



# 基于 CRISPR/Cas13a 的金黄色葡萄球菌 *mecA* 耐药基因检测方法的建立

胡强<sup>1,2</sup>, 李浩<sup>2</sup>, 胡晓丰<sup>3</sup>, 韩尧<sup>2</sup>, 孙岩松<sup>1,2\*</sup>, 柳燕<sup>1\*</sup>

1 安徽医科大学基础医学院, 安徽 合肥 230032

2 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 北京 100071

3 中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100071

胡强, 李浩, 胡晓丰, 韩尧, 孙岩松, 柳燕. 基于 CRISPR/Cas13a 的金黄色葡萄球菌 *mecA* 耐药基因检测方法的建立[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3628-3640.

HU Qiang, LI Hao, HU Xiaofeng, HAN Yao, SUN Yansong, LIU Yan. A CRISPR/Cas13a-based detection method for the drug resistance gene *mecA* of *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3628-3640.

**摘要:**【目的】针对目前耐药基因检测通常需要依赖专业检测设施和设备, 仍缺乏耐药基因快速检测方法这一问题, 旨在建立一种基于成簇规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) *mecA* 耐药基因快速检测方法。【方法】首先在 *mecA* 基因序列的保守区中设计筛选出灵敏度较高的重组酶介导链替换核酸扩增(recombinase aided amplification, RAA)引物和 CRISPR RNA (CRISPR RNA, crRNA), 通过结合消线法核酸检测试纸技术(easy-readout and sensitive enhanced, ERASE)建立针对 *mecA* 基因的检测方法, 最后利用模拟样本及临床分离样本对建立的新方法与传统方法进行比较。【结果】成功筛选出了 1 组针对 *mecA* 耐药基因的高效扩增引物和 crRNA, 并建立了基于 CRISPR-ERASE 的 *mecA* 耐药基因高灵敏核酸检测方法, 最低检出限为 10 copies/ $\mu$ L, 在 32 株临床分离的金黄色葡萄球菌中, 该方法共检出 24 株 *mecA* 耐药基因阳性菌株, 与药敏试验及荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测结果符合率为 100%。【结论】建立了一种基于 CRISPR-ERASE 核酸检测试纸技术的简单、高灵敏的 *mecA* 耐药基因检测方法。

**关键词:** CRISPR; 等温扩增; *mecA*; 核酸检测; ERASE 试纸

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2301100)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2301100).

\*Corresponding authors. E-mail: SUN Yansong, sunys6443@126.com; LIU Yan, yanliu@ahmu.edu.cn

Received: 2023-01-14; Accepted: 2023-03-27; Published online: 2023-04-04

# A CRISPR/Cas13a-based detection method for the drug resistance gene *mecA* of *Staphylococcus aureus*

HU Qiang<sup>1,2</sup>, LI Hao<sup>2</sup>, HU Xiaofeng<sup>3</sup>, HAN Yao<sup>2</sup>, SUN Yansong<sup>1,2\*</sup>, LIU Yan<sup>1\*</sup>

1 School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China

2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Chinese People's Liberation Army Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

3 Chinese People's Liberation Army Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China

**Abstract: [Objective]** To address the problem that the detection of drug resistance gene usually relies on specialized devices and the lack of rapid detection methods, we aimed to establish a rapid detection method for the drug resistance gene *mecA* of *Staphylococcus aureus* based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). **[Methods]** Firstly, we designed and screened the recombinase-aided amplification (RAA) primers and CRISPR RNA (crRNA) with high sensitivity according to the conserved region of *mecA*. Then, we established the detection method for *mecA* with the easy-readout and sensitive enhanced (ERASE) strip. Finally, we used simulated samples and clinical isolated samples to compare the established method with the traditional method. **[Results]** A set of efficient RAA primers and crRNAs targeting *mecA* were successfully screened out, and a highly sensitive CRISPR-ERASE-based nucleic acid detection method was established for *mecA*. This method can detect *mecA* at a minimum concentration of 10 copies/ $\mu$ L. Among 32 clinical isolates of *S. aureus*, 24 strains were tested positive for *mecA* by the established method, which was in 100% agreement with the results of antimicrobial susceptibility test and quantitative real-time PCR (qPCR). **[Conclusion]** A CRISPR-ERASE-based simple and sensitive method for detecting the drug resistance gene *mecA* was established.

**Keywords:** CRISPR; isothermal amplification; *mecA*; nucleic acid detection; ERASE strips

自 1961 年人类首次发现了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的 60 年以来, MRSA 感染的患者在临床上已经十分常见<sup>[1-2]</sup>。MRSA 耐药性来自于葡萄球菌盒式染色体(staphylococcal cassette chromosome) *mec* 中的 *mecA* 基因, 该基因编码的青霉素结合蛋白(penicillin-binding protein, PBP2a)可水解破坏  $\beta$ -内酰胺抗生素, 进而产生对  $\beta$ -内酰胺类抗生素<sup>[3-4]</sup>(青霉素、甲氧西林和苯唑西林等)耐药。目前, 药敏试验(antimicrobial susceptibility test, AST)作为检测

微生物耐药性(anti-microbial resistance, AMR)的经典方法<sup>[5]</sup>, 能够准确判断病原菌的耐药表型, 但是这种基于细菌培养的方法需要几天甚至几周的时间, 一定程度上延误了患者的治疗。随着核酸检测技术的发展, 研究人员已建立了基于荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)的 MRSA 核酸检测方法<sup>[6]</sup>。荧光定量 PCR 检测技术虽能实现对耐药基因的快速检测, 但仍需依靠专业的实验室和精密的检测设备, 不利于基层及偏远地区的医疗卫生机构开展耐药检测。因此, 为了进一步推动耐药检测技术的前移下移, 便于

早期及时发现细菌耐药性的产生,亟需一种更加灵敏、简单的核酸检测方法。

近年来, CRISPR/Cas 系统在病原体核酸检测方面得到了迅速发展<sup>[7-8]</sup>。2017 年,美国的张锋团队<sup>[9]</sup>首次将 CRISPR/Cas13a 系统与等温扩增技术相结合,建立了 SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter unLOCKing)分子诊断平台。科研人员在此基础上,通过结合不同的扩增及可视化检测技术,建立了一系列针对各种病毒、细菌和寄生虫的高灵敏、高特异核酸检测方法<sup>[10-12]</sup>。通过结合侧向流免疫层析试纸,该技术可以更加方便、快捷地开展核酸检测<sup>[13-14]</sup>。

