌检测平台的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(10): 1133.

[21] CAO G, XIONG Y, NIE F, et al. Non-nucleic acid extraction and ultra-sensitive detection of African swine fever virus via CRISPR/Cas12a[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(12): 4695-4704.

[22] XIONG Y, CAO G, CHEN X, et al. One-pot platform for rapid detecting virus utilizing recombinase polymerase amplification and CRISPR/Cas12a[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(12): 4607-4616.

[23] DING X, YIN K, LI Z, et al. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 4711.

[24] YIN K, DING X, LI Z, et al. Dynamic aqueous multiphase reaction system for one-pot CRISPR-Cas12a-based ultrasensitive and quantitative molecular diagnosis[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(12): 8561-8568.

【责任编辑 霍 欢】