

基于重组酶聚合酶扩增和 CRISPR/Cas12a 系统的 2 种快速检测奇异变形杆菌的方法

江艺浩¹, 唐田¹, 余婕¹, 甘善萍¹, 谢轶², 何秋蓉¹, 杨罗^{1,3}, 田绿波⁴, 汪川^{1,3*}

1 四川大学 华西公共卫生学院/华西第四医院, 四川 成都 610041

2 四川大学 华西医院, 四川 成都 610041

3 四川大学 华西公共卫生学院/华西第四医院医防融合转化研究所, 四川 成都 610041

4 四川国际旅行卫生保健中心(成都海关口岸门诊部), 四川 成都 610041

江艺浩, 唐田, 余婕, 甘善萍, 谢轶, 何秋蓉, 杨罗, 田绿波, 汪川. 基于重组酶聚合酶扩增和 CRISPR/Cas12a 系统的 2 种快速检测奇异变形杆菌的方法[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 519-535.

JIANG Yihao, TANG Tian, YU Jie, GAN Shanping, XIE Yi, HE Qiurong, YANG Luo, TIAN Lvbo, WANG Chuan. Two rapid detection methods for *Proteus mirabilis* based on recombinase polymerase amplification and the CRISPR/Cas12a system[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 519-535.

摘要:【背景】奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)是一种重要的致病菌,能够引起人类和动物感染。目前针对该菌的快速检测技术研究较为匮乏,这为临床早期诊断和精准防治工作带来挑战。【目的】基于不同原间隔序列临近基序(protospacer adjacent motif, PAM)序列策略,构建基于重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)和 CRISPR/Cas12a 系统的 2 种检测平台,实现对奇异变形杆菌的快速检测。【方法】针对奇异变形杆菌保守基因建立基于 RPA 和 CRISPR/Cas12a 系统的一步法和两步法检测平台。一步法平台在 39 °C 条件下同时进行 RPA 与 CRISPR/Cas12a 反应,实时收集荧光信号;两步法平台则首先在 39 °C 条件下进行 RPA 扩增,扩增完成后通过瞬时离心将 CRISPR/Cas12a 体系移至管底,继续在 39 °C 条件下进行反应以产生荧光信号。优化反应条件后,评估 2 种方法对奇异变形杆菌临床分离株及其他常见细菌样本的检测灵敏度和特异性。【结果】成功建立了基于 RPA 和 CRISPR/Cas12a 的 2 种检测平台,均可在 30 min 内检测到最低 2.8 copies/μL 的标准质粒。在使用热裂解法对样本进行预处理时,一步法灵敏度为 10⁶ CFU/mL,而两步法灵敏度为 10³ CFU/mL;在对模拟样本进行基因组 DNA 提取后,一步法和两步法灵敏度分别为 10² CFU/mL 和 10¹ CFU/mL。两种方法在 30 例临床分离株样本中均表现出良好的检出能力,与其他常见致病

资助项目:成都市科技局重大应用示范项目(2022-YF09-00011-SN)

This work was supported by the Chengdu Science and Technology Bureau's Major Application Demonstration Project (2022-YF09-00011-SN).

*Corresponding author. E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

Received: 2025-05-16; Accepted: 2025-07-17; Published online: 2025-08-12

菌无交叉反应，具有良好的特异性。【结论】本研究基于不同的 PAM 序列设计策略，构建了针对奇异变形杆菌的 RPA-CRISPR/Cas12a 一步法和两步法检测平台，具有快速、灵敏、特异的优点，有望在奇异变形杆菌现场检测中应用。

关键词：奇异变形杆菌；重组酶聚合酶扩增；CRISPR/Cas12a；次优 PAM 序列

Two rapid detection methods for *Proteus mirabilis* based on recombinase polymerase amplification and the CRISPR/Cas12a system

JIANG Yihao¹, TANG Tian¹, YU Jie¹, GAN Shanping¹, XIE Yi², HE Qiurong¹, YANG Luo^{1,3}, TIAN Lvbo⁴, WANG Chuan^{1,3*}

1 West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

3 Translational Preventive Medical Research Institute, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

4 Sichuan International Travel Health Care Center, Port Epidemic Disease Monitor Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: [Background] *Proteus mirabilis* is a major pathogen capable of causing infections in both humans and animals. Currently, the research on rapid detection techniques for this bacterium is scarce, posing challenges to early clinical diagnosis and targeted prevention and control efforts. [Objective] We developed two detection platforms based on recombinase polymerase amplification (RPA) and CRISPR/Cas12a systems, utilizing distinct protospacer adjacent motif (PAM) sequence strategies, to achieve rapid detection of *P. mirabilis*. [Methods] One-step and two-step detection platforms based on RPA and CRISPR/Cas12a systems were developed for *P. mirabilis* by targeting its conserved genes. The one-step platform simultaneously performs RPA and CRISPR/Cas12a reactions at 39 °C, collecting fluorescence signals in a real-time manner. The two-step platform first conducts RPA at 39 °C, and then transfers the CRISPR/Cas12a system to the bottom of the tube through brief centrifugation and continues the reaction at 39 °C to generate fluorescence signals. After optimization of the reaction conditions, we used the clinical isolates of *P. mirabilis* and other common bacterial samples to evaluate the sensitivity and specificity of both methods. [Results] Two detection platforms based on RPA and CRISPR/Cas12a were successfully established, both capable of detecting a minimum of 2.8 copies/ μL of standard plasmid within 30 min. During sample pretreatment by thermal lysis, the one-step method achieved the sensitivity of 10^6 CFU/mL, while the two-step method demonstrated the sensitivity of 10^3 CFU/mL. After genomic DNA extraction from simulated samples, the sensitivity of the one-step and two-step methods reached 10^2 CFU/mL and 10^1 CFU/mL, respectively. Both methods demonstrated excellent detection ability across 30 clinical isolates and showed no cross-reactivity with other common pathogenic bacteria,

showcasing good specificity. **[Conclusion]** We developed one-step and two-step RPA-CRISPR/Cas12a detection methods for *P. mirabilis* based on two distinct PAM sequence design strategies. These methods demonstrate rapid, sensitive, and specific detection performance, showing promising potential for on-site detection of *P. mirabilis*.

Keywords: *Proteus mirabilis*; recombinase polymerase amplification; CRISPR/Cas12a; suboptimal protospacer adjacent motifs

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)广泛存在于水、土壤等自然环境中,是人类及动物感染的重要致病菌^[1]。奇异变形杆菌主要引起尿路感染,可导致膀胱炎等严重尿路疾病,在引起尿路感染的肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌中,该菌感染率位居第 2 位,仅次于大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[2-4]。此外,奇异变形杆菌还可引起角膜炎、伤口感染和中耳炎等多种疾病,由于其临床表现缺乏特异性,常造成临床早期诊疗困难,易导致漏诊或误诊^[5-9]。目前奇异变形杆菌的分离培养是诊断的金标准,但该方法耗时耗力,生化结果的判读依赖于人的主观判断,导致结果重复性差,易误判。随着核酸诊断技术的快速发展,一些以 PCR 为基础的诊断技术被广泛应用于奇异变形杆菌的快速检测,然而这些方法依赖于昂贵的仪器设备和熟练的操作人员,对于一些落后的实验室无法进行,限制了这些技术的运用,不利于快速检测和应急检测^[10-11]。基于上述诊疗需求,针对奇异变形杆菌所致感染,研发省时、省力和灵敏的检测方法对相关疾病的预防及治疗具有重要意义。

目前,CRISPR/Cas 系统已成功应用于分子诊断^[12-14]。在靶标存在的情况下,可形成 Cas 蛋白-crRNA-靶基因的三元复合体,从而激活 Cas 蛋白对靶标的顺式切割活性和对周围单链信号报告分子非特异反式切割活性,高效释放信号实现快速检测,作为新一代分子诊断方法,在遗传病诊断、病毒与细菌感染等传染病病原体检测等方面具有较大应用潜力。但 CRISPR/Cas 系统本身灵敏度通常在 pmol/L 水平,为提高检

测灵敏度,该系统通常与等温扩增技术结合,相继建立了 DETECTR^[15]、SHERLOCKv2^[16]、SHERLOCK^[17]和 STOPCovid.V2^[18]等检测平台,这对临床分子诊断的技术发展有重要意义。目前,现有恒温扩增技术中,重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)可在恒温 37-42 °C 条件下,10-30 min 内实现待测靶标的快速扩增。相较于其他恒温扩增方法,它具有反应灵敏度高、特异性强、可进行多重检测、对仪器依赖程度低且可整合多种检测模式等优点,特别适用于基层和现场即时检测。