在前期研究中,本团队建立了一种基于 CRISPR 的“消线法”核酸测试纸技术<sup>[15]</sup>,该技术在报告 RNA 分子两端分别标记 FAM 基团和 Biotin 基团,试纸底部包被 FAM 抗体的胶体金颗粒与 FAM 基团结合。当存在靶目标时,激活 Cas13a 蛋白切割报告 RNA 分子, Biotin 基团会与 T 线上包被的链霉亲和素结合,而胶体金颗粒与 FAM 基团和 C 线上包被的抗 FAM 抗体结合,从而只在 C 线处出现条带;当不存在靶目标时,报告 RNA 分子不被切割, FAM 抗体的胶体金颗粒既能通过 Biotin 基团与链霉亲和素结

合,也能被抗 FAM 抗体结合,因此在 T 线和 C 线处都出现条带(图 1)。该技术实现了对 SARS-CoV-2 快速、高灵敏和高度特异性的检测<sup>[15]</sup>。重组酶介导的链替换核酸扩增技术是一种恒温核酸快速扩增技术,利用重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶在室温条件下对目标 DNA 进行扩增。该技术不需要精密的温控设备,操作方便、快捷。本研究利用重组酶介导链替换核酸扩增 (recombinase aided amplification, RAA)技术将提取的核酸在 39 °C 恒温条件下孵育 30 min。而后凭借引物上带有的 T7 序列将扩增产物由 DNA 序列转录为可被 Cas13a 蛋白识别的 RNA 序列。当 crRNA 和 Cas13a 蛋白形成的复合体特异性识别到体系中的 RNA 靶标时, Cas13a 蛋白的非特异性切割活性则会被激活,降解体系中的报告 RNA 分子。结合荧光定量 PCR 仪和消线法核酸检测试纸技术 (easy-readout and sensitive enhanced, ERASE)核酸检测试纸均可读取检测结果(图 2)。本研究通过 CRISPR-ERASE 技术平台和 RAA 技术,旨在建立一种针对 *mecA* 耐药基因的简单、快速、灵敏、特异的核酸检测方法,为耐药检测的前移下移以及耐药菌的早期发现检测提供一种新方法。

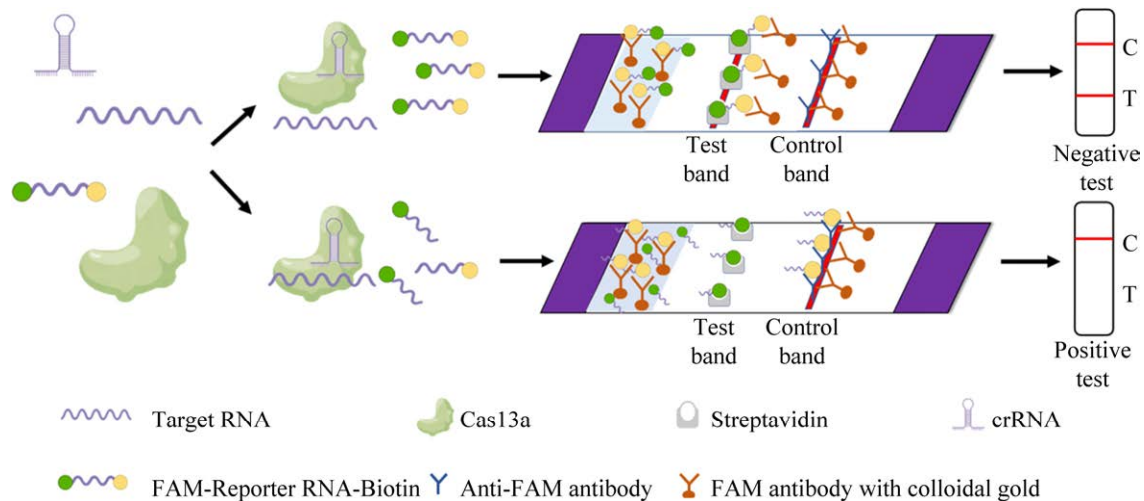


图 1 ERASE 核酸测试纸原理示意图

Figure 1 Schematic diagram of ERASE nucleic acid test strips.

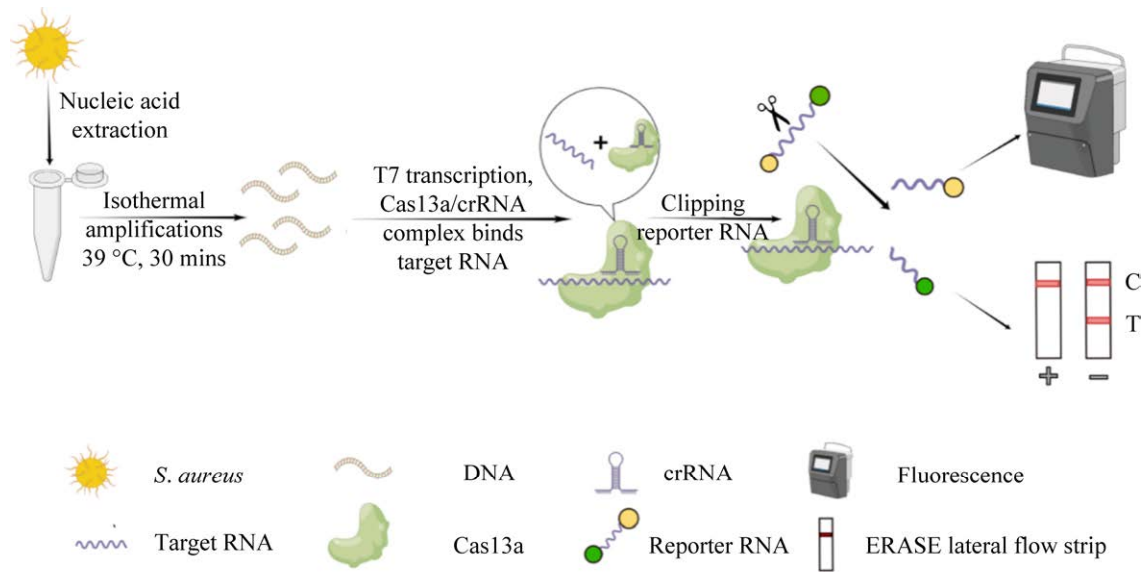


图 2 *mecA* 基因 CRISPR 检测方法流程图  
Figure 2 Flow chart of CRISPR assay for *mecA* gene.

## 1 材料与方 法

### 1.1 核酸序 列

*mecA* 基因序列下载自 NCBI 网站, 含有 *mecA* 耐药基因的 pUC57 质粒、报告 RNA、引物及 crRNA 由北京天一辉远生物科技有限公司合成。基因序列见表 1。

表 1 核酸序 列

Table 1 Nucleic acid sequence

Name	Sequence (5'→3')
<i>mecA</i> -RAA-F1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAATTGGGTGGTTTATATCATATGATAAAGATA
<i>mecA</i> -RAA-F2	AATTCTAATACGACTCACTATAGGACAAATTGGGTGGTTTATATCATATGATAAAG
<i>mecA</i> -RAA-F3	AATTCTAATACGACTCACTATAGGCGAGACAAATTGGGTGGTTTATATCATATGATA
<i>mecA</i> -RAA-F4	AATTCTAATACGACTCACTATAGGTGGCAGACAAATTGGGTGGTTTATATCATATG
<i>mecA</i> -RAA-R1	ATACACTTTACCTGAGATTTTGGCATTGTAGC
<i>mecA</i> -RAA-R2	ATCATACTTTACCTGAGATTTTGGCATTGT
<i>mecA</i> -RAA-R3	CTCATCATACTTTACCTGAGATTTTGGCAT
<i>mecA</i> -RAA-R4	ATAGCTCATCATACTTTACCTGAGATTTTG
<i>mecA</i> -crRNA1	GGGATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACAACATTAATAGCCATCATCATGTTTGGGA
<i>mecA</i> -crRNA2	GGGATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACCTTGACATCTTTAACATTAATAGCCAT
<i>mecA</i> -crRNA3	GGGATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACAGCCATTCCTTTATCTTGTACATCTTTA
<i>mecA</i> -qPCR-F	ATTATGGCTCAGGTACTGCT
<i>mecA</i> -qPCR-R	TTTGCCAACCTTTACCATCG
FAM-20U-BHQ1	FAM-UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU-BHQ1
FAM-20U-Biotin	FAM-UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU-Biotin
<i>mecA</i>	GenBank: NG_047936.1

### 1.2 细菌样 本

MRSA、甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*, SE)和志贺氏菌(*Shigella*, Sh)均由中国人民解放军疾病预防控制中心提供。临床样本分离菌株信息见表 2。

表 2 菌株信息

Table 2 Strain information

No.	Sampling source	Sampling area	Strain type	Sampling time (year)
1	Pus	Shenyang	MRSA	2011
2	Phlegm	Shenyang	MRSA	2012
3	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
4	Phlegm	Shenyang	MRSA	2012
5	Phlegm	Shenyang	MRSA	2012
6	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
7	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
8	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
9	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
10	Phlegm	Shenyang	MRSA	2012
11	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
12	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
13	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
14	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
15	Phlegm	Shenyang	MRSA	2012
16	Phlegm	Shenyang	MRSA	2012
17	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
18	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
19	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
20	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
21	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
22	Phlegm	Shenyang	MRSA	2011
23	Blood	Shenyang	MRSA	2012
24	Urine	Shenyang	MRSA	2012
25	Peanuts	Beijing	MSSA	2007
26	Pork	Beijing	MSSA	2007
27	Beef	Beijing	MSSA	2007
28	Onion	Beijing	MSSA	2007
29	Onion	Beijing	MSSA	2007
30	Salad	Beijing	MSSA	2007
31	Duck	Beijing	MSSA	2007
32	Beef	Beijing	MSSA	2007
33	Fecal	Beijing	<i>E. coli</i>	2014
34	Fecal	Beijing	SE	2015
35	Manure	Beijing	Sh	2009

### 1.3 试剂

RAA 基础法等温扩增试剂盒(杭州众测生物科技有限公司), ERASE 核酸检测试纸(自研), T7 RNA 聚合酶(NEB), HEPES (ThermoFisher),

MgCl<sub>2</sub> (ThermoFisher), RNase inhibitor (NEB), LwaCas13a (GenScript), NTP Mix (NEB), 荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa), 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN)。

## 1.4 仪器

荧光定量 PCR 仪(ROCHE), 分光光度计(IMPLEN), PCR 仪(ThermoFisher), 高速离心机(SIGMA), 金属浴(COYOTE)。

## 1.5 引物和 crRNA 设计与制备

从 NCBI 官网耐药微生物数据库中下载 *mecA* 序列信息, 利用 MEGA 7.0 软件对序列进行比对分析, 筛选出保守序列。然后根据保守序列设计选择等温扩增的引物, 并参照文献[16]在上游引物 5'端加入 T7 转录启动子序列。同时, 在上、下游引物之间, 设计候选 crRNA。DNA 序列由北京天一辉远生物科技有限公司直接合成, crRNA 参照文献[17]的方法进行制备。

## 1.6 RAA 等温扩增

在 RAA 基础法等温扩增试剂盒附带的操作说明的基础上, 减少无酶水的用量以增加反应中体系中的模板占比, 在不改变反应总体积的同时增加反应体系中的模板量, 使整个反应获得更好的等温扩增效果。扩增体系包括: 25  $\mu\text{L}$  缓冲液 A、2.5  $\mu\text{L}$  缓冲液 B、2  $\mu\text{L}$  等温扩增上游引物(终浓度为 0.8  $\mu\text{mol/L}$ )、2  $\mu\text{L}$  等温扩增下游引物(终浓度为 0.8  $\mu\text{mol/L}$ )、8.5  $\mu\text{L}$  无酶水、10  $\mu\text{L}$  目标 DNA, 共 50  $\mu\text{L}$  体系。将反应体系置于金属浴上恒温 39  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 完成对目标 DNA 的扩增。

## 1.7 CRISPR 荧光检测

将 2.1 中等温扩增的 DNA 产物与 CRISPR/Cas13a 荧光检测体系混合。CRISPR 荧光检测体系为: 2  $\mu\text{L}$  NTP Mix (终浓度为 2.5 mmol/L)、1  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor (终浓度为 4 IU/ $\mu\text{L}$ )、0.5  $\mu\text{L}$  T7 RNA 聚合酶(终浓度为 1 IU/ $\mu\text{L}$ )、0.5  $\mu\text{L}$  HEPES (终浓度为 20 mmol/L)、0.25  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (终浓度为 10 mmol/L)、10.75  $\mu\text{L}$  无酶水、2.5  $\mu\text{L}$  FAM-20U-BHQ1 (终浓度为 200 nmol/L)、1.5  $\mu\text{L}$  crRNA (终浓度为 280 nmol/L)、1  $\mu\text{L}$  Cas13a (终浓度为 45 nmol/L)、5  $\mu\text{L}$  目标 DNA。在荧光定

量 PCR 仪上恒温 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 40 min, 每 2 min 采集一次荧光信号, 实时监测荧光强度变化。