RPA 与 CRISPR/Cas12a 的反应温度相兼容,具有开发一步法检测平台的潜力。然而,CRISPR/Cas12a 的顺式切割活性会降解靶标 DNA,降低 RPA 反应的灵敏度,这限制了 RPA-CRISPR/Cas12a 一步法检测体系的发展,目前尚无奇异变形杆菌 RPA-CRISPR/Cas12a 一步法的研究报道。最新研究发现,CRISPR/Cas12a 对靶位点的识别并不严格受限于传统的原间隔序列临近基序(protospacer adjacent motif, PAM)序列要求,因而拓宽了 PAM 兼容性范围^[19-20]。这一发现为建立 RPA-CRISPR/Cas12a 一步法检测平台提供了新的可能性。因此,本研究旨在建立奇异变形杆菌 RPA-CRISPR/Cas12a 一步法检测平台,将 RPA 与 CRISPR/Cas12a 体系完全混合于单管中,实现扩增与检测反应的同时进行,无需开盖转移产物或离心混合操作,降低扩增产物交叉污染风险。通过与两步法检测平台比较,评价不同检测平台对不同应用场景的技术适配性。

综上所述,本研究将 RPA 与 CRISPR/Cas12a 系统结合,并基于不同 PAM 策略,分别建立奇异变形杆菌 RPA-CRISPR/Cas12a 一步法和两步法检测平台,实现对目标病原体的快速、灵敏检测,有助于减少误诊和漏诊,为临床精准治疗与环境病原监测提供了理论依据和技术支持。通过与两步法检测平台比较,进一步评估 RPA-CRISPR/Cas12a 一步法检测平台在自动化检测 and 多重检测领域的应用潜力,为未来开发多重病原体 CRISPR 检测芯片奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、溶血葡萄球菌(*S. haemolyticus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、费氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、摩氏摩根氏菌(*Morganella morganii*)各 1 株和 30 株奇异变形杆菌临床分离株,华西转化医学中心及公共卫生学院实验中心,并均已通过基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)鉴定。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 恒温快速扩增试剂盒(基础型),安普未来(常州)生物科技有限公司; TwistAmp[®] Basic kit, TwistDx 公司; EnGen[®] Lba Cas12a (Cpf1)核酸酶, New England Biolabs 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司; 人工尿液,福州飞净生物科技有限公司; DEPC 处理水, ThermoFisher Scientific 公司; 6×SuperStain Loading Buffer, 北京康为世纪生物科技有限公司; 250 bp DNA Ladder, 北

京擎科生物科技股份有限公司; Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; RPA 扩增引物寡核苷酸序列、奇异变形杆菌 *ureC* 保守基因质粒和 crRNA, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

干式恒温器,杭州奥盛仪器有限公司; 生物安全柜,青岛海尔生物医疗股份有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, ThermoFisher Scientific 公司; 核酸电泳仪,上海天能科技有限公司; 核酸电泳槽和凝胶成像分析仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 质粒及样品制备

以奇异变形杆菌的参考基因组序列(GenBank 登录号为 NC_010554.1)的 *ureC* 基因作为靶基因,从 NCBI 数据库下载奇异变形杆菌分离株的全基因序列,使用 DNAMAN 软件对各分离株的 *ureC* 基因序列进行比对,选择高度保守的区域设计质粒,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,使用 DEPC 水梯度稀释,制备浓度为 10^4 – 10^0 copies/ μ L 的质粒模板。所有菌株均在 LB 肉汤培养基中 37 °C、120 r/min 培养 12 h,30 株奇异变形杆菌临床分离株使用人工尿液配制浓度为 10^5 CFU/mL 的模拟尿液样本,其他菌株用生理盐水制备浓度梯度为 10^6 – 10^0 CFU/mL 的菌液样本。

1.4 引物、crRNA 及探针的设计与合成

根据 RPA 引物设计原则,利用 Primer Premier 6 设计 RPA 引物,并通过 NCBI-BLAST 验证引物的特异性。根据筛选后的最佳 RPA 引物靶向的序列区域,按照 crRNA 设计原则,以 5'-TTTV-3'和 5'-VTTC-3'(V 可为 A、G 和 C 三种碱基之一)两种 PAM 策略设计 crRNA。ssDNA 探针两端分别修饰 FAM 荧光基团和 BHQ1 淬灭基团作为信号报告分子。引物、crRNA 及探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

表 1 引物、crRNA 及探针序列

Table 1 Sequences of primers, crRNA, and probes

Name	Sequence (5'→3')
F1/2	GTCTGTCATCATCTCGATCCCTCTATTCTG
R1	ACGATTATTATCATTATCTGCGCTATCACCC
R2	AGTGC GTAAGATAACTTCTCCGACTCGTCCC
F3	CATTAATACCGTGGACGAGCATCTTGATATGTTGA
R3	GCCAAGTGC GTAAGATAACTTCTCCGACTC
qPCR F1	AACCCAACGATGCCTTAT
qPCR R1	GATTCAGCAAATGCCACA
crRNA1 (TTTC)	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGGUGAUGUCGUCAGACUCAC
crRNA2 (CTTG)	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUGAGUCUGACGACAUCACCG
crRNA3 (ATTC)	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGUCGCGAAACCAUUGCUGCAGAAG
ssDNA reporter	FAM-TTATTATT-BHQ1

1.5 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的建立

将 RPA 扩增体系和 CRISPR/Cas12a 切割体系集成至单个 PCR 反应管中(图 1)。

一步法 RPA-CRISPR/Cas12a 反应体系 (35 μL): 半管 RPA 冻干粉, 缓冲液 A 14.7 μL , 缓冲液 B 1.25 μL , 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 模板 1.2 μL , Cas12a (1 $\mu\text{mol/L}$) 1.75 μL , crRNA (1 $\mu\text{mol/L}$) 1.75 μL , ssDNA 探针(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.75 μL , NEBufferTM r2.1 3.5 μL , DEPC 处理水 7.1 μL 。反应体系在 39 $^{\circ}\text{C}$ 条件下于实时荧光定量 PCR 仪中反应 25 min, 每隔 30 s 采集 1 次荧光信号, 选取 20 min 时荧光强度进行分析。

两步法 RPA-CRISPR/Cas12a 反应体系: RPA 反应体系(25 μL)置于管底: 半管 RPA 冻干粉, 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.2 μL , 缓冲液 14.75 μL , DEPC 处理水 5.4 μL , MgOAc 1.25 μL , 模板 1.2 μL 。CRISPR/Cas12a 体系(10 μL)置于管盖内侧: Cas12a (1 $\mu\text{mol/L}$) 0.875 μL , crRNA (1 $\mu\text{mol/L}$) 1.75 μL , ssDNA 探针(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.875 μL , DEPC 水 3 μL , NEBufferTM r2.1 3.5 μL 。反应体系首先在 39 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 20 min, 然后通过瞬时离心将管盖上的 CRISPR/Cas12a 体系离心至管底, 与 RPA 扩增产物充分混匀, 最后在 39 $^{\circ}\text{C}$ 条件下于实时荧光定量 PCR 仪中反

应 10 min, 每隔 30 s 采集 1 次荧光信号, 选取 5 min 时荧光强度进行分析。

1.6 RPA 引物筛选

一步法 RPA 扩增体系: 根据 DNA 恒温快速扩增试剂盒(基础型)说明书, 在反应管中加入半管 RPA 冻干粉, 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 缓冲液 A 14.7 μL , DEPC 处理水 5.85 μL , 缓冲液 B 1.25 μL , 制成 23.8 μL 的 RPA 混合液。以 1.2 μL 质粒溶液为阳性模板, 以 DEPC 水为阴性对照。

两步法 RPA 扩增体系: 根据 TwistAmp[®] Basic kit 说明书, 在 PCR 反应管中加入半管 RPA 冻干粉, 正、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.2 μL , 缓冲液 14.75 μL , DEPC 处理水 5.4 μL , MgOAc 1.25 μL , 制成 23.8 μL 的 RPA 混合液。以 1.2 μL 质粒溶液为阳性模板, 以 DEPC 水为阴性对照。

RPA 引物筛选: 将 PCR 反应管在金属浴中于 39 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 min, 进行 RPA 扩增。随后, 在反应管中加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1, 体积比)提取液, 充分混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 提取扩增产物。提取物按 5:1 的比例加入 6 \times SuperStain Loading Buffer, 充分混合后使用 1.5%的琼脂糖凝胶在 90 V 恒压条件下电泳 30 min, 使用凝胶成像分析仪显影观察结果。

1.7 反应体系优化

一步法 RPA-CRISPR/Cas12a 反应体系优化: 以质粒(10^4 copies/ μL)为模板, 分别对一步法的引物体积、Cas12a 浓度、Cas12a/crRNA 比例、ssDNA 探针浓度和 crRNA [crRNA1 (5'-TTTV-3')、crRNA2 (5'-VTTV-3')、crRNA3 (5'-ATTC-3')]反应体系进行优化。

两步法 RPA-CRISPR/Cas12a 反应体系优化: 以质粒(10^4 copies/ μL)为模板, 对两步法的 RPA 引物体积、Cas12a 浓度、Cas12a/crRNA 比例、ssDNA 探针浓度和 crRNA [crRNA1 (5'-TTTV-3')、crRNA2 (5'-VTTV-3')、crRNA3 (5'-ATTC-3')]反应体系进行优化。