## 1.8 CRISPR-ERASE 试纸制备及检测

免疫层析试纸制备所需的核心组分为: 胶体金浓度为 0.4 mg/mL, 兔源抗 FITC 抗体浓度为 16  $\mu\text{g/mL}$ , 链霉亲和素包被浓度为 0.8 mg/mL<sup>[15]</sup>。取 2.1 中等温扩增的 DNA 产物与 CRISPR/Cas13a 试纸检测体系混合, CRISPR 试纸检测体系为: 4  $\mu\text{L}$  NTP Mix (终浓度为 2.5 mmol/L)、2  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor (终浓度为 4 IU/ $\mu\text{L}$ )、1  $\mu\text{L}$  T7 RNA 聚合酶(终浓度为 1 IU/ $\mu\text{L}$ )、1  $\mu\text{L}$  HEPES (终浓度为 20 mmol/L)、0.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (终浓度为 10 mmol/L)、26.5  $\mu\text{L}$  无酶水、5  $\mu\text{L}$  FAM-20U-Biotin (终浓度为 2 nmol/L)、3  $\mu\text{L}$  crRNA (终浓度为 280 nmol/L)、2  $\mu\text{L}$  Cas13a (终浓度为 45 nmol/L)、5  $\mu\text{L}$  DNA 产物。在金属浴上 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温孵育 30 min。在孵育结束后, 用移液枪将整个反应体系转移到侧向流免疫层析试纸上, 等待 3–5 min 即可肉眼读取检测结果。

## 1.9 荧光定量 PCR 检测

使用购自 TaKaRa 的荧光定量 PCR 试剂盒检测 10 倍梯度稀释后的 *mecA* 模板质粒。染料法荧光定量 PCR 体系为: 12.5  $\mu\text{L}$  TB Green Premix ExII (2 $\times$ )、1  $\mu\text{L}$  PCR 上游引物(终浓度为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ )、1  $\mu\text{L}$  PCR 下游引物(终浓度为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ )、8.5  $\mu\text{L}$  无酶水、2  $\mu\text{L}$  目标 DNA, 共 20  $\mu\text{L}$  的体系。将其置于荧光定量 PCR 仪上, 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s 进行预变性, 然后 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 循环反应 40 次, 每个循环结束时采集一次应荧光信号。

## 1.10 数据分析与结果判读

所有实验均设置 3 个重复组, 并采用独立样本 *t* 检验进行统计分析。当模板浓度处于 CRISPR/Cas13a 的检出限附近时, 参照文献[18]的方法取 3 个阴性对照重复组的平均荧光值+3

倍标准差计算出检测阈值, 荧光值高于阈值判定为阳性; 荧光值低于阈值判定为阴性。CRISPR-ERASE 试纸检测结果判定规则为, 试纸上只出现“C”线未出现“T”线, 判定为阳性; 同时出现“T”线和“C”线, 判定为阴性。所有实验结果使用 GraphPad Prism 8 进行统计分析和绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物和 crRNA 的筛选

首先, 利用国家抗生素耐药性生物数据库 (National Database of Antibiotic Resistant Organisms, NDARO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/>) 中的 *mecA* 信息进行序列比对, 并在保守序列上设计 3 条 crRNA 和 4 对 RAA 等温扩增引物 (图 3A)。随后, 利用同一批 *mecA* 基因扩增产物分别测试了含有

3 条不同 crRNA 的 CRISPR/Cas13a 系统的检测效率。结果如图 3B 所示, 含有 3 条候选 crRNA 的 CRISPR/Cas13a 系统荧光检测曲线在反应开始后上升, 并在第 14 分钟到达平台期。在检测进行到第 40 分钟时 (图 3C), 相比以无酶水作为模板的阴性对照组, *mecA*-crRNA1 组的荧光值上升了 (7.74±0.71) 倍 ( $P<0.001$ ), *mecA*-crRNA2 组的平均荧光值上升了 (13.60±0.57) 倍 ( $P<0.0001$ ), *mecA*-crRNA3 组的平均荧光值上升了 (18.99±0.35) 倍 ( $P<0.0001$ )。由于含有 *mecA*-crRNA3 的 CRISPR 系统检测到的荧光值较其他 2 组 crRNA 更高。因此, 选择 *mecA*-crRNA3 用于后续 *mecA* 基因的检测。

为了筛选出高效的等温扩增引物, 本研究将靶向 *mecA* 基因保守序列的 4 条上游 RAA 等温扩增引物和 4 条下游 RAA 等温扩增引物两两

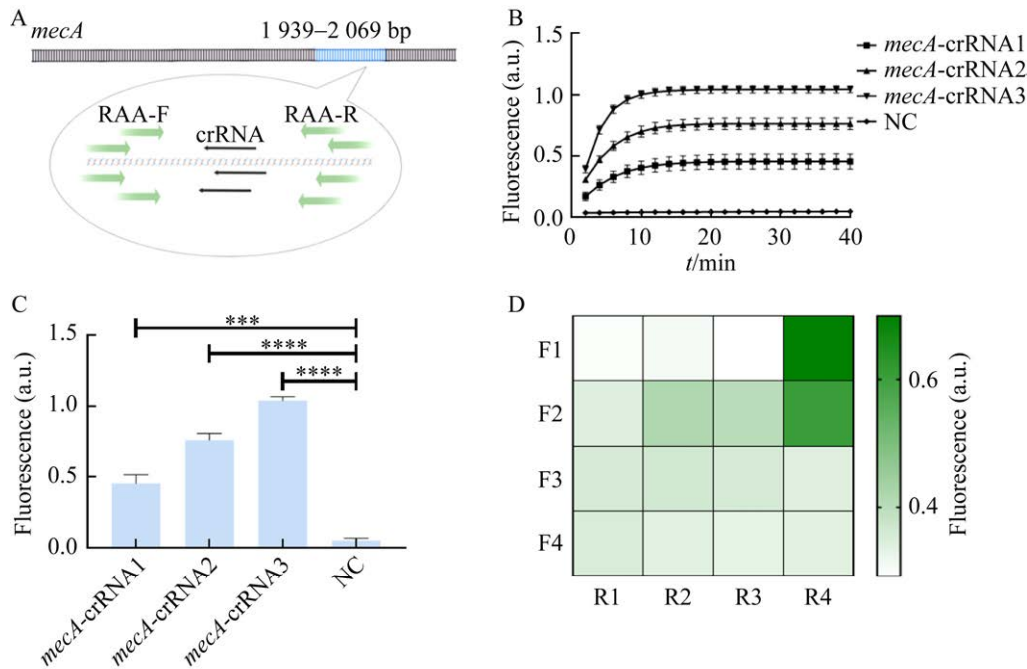


图 3 引物及 crRNA 设计与筛选

Figure 3 Primer and crRNA design and screening. A: Design schematic of primers and crRNAs. B: The fluorescence detection results of RAA-CRISPR/Cas13a with different crRNAs targeting *mecA*. C: The fluorescence intensity at 40 min after reaction started. \*\*\*,  $P<0.001$ , \*\*\*\*,  $P<0.0001$ . D: The fluorescence detection results of RAA-CRISPR/Cas13a with different primer combinations targeting *mecA*. F: Forward primer; R: Reverse primer.

组合后分别对 *mecA* 质粒模板( $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ) 进行扩增, 随后使用含有 *mecA*-crRNA3 的 CRISPR/Cas13a 系统对上述扩增产物进行荧光检测。检测结果如图 3D 所示, 在反应开始后的第 40 分钟, 引物组合 F1R4 组的荧光值为 0.70 a.u., 在所有的 16 种引物组合中最高。因此, 选择 F1R4 引物组合用于后续的 *mecA* 基因 CRISPR 检测。

## 2.2 CRISPR 检测灵敏度评价

利用本课题组前期建立的 CRISPR-ERASE 核酸测试纸技术<sup>[15]</sup>, 结合上述筛选出的 RAA 等温扩增引物和 crRNA, 建立了针对 *mecA* 基因的 CRISPR-ERASE 核酸检测方法。为了评价该方法的灵敏度, 利用 10 倍梯度稀释的 *mecA* 基因( $10^4$ – $10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ )作为实验组模板, 无酶水作为阴性对照组模板进行 CRISPR 检测。实验结果如图 4A 所示。当模板浓度为 10 copies/ $\mu\text{L}$  时, 3 次重复实验的 ERASE 试纸上均出现 C 线且未出现 T 线, 根据 ERASE 试纸判定标准, 检测结果均为阳性。当模板浓度为 1 copy/ $\mu\text{L}$  时, 2 条试纸上出现 C 线而未出现 T 线; 1 条试纸上同时出现 C 线和 T 线, 根据 ERASE 试纸判定标准, 2 次检测结果为阳性, 1 次检测结果为阴性。此外, 分别对临界浓度(10 copies/ $\mu\text{L}$ )的 *mecA* 基因以及无酶水进行了 10 次重复检测, 结果如图 4B 所示, 在 10 次重复中, 10 copies/ $\mu\text{L}$  的 *mecA* 基因的试纸条上均只出现 C 线而未出现 T 线, 均判定为阳性。以无酶水为模板的阴性对照组试纸条上均同时出现了 C 线和 T 线, 均判定为阴性。以上结果表明 CRISPR-ERASE 试纸法对于 10 copies/ $\mu\text{L}$  的 *mecA* 基因可以稳定检出。

本研究对比了 CRISPR-ERASE 核酸测试纸检测方法与 CRISPR 荧光检测方法(SHERLOCK)<sup>[9]</sup>的灵敏度, CRISPR 荧光检测的结果如图 4C、4D 所示, 在反应开始后第 40 分钟,  $10^4$ – $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  组中的荧光值均明显升高, 相比阴性对照组,  $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  组荧光值升高了( $6.19\pm 0.31$ )倍

( $P<0.0001$ ),  $10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  组荧光值升高了( $6.01\pm 0.31$ )倍( $P<0.0001$ ),  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  组荧光值升高了( $6.16\pm 0.31$ )倍( $P<0.0001$ ), 10 copies/ $\mu\text{L}$  组荧光值升高了( $5.38\pm 0.48$ )倍( $P<0.001$ )。通过设置的阈值(阴性对照组的平均荧光值加 3 倍标准差得出检测阈值为 0.41 a.u.)判断, 1 copy/ $\mu\text{L}$  组中 3 次重复的荧光值分别为 0.25、0.63 和 0.54 a.u., 其中 2 次检测结果的荧光值高于阈值, 1 次检测结果的荧光值低于阈值, 结果表明当 *mecA* 基因含量为 1 copy/ $\mu\text{L}$  时, 该方法则不能实现稳定检出。

此外, 对比了 CRISPR-ERASE 核酸试纸检测方法方法与荧光定量 PCR 法的灵敏度, 荧光定量 PCR 法检测结果如图 4E 所示, 当 *mecA* 基因的浓度大于 10 copies/ $\mu\text{L}$  时, 各实验组的 CT 值均小于 32.73, 当 *mecA* 基因的浓度为 10 copies/ $\mu\text{L}$  时, 3 次重复中有 2 次检出(CT 值分别为 35.80 和 35.70), 1 次未检出(无 CT 值)。当样本中 *mecA* 基因的浓度为 1 copy/ $\mu\text{L}$  时, 3 次重复均未检出。荧光定量 PCR 法对 *mecA* 基因的稳定检出限为  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 。结果表明, CRISPR-ERASE 核酸试纸检测方法在检测灵敏度上略优于荧光定量 PCR。

## 2.3 特异性验证

为了评价该方法的特异性, 分别利用 MRSA、MSSA、*E. coli*、SE、Sh 共 5 种病原菌基因组 DNA 作为样本, 含有 *mecA* 耐药基因的 pUC57 质粒作为阳性对照组的模板, 不含有 *mecA* 耐药基因的 pUC57 质粒作为阴性对照组的模板进行检测。结果如图 5 所示, 荧光检测结果中仅有阳性对照组和 MRSA 实验组的荧光强度显著增加。在 5 种病原菌的基因组 DNA 中, 只有 MRSA 实验组的 ERASE 试纸上 T 线消失仅呈现出一条 C 线, 检测结果为阳性, 与阳性对照组的的结果一致; 其余 4 种病原菌的 ERASE 试纸上同时出现了 C 线和 T 线, 检测结果均为阴性。结果表明 CRISPR-ERASE 可特异性检出 MRSA, 与其他 4 种病原体基因组 DNA 无交叉反应。