1.8 灵敏度分析

在最优反应体系下, 对不同浓度的质粒模板(10^4 – 10^0 copies/ μL)进行检测, 分析所建立方法的灵敏度。

1.9 特异性分析

在最优反应体系下, 对常见的致病菌(肺炎链球菌、溶血葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、费氏志贺氏菌、摩氏摩根氏菌和普通变形杆菌)进行检测, 分析所建立方法的特异性。

1.10 RT-qPCR 体系建立

每次反应中加入 $2\times\text{Ta}q$ Pro Universal SYBR qPCR Master Mix $10\ \mu\text{L}$ 、qPCR F1/F2 ($10\ \mu\text{mol/L}$) 各 $0.4\ \mu\text{L}$ 、基因组 DNA 和无菌水共 $9.2\ \mu\text{L}$, 总计 $20\ \mu\text{L}$ 。使用实时荧光定量 PCR 仪对 1.3 中制备的样本进行 RT-qPCR 检测。引物序列见表 1, 反应条件: $95\ ^\circ\text{C}$ 30 s; $95\ ^\circ\text{C}$ 10 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环, 每 30 s 收集 1 次荧光。

1.11 模拟样本检测

使用人工尿液将 30 份奇异变形杆菌临床株制备成 10^5 CFU/mL 的模拟尿液样本, 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行预处理, 采用 2 种方法进行检测, 并与 MALDI-TOF MS 结

果比较。

1.12 检测性能评估

分别使用热裂解法和细菌基因组 DNA 提取试剂盒对菌液样本进行预处理, 使用 2 种方法进行检测, 并与 RT-qPCR 结果进行比较。

1.13 统计学方法

所有实验均采用 3 次重复, 使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 RPA-CRISPR/Cas12a 检测流程

一步法检测流程如图 1A 所示, 使用热裂解法或细菌基因组 DNA 提取试剂盒对样本进行预处理; 取 $1.2\ \mu\text{L}$ 上清液于反应体系中, 充分混匀后将反应管放置在实时荧光定量 PCR 仪中 $39\ ^\circ\text{C}$ 条件下避光反应 25 min; 采集实时荧光信号。

两步法检测流程如图 1B 所示, 在两步法中将 RPA 反应与 CRISPR/Cas12a 反应分成两部分, 将 RPA 反应体系与 CRISPR/Cas12a 反应体系分别放置在反应管的管底和管盖内侧; 使用热裂解法或细菌基因组 DNA 提取试剂盒对样本进行预处理; 取 $1.2\ \mu\text{L}$ 上清液于 RPA 反应体系中, 充分混匀后将 CRISPR/Cas12a 反应体系加在管盖内侧, 将反应管放置在恒温装置中 $39\ ^\circ\text{C}$ 条件下避光反应 20 min; 然后通过瞬时离心将 CRISPR/Cas12a 反应体系与 RPA 反应体系充分混合, 在 $39\ ^\circ\text{C}$ 条件下反应 10 min, 采集实时荧光信号。

2.2 引物筛选结果

分别对 2 种方法进行 RPA 引物筛选, 结果如图 2 所示, 一步法与两步法均以引物组 F1/R1 扩增效率最高, 扩增产物条带清晰明亮, 并且对照组中未出现明显非特异性条带, 特异性良好, 灵敏度均可达到 10^0 copy/ μL ; 因此, 以引物组 F1/R1 进行后续实验。

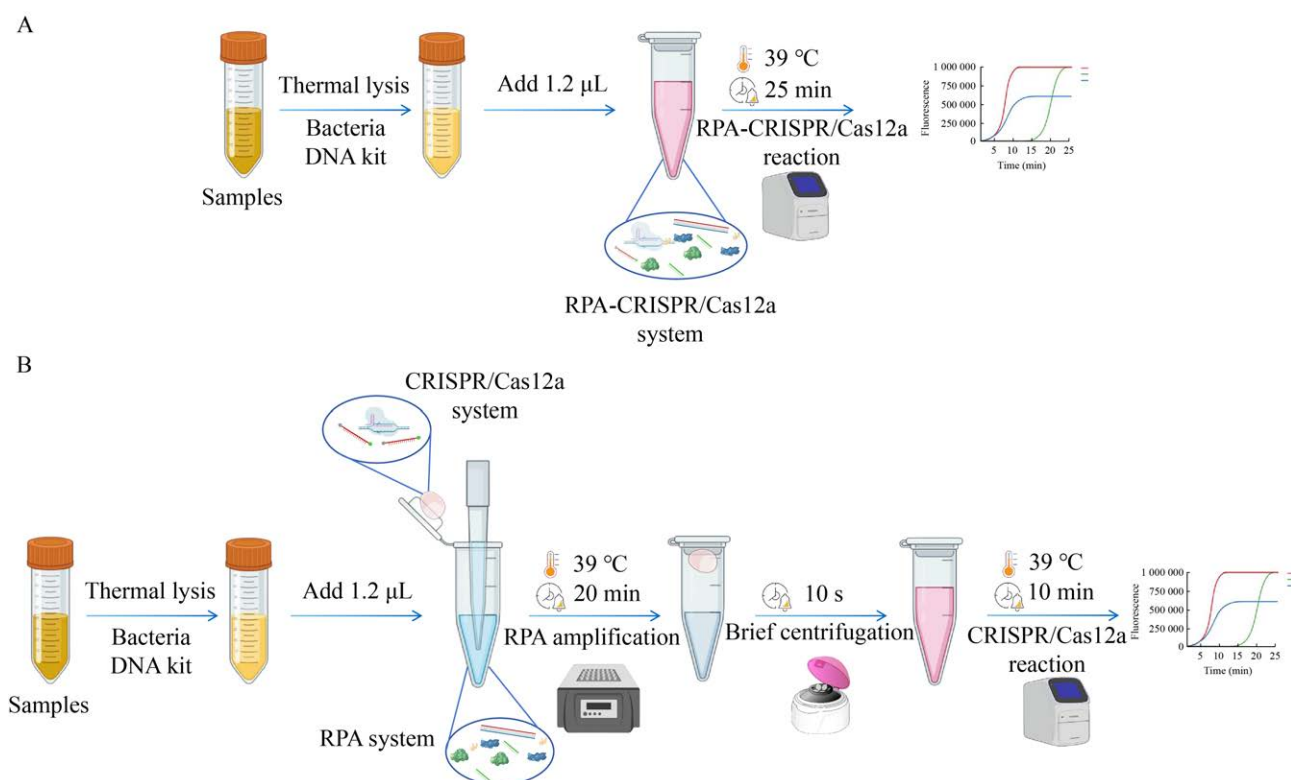


图 1 一步法(A)与两步法(B)检测技术流程示意图

Figure 1 Schematic diagram of one-step (A) and two-step (B) detection technology workflows.

2.3 反应条件优化结果

为使检测平台的检测性能达到最佳,我们对 RPA 引物体积、crRNA 设计、Cas12a 浓度、Cas12a/crRNA 比例、ssDNA 探针浓度等反应条件进行优化,所有优化均使用 10^4 copies/ μ L 的质粒作为模板。

RPA 引物优化结果如图 3 所示:随着引物体积增加,一步法与两步法的荧光强度变化小,两种方法均使用 1.2 μ L 引物体积作为最终引物浓度。

crRNA 筛选结果如图 4 所示:一步法 crRNA 优化结果图 4A 所示,在混合 RPA 反应体系和 CRISPR/Cas12a 反应体系后,携带次优 PAM 序列(ATTC)的 crRNA3 展现出显著优势,其反应体系荧光强度最高,达到平台期时间更短,因此被选定用于后续实验;而两步法 crRNA 优化结果如图 4B 所示,在分开 RPA 反应体系

和 CRISPR/Cas12a 反应体系后,带有最优 PAM 序列的 crRNA1 (TTTC)切割探针效率更高,展现出更优异的检测性能,所以最终选择 crRNA1 用于后续实验。

CRISPR/Cas12a 体系优化结果如图 5 和图 6 所示,结果表明,一步法与两步法在不同参数组合下呈现出差异化的荧光响应特性。一步法的参数优化结果如图 5A–5F 所示,其中 Cas12a 酶浓度与 Cas12a/crRNA 比例对荧光强度影响显著,当 Cas12a 酶浓度为 50 nmol/L、Cas12a/crRNA 比例为 1:1 时,荧光强度达到峰值;ssDNA 探针浓度与荧光强度呈正相关,但考虑成本经济效益,最终选择 250 nmol/L 为最终探针浓度。两步法结果如图 6A–6F 所示,Cas12a 酶浓度对荧光强度影响较小;当 Cas12a/crRNA 比例为 1:2,荧光强度达到峰值;而 ssDNA 探针浓度与荧光强度呈正相关,基于成本经济效益考虑,

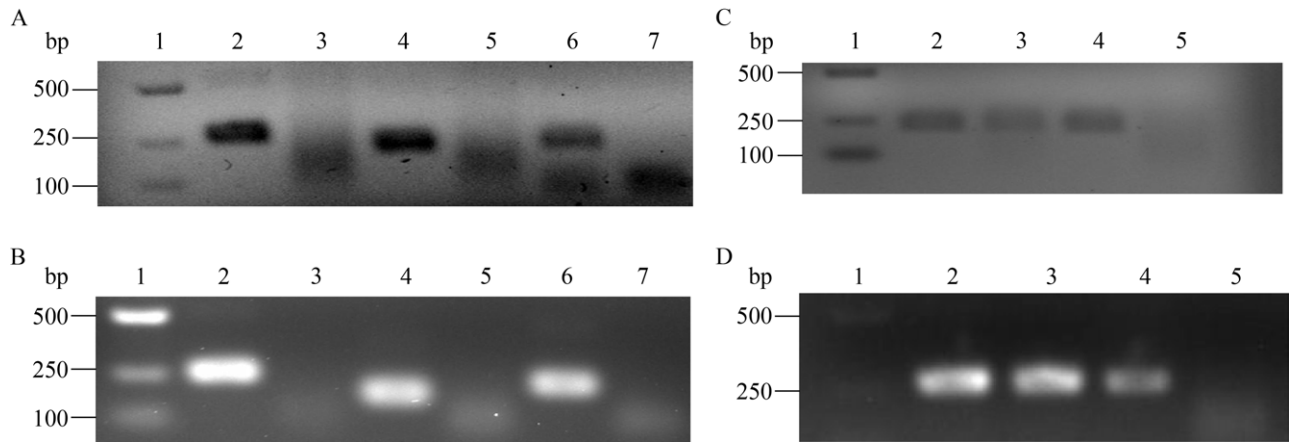


图 2 一步法与两步法重组酶聚合酶扩增引物筛选琼脂糖凝胶电泳图 A: 一步法 RPA 3 对引物筛选琼脂糖凝胶电泳图; B: 两步法 RPA 3 对引物筛选琼脂糖凝胶电泳图。1: 250 bp DNA Ladder; 2: 引物 F1/R1 (246 bp); 3: 引物 F1/R1 对照; 4: 引物 F2/R2 (171 bp); 5: 引物 F2/R2 对照; 6: 引物 F3/R3 (212 bp); 7: 引物 F3/R3 对照。C: 一步法 RPA 引物 F1/R1 扩增灵敏度琼脂糖凝胶电泳图; D: 两步法 RPA 引物 F1/R1 扩增灵敏度琼脂糖凝胶电泳图。1: 250 bp DNA Ladder; 2: 10^2 copies/ μL 质粒; 3: 10^1 copies/ μL 质粒; 4: 10^0 copy/ μL 质粒; 5: 阴性对照。

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of one-step and two-step recombinase polymerase amplification (RPA) primer screening. A: Agarose gel electrophoresis of three primer pairs for one-step RPA; B: Agarose gel electrophoresis of three primer pairs for two-step RPA. 1: 250 bp DNA Ladder; 2: Primers F1/R1 (246 bp); 3: Primers F1/R1 control; 4: Primers F2/R2 (171 bp); 5: Primers F2/R2 control; 6: Primers F3/R3 (212 bp); 7: Primers F3/R3 control). C: Agarose gel electrophoresis of the amplification sensitivity of one-step RPA using primer pair F1/R1. D: Agarose gel electrophoresis of the amplification sensitivity of two-step RPA using primer pair F1/R1. 1: 250 bp DNA Ladder; 2: 10^2 copies/ μL ; 3: 10^1 copies/ μL ; 4: 10^0 copy/ μL ; 5: Negative control.

选择酶浓度为 25 nmol/L、Cas12a/crRNA 比例为 1:2、探针浓度为 250 nmol/L 进一步实验。

2.4 灵敏度分析结果

将带有奇异变形杆菌 *ureC* 基因的质粒溶液等比稀释成不同浓度(10^0 – 10^4 copies/ μL), 以优化后的最佳反应条件检测质粒溶液, 分析方法的灵敏度, 结果如图 7A、7B 所示, 一步法与两步法均可检测低至 2.8 copies/ μL 的质粒。

2.5 特异性分析结果

使用本研究的 2 种方法对奇异变形杆菌、肺炎链球菌、溶血葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、费氏志贺氏菌、摩氏摩根氏菌及普通变形杆菌进行检测, 结果如图 8A、8B 所示, 奇异变形杆

菌产生的荧光信号明显高于对照组和其他细菌。结果表明, 一步法与两步法均对奇异变形杆菌具有很高的特异性, 与其他细菌无交叉反应。

2.6 模拟样本检测结果

本研究通过模拟从样本前处理到检测的完整流程, 并使用 2 种方法对奇异变形杆菌临床分离株模拟尿液样本进行检测, 以验证本方法应用于真实样本的效能。结果如图 9 所示, 所有模拟样本均检出阳性, 与 MALDI-TOF MS 结果完全一致。

2.7 检测性能评估结果

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取和热裂解 2 种前处理方法对含梯度浓度(10^6 – 10^0 CFU/mL) 的菌液样本进行预处理, 随后在最优条件下使

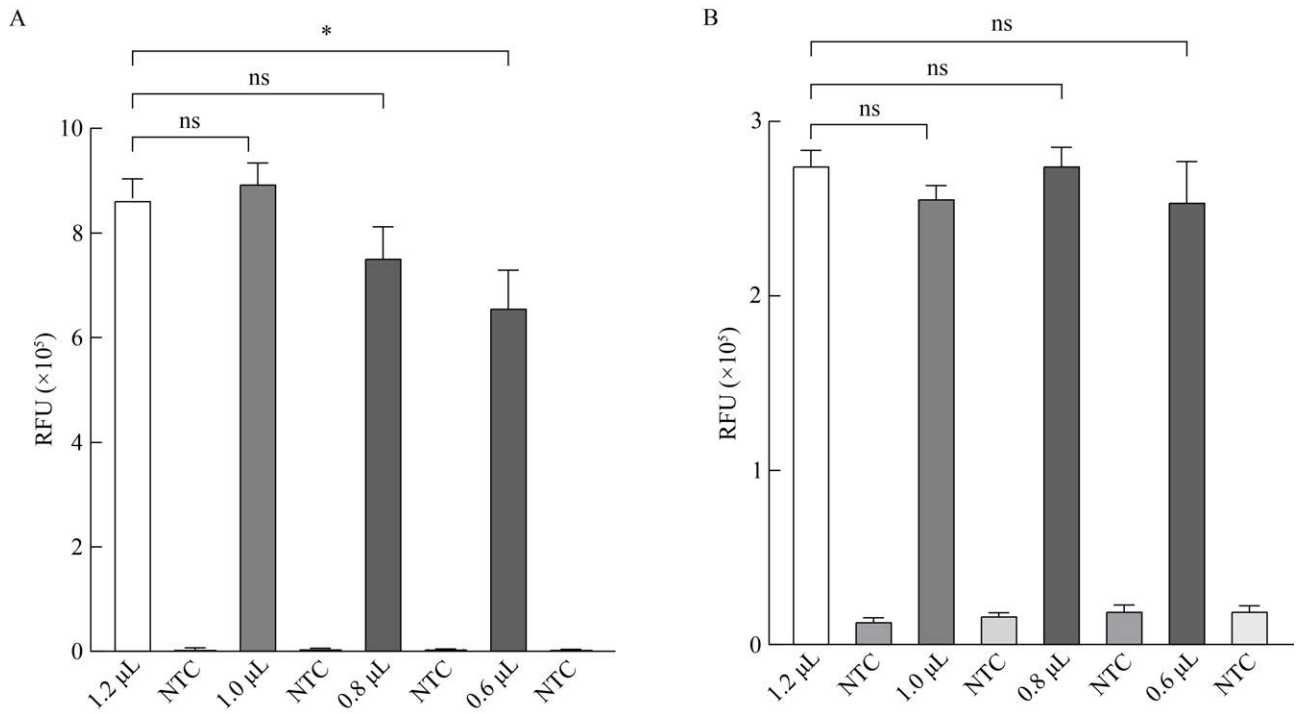


图 3 重组酶聚合酶扩增引物体积优化示意图 A: 一步法 RPA 引物浓度优化; B: 两步法 RPA 引物浓度优化。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; NTC: 非靶标对照; ns: 不显著。下同。

Figure 3 Schematic diagram of recombinase polymerase amplification (RPA) primer volume optimization. A: Primer concentration optimization for the one-step RPA method; B: Primer concentration optimization for the two-step RPA method. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; NTC: Non-target control; ns: Not significant. The same below.