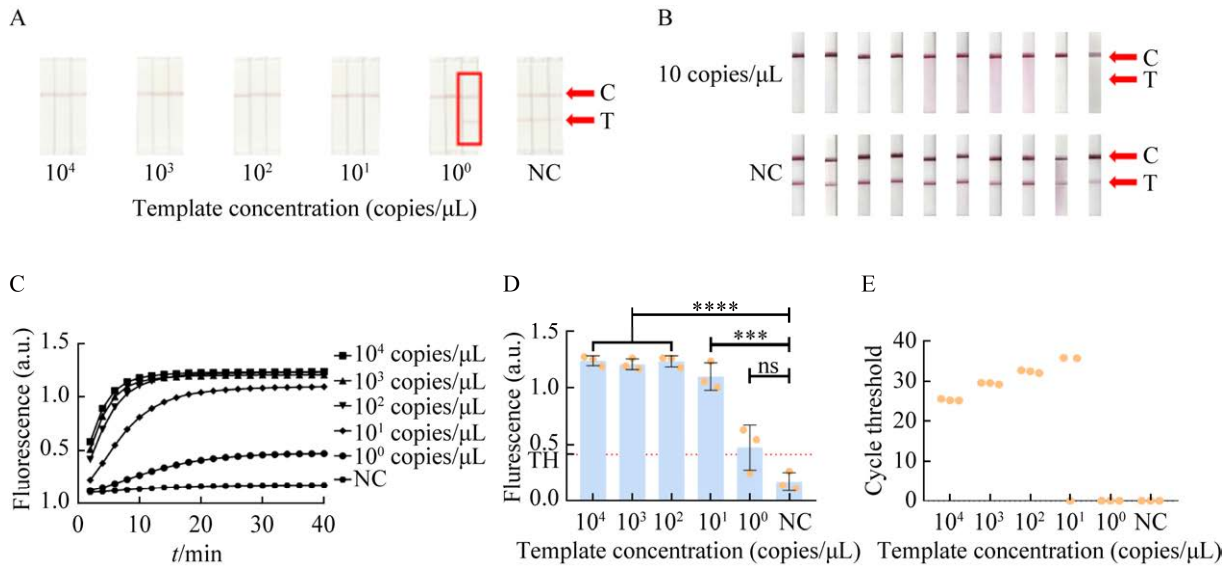


图 4 RAA-CRISPR/Cas13a 检测方法的灵敏度评价

Figure 4 Sensitivity evaluation of RAA-CRISPR/Cas13a assay. A: Detection results of different dilution *mecA* using CRISPR-ERASE assay. B: Results of CRISPR-ERASE assay for 10 copies/ $\mu\text{L}$  *mecA*. C: Control line, T: Test line, box is not detected. C: Detection results of different dilution *mecA* using fluorescence-based CRISPR assay. D: The fluorescence intensity at 40 min after reaction started. TH: Threshold line; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: Not significant. E: Real time PCR detection results of different dilution *mecA*. NC: Negative control.

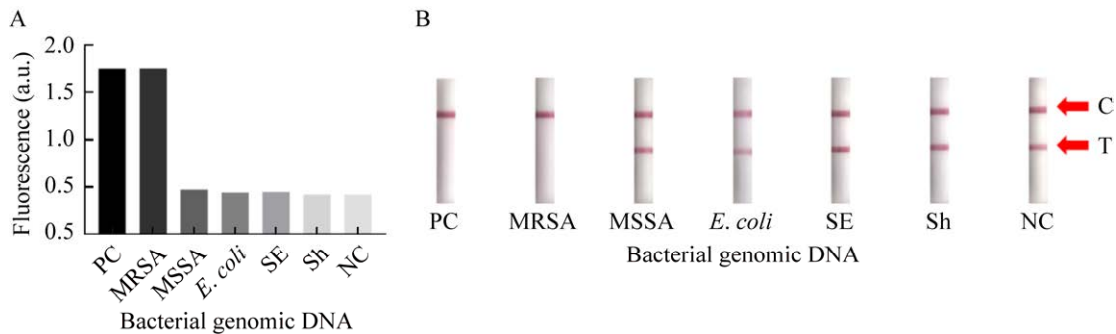


图 5 RAA-CRISPR/Cas13a 检测方法的特异性评价

Figure 5 Evaluation of the specificity of RAA-CRISPR/Cas13a assay. A: The specificity assay of fluorescence-based CRISPR detection for *mecA*. B: The specificity assay of REASE CRISPR detection for *mecA*. C: Control line; T: Test line; PC: Positive control; NC: Negative control.

## 2.4 细菌样本验证

为了进一步评估 CRISPR/Cas13a 检测临床样本中 MRSA 的能力, 利用 32 株从临床样本中分离出的金黄色葡萄球菌, 同时进行了药敏试验鉴定、荧光定量 PCR 检测和 RAA-CRISPR/Cas13a 检测。实验结果如图 6 所示, 1–24 号菌

株药敏试验鉴定结果为 MRSA, 25–32 号菌株药敏试验鉴定结果为 MSSA。对于药敏试验鉴定为耐药(resistance, R)的 1–24 号菌株样本, 荧光定量 PCR 的检测结果显示, 24 株 MRSA 的 CT 值均在 13.44–35.01 之间, 荧光定量 PCR 的检测结果为阳性。对于药敏试验鉴定为敏感(susceptible,