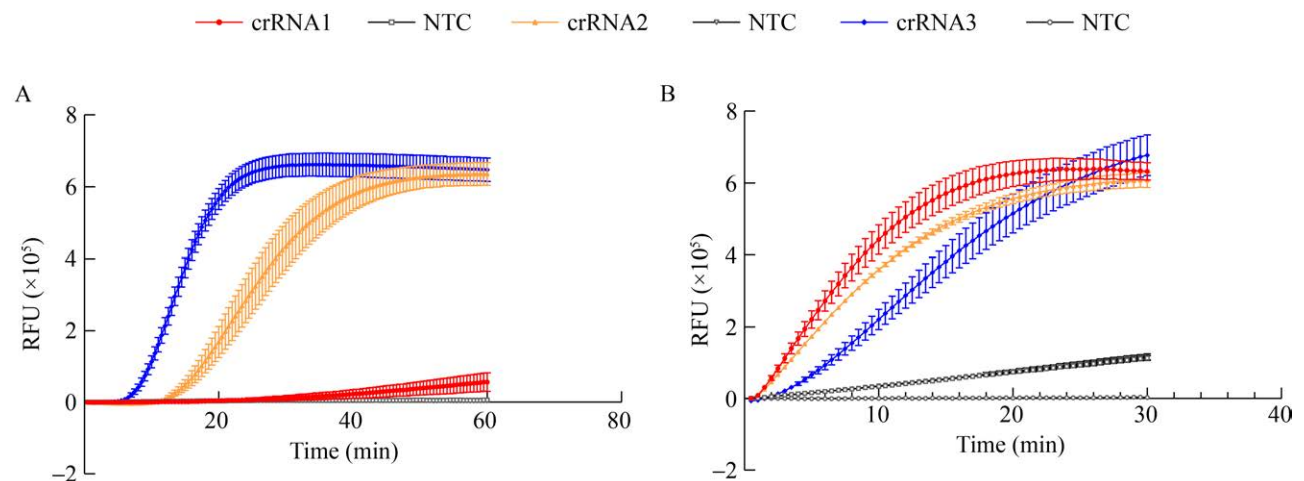


图 4 crRNA 筛选结果示意图 A: 一步法 crRNA 筛选; B: 两步法 crRNA 筛选。

Figure 4 Schematic diagram of crRNA screening results. A: crRNA screening for the one-step method; B: crRNA screening for the two-step method.

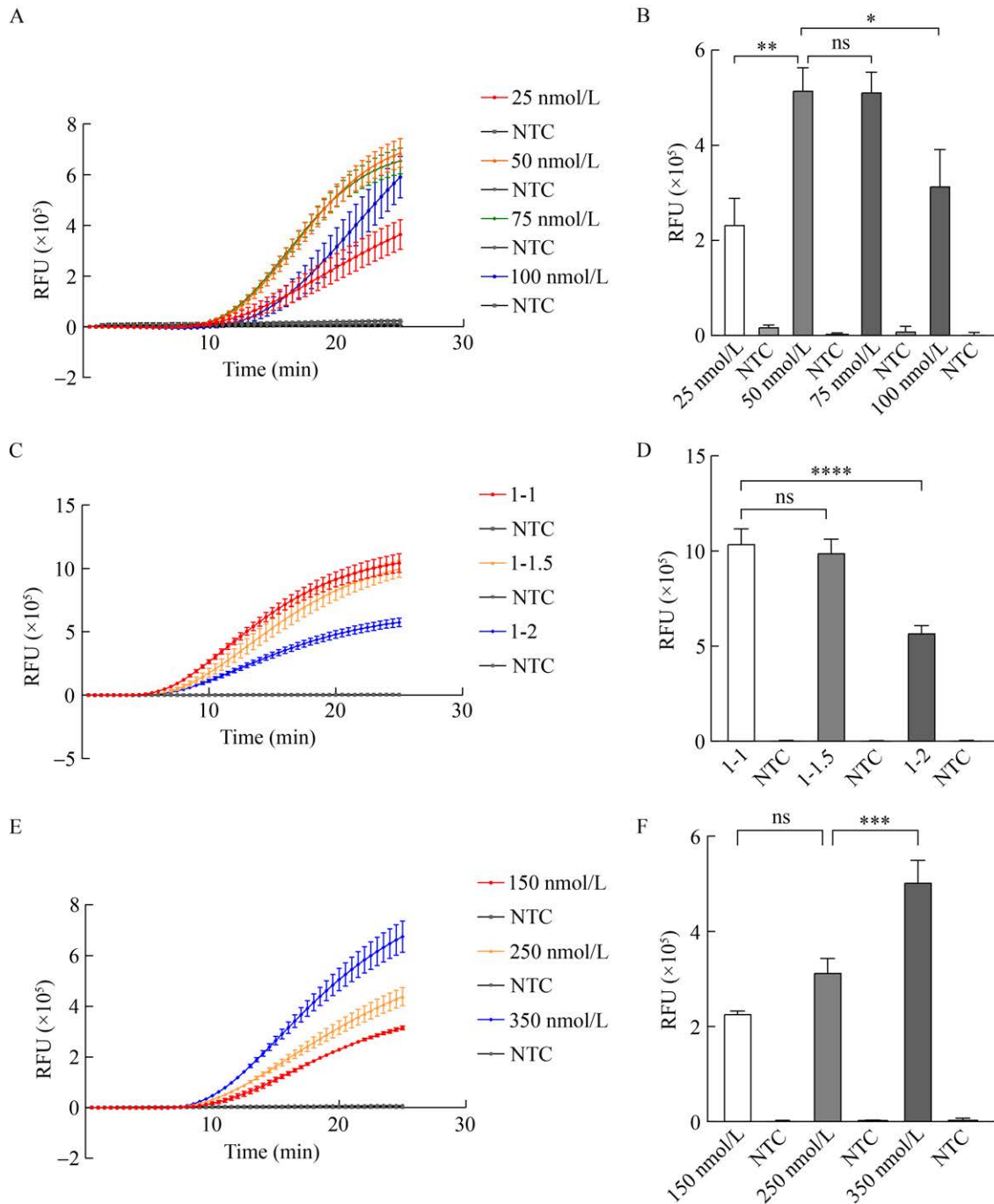


图 5 一步法 CRISPR/Cas12a 体系优化结果示意图 A: Cas12a 酶浓度优化结果折线图; B: Cas12a 酶浓度优化结果柱状图; C: Cas12a/crRNA 比例优化结果折线图; D: Cas12a/crRNA 比例优化结果柱状图; E: ssDNA 探针浓度优化结果折线图; F: ssDNA 探针浓度优化结果柱状图。

Figure 5 Schematic diagram of one-step CRISPR/Cas12a system optimization results. A: Cas12a enzyme concentration optimization (line chart); B: Cas12a enzyme concentration optimization (bar chart); C: Cas12a/crRNA ratio optimization (line chart); D: Cas12a/crRNA ratio optimization (bar chart); E: ssDNA reporter probe concentration optimization (line chart); F: ssDNA reporter probe concentration optimization (bar chart).

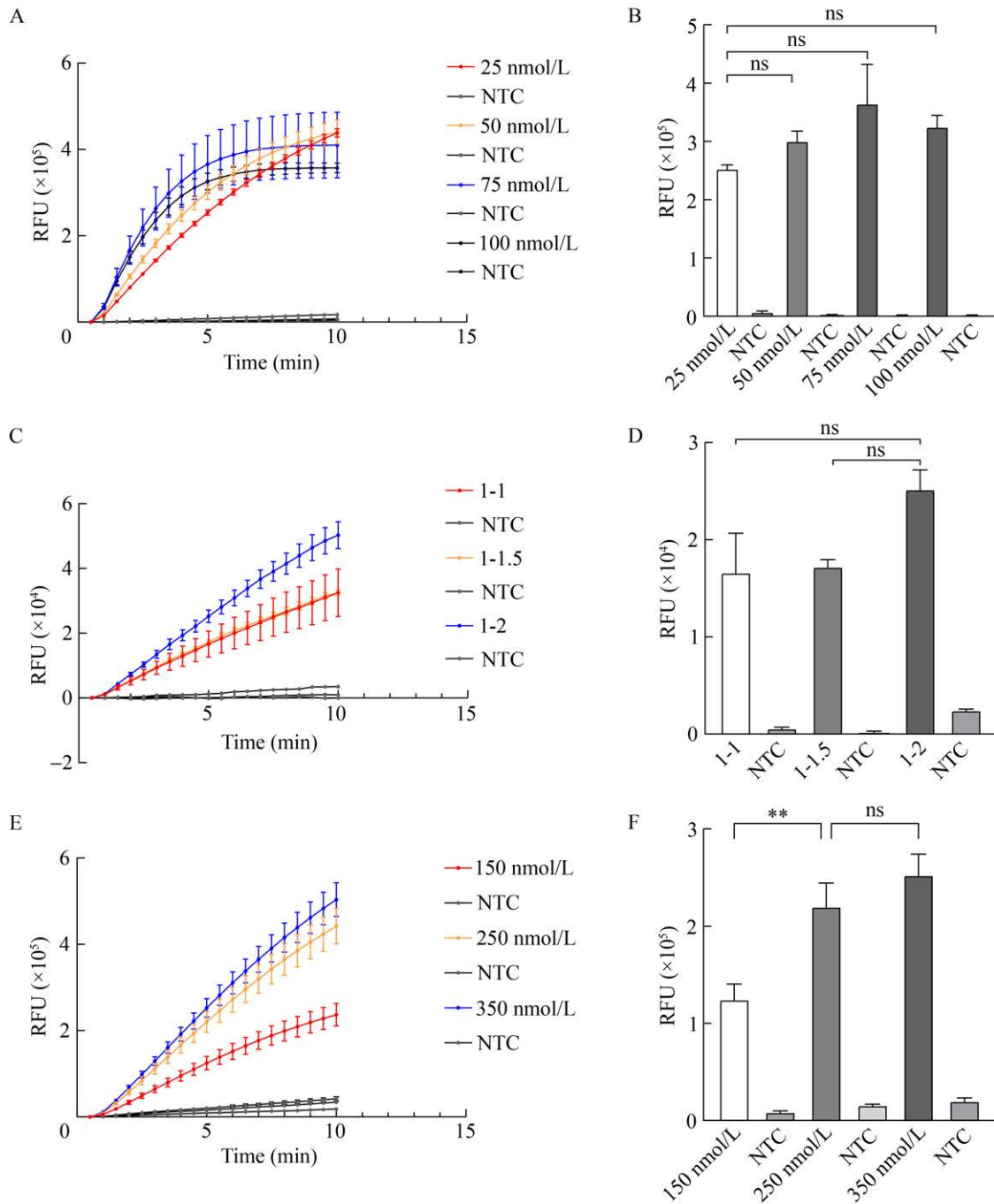


图 6 两步法 CRISPR/Cas12a 体系优化结果示意图 A: Cas12a 酶浓度优化结果折线图; B: Cas12a 酶浓度优化结果柱状图; C: Cas12a/crRNA 比例优化结果折线图; D: Cas12a/crRNA 比例优化结果柱状图; E: ssDNA 探针浓度优化结果折线图; F: ssDNA 探针浓度优化结果柱状图。

Figure 6 Schematic diagram of one-step CRISPR/Cas12a system optimization results. A: Cas12a enzyme concentration optimization (line chart); B: Cas12a enzyme concentration optimization (bar chart); C: Cas12a/crRNA ratio optimization (line chart); D: Cas12a/crRNA ratio optimization (bar chart); E: ssDNA reporter probe concentration optimization (line chart); F: ssDNA reporter probe concentration optimization (bar chart).

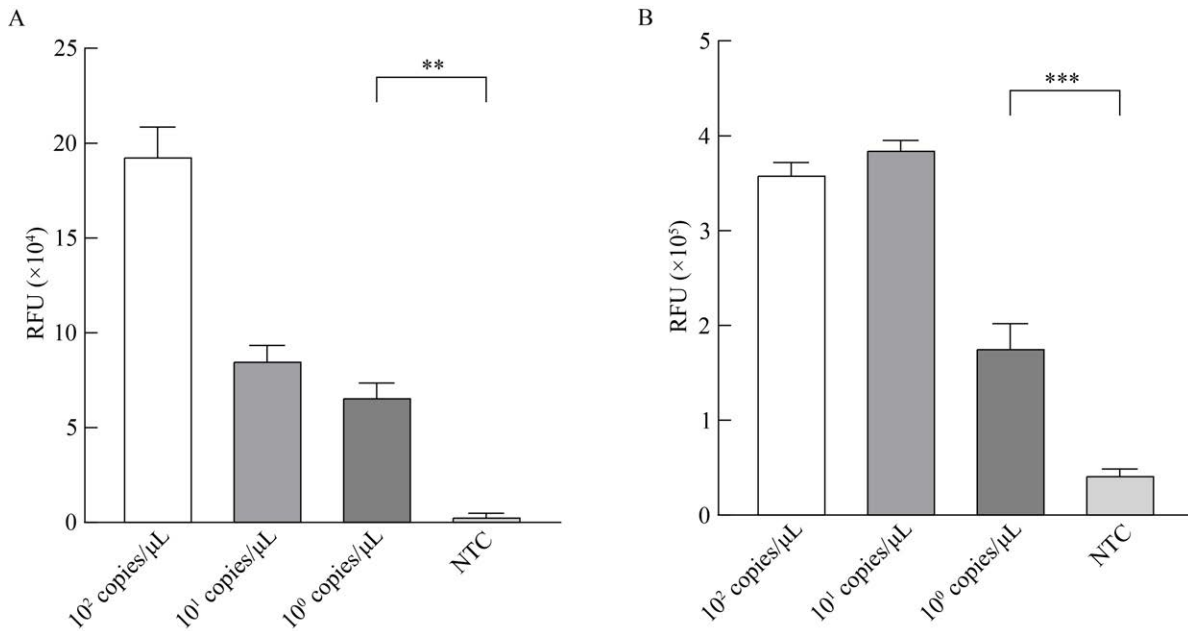


图7 灵敏度分析结果示意图 A: 一步法灵敏度分析; B: 两步法灵敏度分析。

Figure 7 Schematic diagram of sensitivity analysis results. A: Sensitivity analysis using the one-step method; B: Sensitivity analysis using the two-step method.

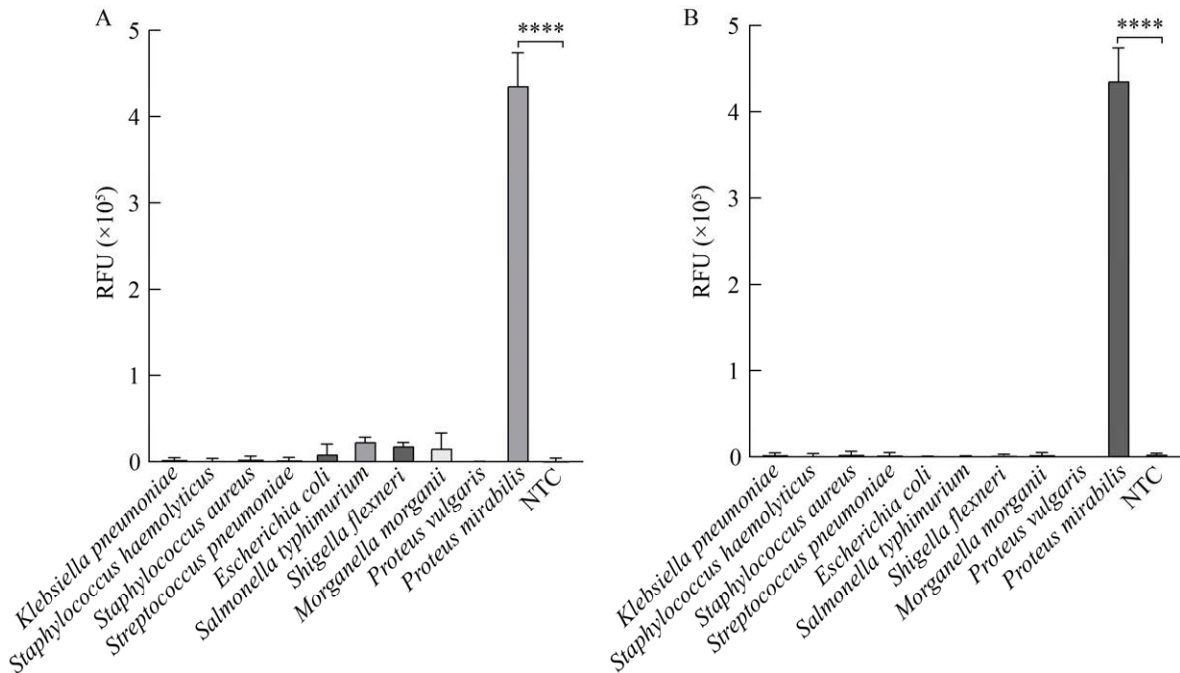


图8 特异性分析结果示意图 A: 一步法特异性分析; B: 两步法特异性分析。

Figure 8 Schematic diagram of specificity analysis results. A: Specificity analysis using the one-step method; B: Specificity analysis using the two-step method.

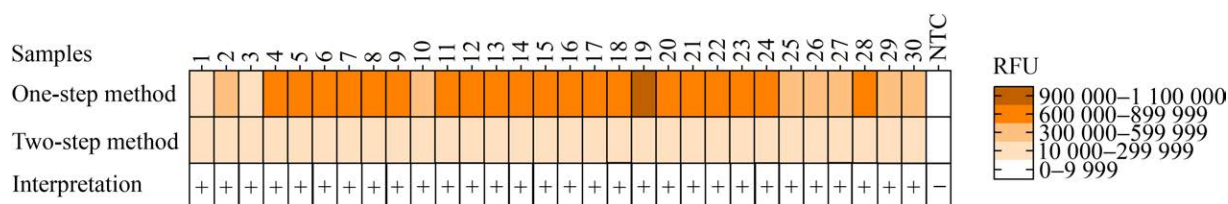


图9 模拟样本检测结果示意图

Figure 9 Schematic diagram of simulated sample detection results.