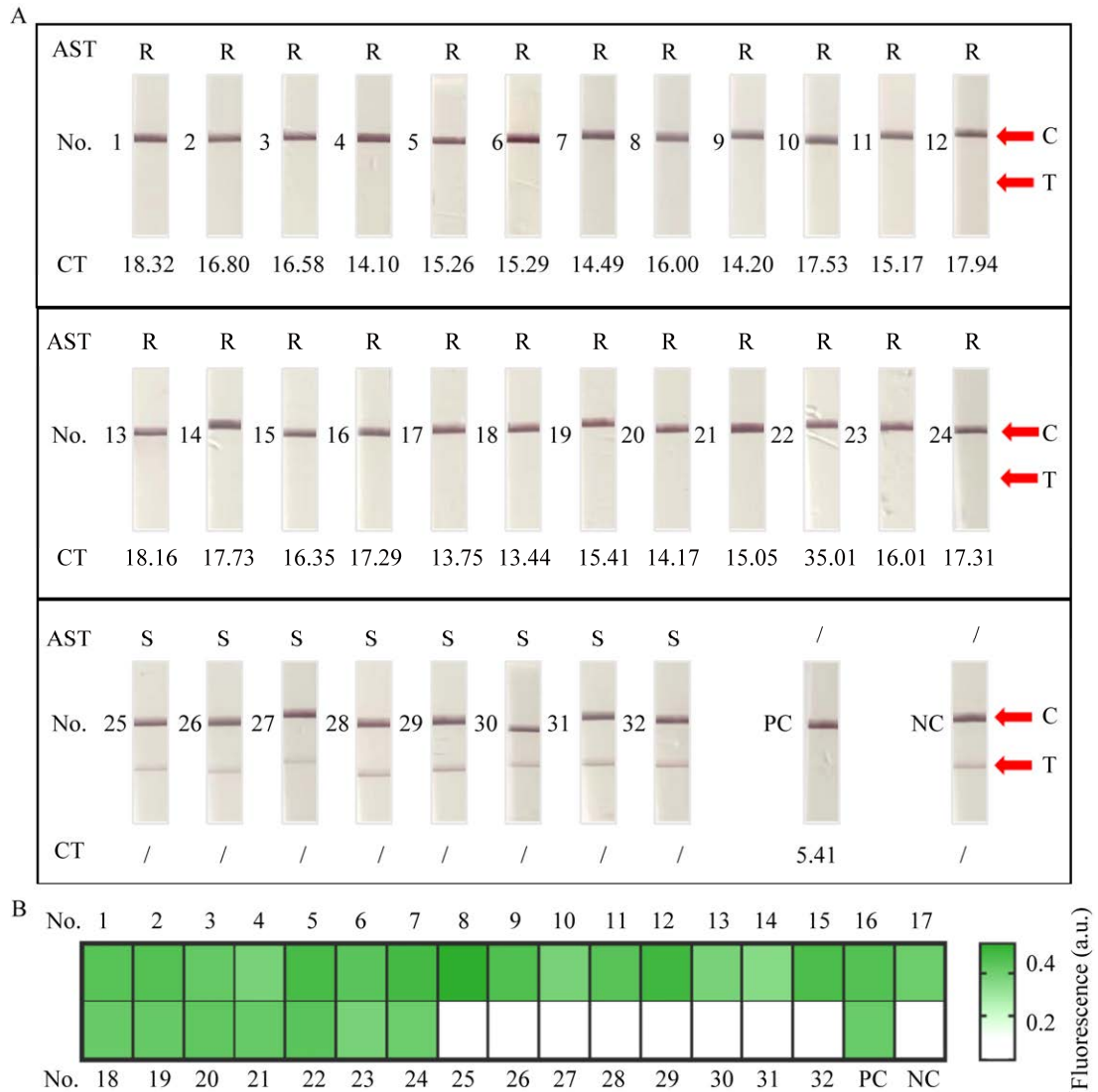


图 6 细菌样本评价

Figure 6 Evaluation of bacterial sample detection. A: Detection results of the bacteria sample with CRISPR-ERASE, qPCR and antimicrobial susceptibility test. B: Detection results of the bacterial sample using fluorescence-based CRISPR assay. AST: Antimicrobial susceptibility test; No.: Number; CT: Cycle threshold; PC: Positive control; NC: Negative control; R: Resistance; S: Susceptible; C: Control line; T: Test line; /: Undetected.

S)的 25–32 号菌株样本, 8 株 MSSA 均未检测到 CT 值, 荧光定量 PCR 的检测结果为阴性。编号 1–24 的菌株, CRISPR-ERASE 检测试纸条上只出现一条 C 线, 未出现 T 线, 试纸检测结果均为阳性。25–32 号临床分离株的 CRISPR-ERASE 检测试纸条上同时出现 C 线

和 T 线试纸, 检测结果均为阴性。CRISPR-ERASE 试纸检测与 CRISPR 荧光检测(图 6B)结果一致。以上结果表明, 对于上述 32 株细菌样本, 本研究建立的 CRISPR-ERASE 检测方法 with 药敏试验、荧光定量 PCR 的检测结果阳性符合率及阴性符合率均为 100% (表 3)。

表 3 CRISPR-ERASE 和 CRISPR 荧光、qPCR 以及药敏试验检测细菌样本的结果对比

Table 3 Comparison of the results of CRISPR-ERASE and fluorescence-based CRISPR assay, qPCR and antimicrobial susceptibility test for bacterial samples

Fluorescence-based CRISPR assay, qPCR, antimicrobial susceptibility test	CRISPR-ERASE		
	Positive	Negative	Total
Positive	24	0	24
Negative	0	8	8
Total	24	8	32

### 3 讨论与结论

MRSA 可以导致严重的血液感染、皮肤和软组织感染、假体关节感染、脓毒症和肺炎等<sup>[19-21]</sup>, 仅 2019 年这种耐药菌就导致超过 10 万人死亡<sup>[22]</sup>。目前, MRSA 的检测方法主要是药敏试验和荧光定量 PCR。临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)<sup>[23]</sup>对细菌药敏试验有明确的操作要求和判断标准, 然而这种基于常规培养的方法耗时过长, 并且容易受样本中其他细菌的影响, 导致结果出现假阴性。研究人员利用荧光定量 PCR 技术检测患者痰液样本中的 MRSA<sup>[24]</sup>, 研究结果显示, 荧光定量 PCR 法要比药敏试验快 12–48 h。但是荧光定量 PCR 技术需要依赖专业的荧光检测设备。为了解决以上 2 种方法存在的问题, 本研究基于 CRISPR/Cas13a 建立了一种针对 *mecA* 耐药基因的核酸检测方法。该方法可检测出 10 copies/ $\mu\text{L}$  的 *mecA* 基因, 比荧光定量 PCR 更加灵敏, 且具有良好的特异性。此外, 相较其他方法, CRISPR-ERASE 方法能够更加方便、快捷地对细菌耐药基因进行检测。

对于 CRISPR 核酸检测系统, 使用免疫层析试纸代替荧光检测仪器来判读 CRISPR 系统检测结果是实现方便、快捷检测的关键。然而, 现有的 CRISPR 核酸测试纸在检测阴性样本时,

存在由主观判读导致假阳性的风险, 而 ERASE 核酸测试纸采用类似“竞争法”的消线法判读方式, 即以 T 线完全消失作为阳性判断标准, 一定程度上降低了主观判读带来假阳性的风险, 提高了检测的特异性, 且灵敏度相比传统的 CRISPR 核酸测试纸提高了 10 倍<sup>[15]</sup>, 该试纸同样用在了我国首个获批上市的 CRISPR 诊断试剂中(国械注准 20203400919)。

综上所述, 本研究基于 CRISPR 技术, 同时结合了 ERASE 核酸测试纸, 可以降低对专业检测仪器设备的依赖, 更加方便、快捷地进行细菌耐药基因检测。在预防耐药细菌的传播、实时监测细菌耐药进展等方面有很大的发展前景。但是, 该方法还存在不足之处。与目前大部分的细菌核酸检测方法相同, 在检测之前需要提取细菌样本中的核酸, 而目前细菌核酸的快速提取通常需要依赖离心机或磁力架等设备, 增加了检测过程的复杂程度。因此, 未来该方法在下一步转化应用过程中应着重突破样本快速前处理技术, 进而实现直接对潜在污染样本的快速检测。目前, 研究人员正在不断探究快速提取细菌 DNA 的新方法, 后期随着快速提取试剂的改进与优化, 以及便携式加热设备的研发。这些关键技术的突破将为临床早期发现耐药基因, 及时制定及调整治疗方案提供一种新方法, 也将为防控细菌耐药提供新的策略。

## 参考文献

- [1] BA XL, HARRISON EM, EDWARDS GF, HOLDEN MTG, LARSEN AR, PETERSEN A, SKOV RL, PEACOCK SJ, PARKHILL J, PATERSON GK, HOLMES MA. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(3): 594-597.
- [2] PEACOCK SJ, PATERSON GK. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. Annual Review of Biochemistry, 2015, 84: 577-601.
- [3] VESTERGAARD M, FREES D, INGMER H. Antibiotic resistance and the MRSA problem[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018.
- [4] SABATH LD, FINLAND M. Inactivation of methicillin, oxacillin and ancillin by *Staphylococcus aureus*[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY), 1962, 111: 547-550.
- [5] BARTELS MD, WORNING P, ANDERSEN LP, BES M, ENGER H, ÅS CG, HANSEN TA, HOLZKNECHT BJ, LARSEN KW, LAURENT F, MÄKITALO B, PICHON B, SVARTSTRÖM O, WESTH H. Repeated introduction and spread of the MRSA clone t304/ST6 in northern Europe[J]. Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2021, 27(2): 284.e1-284.e5.
- [6] ZIMMERMAN CE, STAMPER PD, BRYANT L, FARLEY J, GOLOVA J, HOLMBERG R, HOWARD T, LINGER Y, MEYERS K, PEROV A, RUDY GB, CARROLL KC, CHANDLER DP. Development of a simple, low-density array to detect methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *mecA* dropouts in nasal swabs[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 91(3): 366-376.
- [7] 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.
- [8] HARRINGTON LB, BURSTEIN D, CHEN JS, PAEZ-ESPINO D, MA EB, WITTE IP, COFSKY JC, KYRPIDES NC, BANFIELD JF, DOUDNA JA. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. Science, 2018, 362(6416): 839-842.
- [9] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, LEE JW, ESSLETZBICHLER P, DY AJ, JOUNG J, VERDINE V, DONGHIA N, DARINGER NM, FREIJE CA, MYHRVOLD C, BHATTACHARYYA RP, LIVNY J, REGEV A, KOONIN EV, HUNG DT, SABETI PC, COLLINS JJ, ZHANG F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442.
- [10] CUNNINGHAM CH, HENNELLY CM, LIN JT, UBALEE R, BOYCE RM, MULOOGO EM, HATHAWAY N, THWAI KL, PHANZU F, KALONJI A, MWANDAGALIRWA K, TSHEFU A, JULIANO JJ, PARR JB. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of *Plasmodium* detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping[J]. EBioMedicine, 2021, 68: 103415.
- [11] LUO H, CHEN WT, MAI ZD, YANG JJ, LIN XM, ZENG LH, PAN YY, XIE QH, XU QQ, LI XX, LIAO YW, FENG ZQ, OU JL, QIN XL, ZHENG HP. Development and application of Cas13a-based diagnostic assay for *Neisseria gonorrhoeae* detection and azithromycin resistance identification[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2022, 77(3): 656-664.
- [12] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, SEGEL M, BRUNEAU R, HUANG ML W, KIM NG, YU X, LI J, WALKER BD, GRENINGER AL, JEROME KR, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, ZHANG F. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics[J]. MedRxiv: the Preprint Server for Health Sciences, 2020. DOI: 10.1101/2020.05.04.20091231.
- [13] 王珊. 基于 CRISPR 技术的乙肝病毒 DNA 及 YMDD 耐药突变高灵敏检测技术研究[D]. 北京: 军事科学院博士学位论文, 2019.  
WANG S. Highly sensitive detection for HBV DNA and YMDD drug resistance mutation based on CRISPR[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Academy of Military Sciences, 2019 (in Chinese).
- [14] 王彦贺, 董雪, 杨明娟, 李浩, 孙岩松. 基于 CRISPR 的埃博拉病毒核酸检测方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(2): 125-130.  
WANG YH, DONG X, YANG MJ, LI H, SUN YS. Development of a method for CRISPR-based nucleic acid detection of the Ebola virus[J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(2): 125-130 (in Chinese).

- [15] LI H, DONG X, WANG YH, YANG L, CAI K, ZHANG XL, KOU ZH, HE L, SUN SH, LI TY, NIE Y, LI XF, SUN YS. Sensitive and easy-read CRISPR strip for COVID-19 rapid point-of-care testing[J]. *The CRISPR Journal*, 2021, 4(3): 392-399.
- [16] YANG MJ, KE YH, WANG XS, REN H, LIU W, LU HJ, ZHANG WY, LIU SW, CHANG GH, TIAN SG, WANG LH, HUANG LY, LIU C, YANG RF, CHEN ZL. Development and evaluation of a rapid and sensitive EBOV-RPA test for rapid diagnosis of Ebola virus disease[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26943.
- [17] LI H, WANG S, DONG X, LI Q, LI M, LI JF, GUO Y, JIN X, ZHOU YS, SONG HB, KOU ZH. CRISPR-Cas13a cleavage of dengue virus NS3 gene efficiently inhibits viral replication[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2020, 19: 1460-1469.
- [18] SHINODA H, IIDA T, MAKINO A, YOSHIMURA M, ISHIKAWA J, ANDO J, MURAI K, SUGIYAMA K, MURAMOTO Y, NAKANO M, KIGA K, CUI LZ, NUREKI O, TAKEUCHI H, NODA T, NISHIMASU H, WATANABE R. Automated amplification-free digital RNA detection platform for rapid and sensitive SARS-CoV-2 diagnosis[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 473.
- [19] TURNER NA, SHARMA-KUINKEL BK, MASKARINEC SA, EICHENBERGER EM, SHAH PP, CARUGATI M, HOLLAND TL, FOWLER VG Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(4): 203-218.
- [20] HEILBRONNER S, FOSTER TJ. *Staphylococcus lugdunensis*: a skin commensal with invasive pathogenic potential[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020, 34(2): e00205-e00220.
- [21] FRANK KL, del POZO JL, PATEL R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(1): 111-133.
- [22] ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *The Lancet*, 2022, 399(10325): 629-655.
- [23] HUMPHRIES R, BOBENCHIK AM, HINDLER JA, SCHUETZ AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(12): e0021321.
- [24] 金姝, 邹玉涵, 闫佩毅, 朱卿, 张骥. qPCR 快速检测痰标本中 MRSA 的临床应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(24): 3441-3443.
- JIN S, ZOU YH, YAN PY, ZHU Q, ZHANG J. Clinical application of qPCR in rapid detection of MRSA in sputum samples[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2017, 38(24): 3441-3443 (in Chinese).