用 2 种方法进行检测，并与常规的 RT-qPCR 方法进行比较，以评估该方法的可靠性。结果如图 10A–10F 所示，使用热裂解法预处理时，一步法可检出含 10^6 CFU/mL 奇异变形杆菌的菌液样本，而两步法和 RT-qPCR 均可以检出含 10^3 CFU/mL 奇异变形杆菌的菌液样本；而使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒预处理时，一步法可以检出含 10^2 CFU/mL 奇异变形杆菌的菌液样本，而两步法和 RT-qPCR 均可以检出含 10^1 CFU/mL 奇异变形杆菌的菌液样本。

3 讨论

近年来，奇异变形杆菌的感染流行趋势不断扩大，由奇异变形杆菌引起的疾病种类逐渐增加，对人类和动物的生命健康构成了严重威胁。但是目前仍然缺少针对奇异变形杆菌的快检技术研究，传统的细菌分离培养鉴定耗时耗力，而 RT-qPCR 检测则对仪器设备和实验室环境有较高要求，难以满足现场即时检测需求。

针对以上问题，本研究设计了 2 种基于 RPA 和 CRISPR/Cas12a 的奇异变形杆菌检测方法，2 种方法均可在 30 min 内检测到 2.8 copies/ μ L 的细菌核酸，具有快速检测的优势。在使用热裂解预处理时一步法和两步法检测灵敏度分别为 10^6 CFU/mL 和 10^3 CFU/mL，而在使用基因组提取试剂盒预处理时一步法和两步法检测灵敏度分别为 10^2 CFU/mL 和 10^1 CFU/mL，涵盖了各类尿路感染的诊断阈值^[21]，因此，本研究建立的 2 种方法可用于参考判定尿路感染是否有临床意义。相较于传统的细菌分离培养鉴定方法，本方法显著缩短了检测时间，具有更高

的灵敏度和特异性；相较于 RT-qPCR 技术，本方法对样本质量要求较低，无需依赖精密仪器设备，其全封闭反应体系可有效避免气溶胶污染，对实验环境要求更低，更适用于在基层医疗机构推广应用。相较于其他检测方法，本方法不仅检测时间更短、操作更简便，并且在使用细菌基因组提取试剂盒对样本进行预处理后，一步法和两步法的灵敏度均显著高于其他方法(表 2)。本研究基于不同 PAM 序列设计策略建立了 2 种检测平台，结果表明，次优 PAM 序列更适合一步法，这可能是因为有次优 PAM 序列(例如 5'-VTTV-3'、5'-TCTV-3' 和 5'-TTVV-3'等)的 crRNA 与带有最优 PAM 序列(5'-TTTV-3')的 crRNA 相比，在与 Cas12a 蛋白结合后，形成的 Cas12a 蛋白-gRNA 复合物具有较弱的顺式切割活性和相似的反式切割活性，因此，不会明显阻碍 RPA 扩增，并且对探针切割效力影响不大，这与 Lu 等^[19]的研究结果一致。相较于两步法，一步法灵敏度较低，但是操作更加便捷、检测时间更短，仅需一个便携的恒温装置和荧光信号检测装置即可完成检测，适合用于现场筛查；两步法灵敏度更高，适合用于后续的实验室验证，可减少假阴性，两者结合能够形成完整的检测闭环，既能实现现场筛查，又能提供实验室验证支持。

近年来，对病原体进行自动化和多重检测已成为发展趋势，本方法所建立的 2 种方法仅需 1 次加样即可完成检测，而无需额外的转移、变温等操作，具备与其他自动化高通量技术相结合潜力，展现出广泛的应用前景。未来，我们计划将一步法反应体系与高通量微流控技

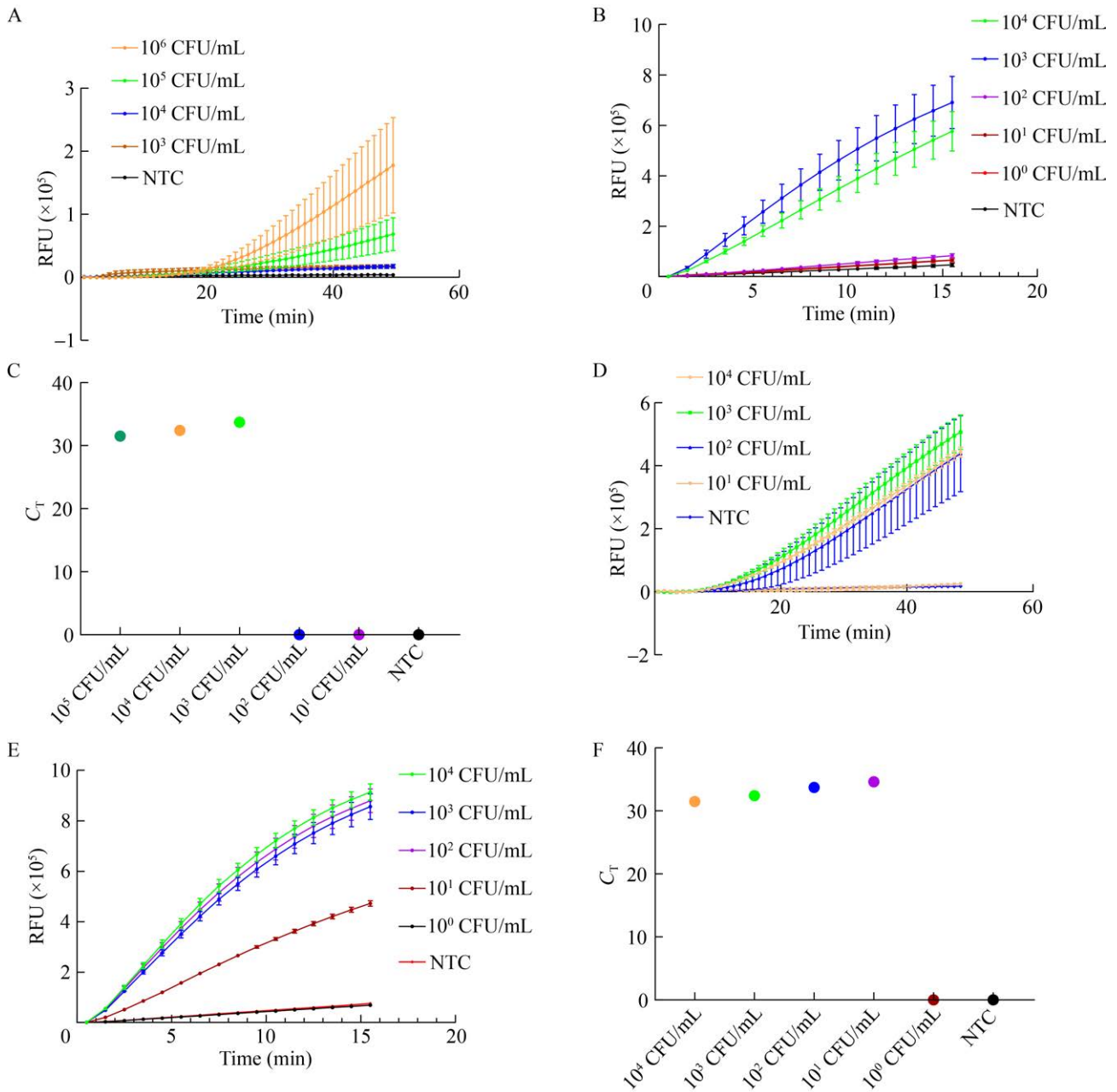


图 10 检测性能评估结果示意图 A: 热裂解预处理时一步法菌液灵敏度分析; B: 热裂解预处理时两步法菌液灵敏度分析; C: 热裂解预处理时 RT-qPCR 菌液灵敏度分析; D: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒预处理时一步法菌液灵敏度分析; E: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒预处理时两步法菌液灵敏度分析; F: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒预处理时 RT-qPCR 菌液灵敏度分析。

Figure 10 Schematic diagram of assay performance evaluation results. A: Sensitivity analysis of bacterial suspension using the one-step method under thermal lysis pretreatment; B: Sensitivity analysis of bacterial suspension using the two-step method under thermal lysis pretreatment; C: Sensitivity analysis of bacterial suspension using RT-qPCR under thermal lysis pretreatment; D: Sensitivity analysis of bacterial suspension using the one-step method with bacterial genomic DNA extraction kit pretreatment; E: Sensitivity analysis of bacterial suspension using the two-step method with bacterial genomic DNA extraction kit pretreatment; F: Sensitivity analysis of bacterial suspension using RT-qPCR with bacterial genomic DNA extraction kit pretreatment.

表 2 本方法与其他奇异变形杆菌检测方法的比较

Table 2 Comparison between this method and other *Proteus mirabilis* detection approaches

方法 Method	时间 Time	样品类型 Sample type	灵敏度 Sensitivity	参考文献 Reference
PCR	3 h	Urine of humans/water	10 ³ CFU/mL	[11]
RT-qPCR	<3 h	Urine of humans/water	10 ¹ CFU/mL	[11]
Multiplex RT-qPCR	<2 h	Food samples	10 ³ CFU/g	[22]
Culture-based method	48 h	—	—	[23]
LAMP	1 h 30 min	Urine of humans	10 ³ CFU/mL	[24]
One-step method (Thermal lysis)	25 min	Normal saline	10 ⁶ CFU/mL	This text
One-step method (Bacteria DNA kit)	55 min	Normal saline	10 ² CFU/mL	This text
Two-step method (Thermal lysis)	30 min	Normal saline	10 ³ CFU/mL	This text
Two-step method (Bacteria DNA kit)	1 h	Normal saline	10 ¹ CFU/mL	This text

—: 文中未提到。

—: It is not mentioned in the original text.

术结合, 实现对样本中多种病原体同时进行检测, 推动 RPA-CRISPR/Cas12a 技术在病原体多重检测方向的发展。

然而, 本研究所建立的 2 种方法也存在一定的局限性, 由于 RPA-CRISPR/Cas12a 反应过程受到酶活性、离子浓度等因素的影响, 导致荧光信号是非线性的, 因此 2 种方法均无法做到定量检测, 在检测尿液样本时本研究所构建的热裂解法预处理的一步法灵敏度为 10⁶ CFU/mL, 略高于有症状尿路感染诊断阈值, 可能会存在漏诊情况, 可进一步使用热裂解法预处理的两步法进行验证, 以减少假阴性情况。两步法所使用的 RPA 试剂盒与 CRISPR/Cas12a 反应体系兼容性较差, 无法开发成一步法, 更换 RPA 试剂盒后, 发现一步法灵敏度低于两步法, 我们推测该 RPA 试剂盒对菌体蛋白等抑制剂耐受性较弱, 在使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对样本进行预处理后, 2 种方法灵敏度更加接近, 进一步证实此猜想。并且在一步法中, CRISPR/Cas12a 的顺式切割活性仍然会对 RPA 扩增的目标 DNA 产生干扰, 从而降低一步法的检测效能, 也可能导致一步法灵敏度下降。此外, 本研究缺少足够的临床样本用于验证 2 种检测方法的检测效能, 后续将持续增加临床样

本数, 进一步验证一步法与两步法检测平台的实际检测效果。

4 结论

本研究成功建立了 2 种基于 RPA-CRISPR/Cas12a 的奇异变形杆菌检测方法, 均可在 30 min 内检测到 2.8 copies/μL 的质粒溶液, 与其他常见致病菌无交叉反应, 完全满足实际检测的需求。使用热裂解法预处理样本时, 一步法可以检出含 10⁶ CFU/mL 浓度的奇异变形杆菌菌液, 两步法最低可以检测到 10³ CFU/mL 浓度的菌液; 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒预处理样本时, 一步法检测限提升至 10² CFU/mL, 两步法检测限提升至 10¹ CFU/mL。相较于 RT-qPCR 等传统分子诊断方法, 本方法检测速度更快, 可在 1 h 内完成从样本预处理到结果显示的全部检测流程, 并且对检测仪器和实验环境要求更低, 仅需简单的恒温装置和荧光检测装置, 以及洁净工作台, 即可完成对奇异变形杆菌的快速、灵敏的检测。此外, 2 种检测方法相互补充, 能够形成现场筛查到实验室验证支持的完整的检测闭环, 为在设备相对落后的基层医疗机构或偏远地区实现该病原菌的快速筛查和诊断提供了新的技术方案。

作者贡献声明

江艺浩：提出概念，方案设计，实验操作，数据分析，撰写文章；唐田：方案设计，监督指导，方法论；余婕：方案设计，实验操作，数据分析；甘善萍：方案设计，实验操作，数据分析；谢轶：提供材料，提供资源；何秋蓉：监督指导，提供材料，提供资源；杨罗、田绿波：提供材料，提供资源；汪川：方案设计，监督指导，提供材料，稿件润色修改，审阅，获取基金。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] DRZEWIECKA D. Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments[J]. *Microbial Ecology*, 2016, 72(4): 741-758.
- [2] YANG AY, TIAN YC, LI XC. Unveiling the hidden arsenal: new insights into *Proteus mirabilis* virulence in UTIs[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2024, 14: 1465460.
- [3] BERGER SA. *Proteus* bacteraemia in a general hospital 1972-1982[J]. *The Journal of Hospital Infection*, 1985, 6(3): 293-298.
- [4] WASFI R, HAMED SM, AMER MA, FAHMY LI. *Proteus mirabilis* biofilm: development and therapeutic strategies[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 414.
- [5] LEICHTLE A, LUPATSII M, GRASPEUNTNER S, JESCHKE S, PENXOVÁ Z, KURABI A, RYAN AF, RUPP J, PRIES R, BRUCHHAGE KL. Anti-inflammatory response to 1,8-cineol and associated microbial communities in Otitis media patients[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 16362.
- [6] ENDIMIANI A, LUZZARO F, BRIGANTE G, PERILLI M, LOMBARDI G, AMICOSANTE G, ROSSOLINI GM, TONIOLO A. *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum beta-lactamases[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(7): 2598-2605.
- [7] MO S, DURRANI AF, SAFIULLAH Z, KOWALSKI RP, JHANJI V. *Proteus mirabilis* keratitis: risk factors, clinical features, treatment outcomes, and microbiological characteristics[J]. *Cornea*, 2021, 40(6): 704-709.
- [8] SOLIMAN S, ABDALLA S, ZEDAN A, ENANY S. Genomic profiling of pan-drug resistant *Proteus mirabilis* Isolates reveals antimicrobial resistance and virulence gene landscape[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2024, 24(5): 154.
- [9] EITAWHEEL M, SAID HS, BARWA R. Emergence of extensive drug resistance and high prevalence of multidrug resistance among clinical *Proteus mirabilis* isolates in Egypt[J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2024, 23(1): 46.
- [10] RIFFON R, SAYASITH K, KHALIL H, DUBREUIL P, DROLET M, LAGACÉ J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(7): 2584-2589.
- [11] ZHANG WW, NIU ZL, YIN K, LIU P, CHEN LX. Quick identification and quantification of *Proteus mirabilis* by polymerase chain reaction (PCR) assays[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(2): 683-689.
- [12] DEVEAU H, GARNEAU JE, MOINEAU S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 475-493.
- [13] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(8): 490-507.
- [14] CHEN JS, MA EB, HARRINGTON LB, Da COSTA M, TIAN XR, PALEFSKY JM, DOUDNA JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [15] SUN YY, YU L, LIU CX, YE ST, CHEN W, LI DC, HUANG WR. One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2021, 19(1): 74.
- [16] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, KELLNER MJ, JOUNG J, COLLINS JJ, ZHANG F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [17] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, KIM NG, WOOLLEY AE, SEGEL M, BARRETTO RPJ, RANU A, MACRAE RK, FAURE G, IOANNIDI EI, KRAJESKI RN, BRUNEAU R, HUANG MW, YU XG, LI JZ, WALKER BD, HUNG DT, GRENINGER AL, JEROME KR, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, ZHANG F. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [18] LI LX, LI SY, WU N, WU JC, WANG G, ZHAO GP,

- WANG J. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2228-2237.
- [19] LU SH, TONG XH, HAN Y, ZHANG K, ZHANG YZ, CHEN QB, DUAN JY, LEI XL, HUANG MH, QIU Y, ZHANG DY, ZHOU X, ZHANG Y, YIN H. Fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using suboptimal protospacer adjacent motifs for Cas12a[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(3): 286-297.
- [20] LIN KF, GUO JG, GUO XJ, LI QH, LI X, SUN Z, ZHAO ZH, WENG J, WU JZ, ZHANG R, LI BA. Fast and visual detection of nucleic acids using a one-step RPA-CRISPR detection (ORCD) system unrestricted by the PAM[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1248: 340938.
- [21] 国家卫生健康委员会. 尿液标本临床微生物实验室检验操作指南: WS/T 489—2024[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
- Guidelines for the testing of urine specimens in the clinical microbiology laboratory: WS/T 489—2024[S]. Beijing: Standards Press of China, 2024 (in Chinese).
- [22] YANG R, XU GY, WANG XY, QING ZC, FU LZ. Establishment and application of a dual TaqMan real-time PCR method for *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2020, 69(3): 293-300.
- [23] BENJUMEA C, NAVARRO F, ALONSO-TARRÉS C. Improving the diagnosis of urinary tract infections by the use of enriched media and a 48-hour incubation period[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2024, 73(6): 001846.
- [24] RIVOARILALA LO, VICTOR J, CRUCITTI T, COLLARD JM. LAMP assays for the simple and rapid detection of clinically important urinary pathogens including the detection of resistance to 3rd generation cephalosporins[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2021, 21(1): 1037.