

基于 one-pot RPA-CRISPR/Cas12a 技术快速检测高毒力肺炎克雷伯氏菌方法的建立

段红雯¹, 李彩燕¹, 朱鹏^{*3}, 张顺^{*2,3}

1 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315000

2 宁波市第二医院, 浙江 宁波 315000

3 国科宁波生命与健康产业研究院, 浙江 宁波 315000

段红雯, 李彩燕, 朱鹏, 张顺. 基于 one-pot RPA-CRISPR/Cas12a 技术快速检测高毒力肺炎克雷伯氏菌方法的建立[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1796-1809.

DUAN Hongwen, LI Caiyan, ZHU Peng, ZHANG Shun. A one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay for rapid detection of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1796-1809.

摘要:【背景】在肺部健康红灯预警的社会背景下, 高毒力肺炎克雷伯氏菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKP)的出现引起了广泛关注。作为经典肺炎克雷伯氏菌的变种, hvKP 具有易传播、毒性强、致死率高的特点, 易在健康人中引发社区获得性感染。【目的】开发出针对 hvKP 的灵敏、便捷的检测方法, 以预防其大面积的传播。【方法】将重组酶聚合酶扩增与 CRISPR 超灵敏检测系统相结合, 开发出一种针对 hvKP 的便捷且高灵敏的检测方法。【结果】该方法在无增菌的条件下能够在 40 min 内检测低至 58.1 fg/ μ L 的 hvKP 的 DNA 样本, 对包括经典肺炎克雷伯氏菌在内的 13 种非特异性菌种均无扩增, 显示了良好的特异性。此外, 在模拟血液样本的检测中, 该方法的灵敏度达到 5.5 CFU/mL, 高于传统的 qPCR 方法(灵敏度为 5.5×10^2 CFU/mL)两个数量级。【结论】本新型检测方法不仅具有高灵敏度和高特异性的优点, 而且因其构建方法简便, 检测过程便捷, 可为基层医疗机构大规模筛查 hvKP 提供有效工具, 同时也为公共卫生服务领域提供新的检测方案。这一新技术有望在控制和预防 hvKP 传播方面发挥重要作用。

关键词: 高毒力肺炎克雷伯氏菌; CRISPR; Cas12a; 重组酶聚合酶扩增

资助项目: 浙江省基础公益研究计划(LGF22H190003); 新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法) (2020012)
This work was supported by the Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province (LGF22H190003), and the 2019-nCoV Nucleic Acid Detection Kit (Fluorescent PCR) (2020012).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Shun, zhangshun@ucas.ac.cn; ZHU Peng, zhupeng@ucas.ac.cn

Received: 2024-07-02; Accepted: 2024-12-13; Published online: 2025-02-06

A one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay for rapid detection of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*

DUAN Hongwen¹, LI Caiyan¹, ZHU Peng^{*3}, ZHANG Shun^{*2,3}

1 College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315000, Zhejiang, China

2 Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315000, Zhejiang, China

3 Guoke Ningbo Life Science and Health Industry Research Institute, Ningbo 315000, Zhejiang, China

Abstract: [Background] As the issue of lung health is aggravating, the emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) has attracted widespread attention. As a variant of *K. pneumoniae*, hvKP is characterized by easy transmission, high virulence, and high fatality rate, which make it prone to causing community-acquired infection in healthy individuals. [Objective] To develop a sensitive and convenient detection method for hvKP, thus preventing its large-scale spread. [Methods] We developed a convenient and highly sensitive detection method for hvKP by combining recombinase polymerase isothermal amplification with the CRISPR ultra-sensitive detection system. [Results] This method was capable of detecting hvKP DNA samples as low as 58.1 fg/ μ L within 40 min without the need for enrichment. Moreover, it demonstrated excellent specificity, showing no amplification of 13 non-specific bacterial strains including classic *K. pneumoniae*. Furthermore, in the detection of simulated blood samples, this method showcased the sensitivity reaching 5.5 CFU/mL, which was two orders of magnitude higher than that (5.5×10^2 CFU/mL) of the conventional qPCR method. [Conclusion] This novel detection method has not only high sensitivity and specificity but also simple operation. This study aims to provide an effective tool for large-scale screening of hvKP in community-level medical institutions and offer a new detection scheme for public health services. This new technology is expected to play an important role in controlling and preventing the spread of hvKP.

Keywords: hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*; CRISPR; Cas12a; recombinase polymerase amplification

高毒力肺炎克雷伯氏菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKP)自 1986 年首次在中国台湾省被报道以来,除了引起肺炎外还可能造成肝脓肿、化脓性脑膜炎、前列腺脓肿、脓毒性眼炎等多种严重并发症^[1],从而已引起临床和公共卫生部门的广泛关注。相较于经典肺炎克雷伯氏菌(classic *Klebsiella pneumoniae*, cKP), hvKP 属于侵袭性感染,易感人群的特征有明显区别。cKP 主要感染的人群为免疫力低下人群,如糖尿病患者、恶性肿瘤或移植患者、长期卧床的

患者等。而 hvKP 不仅能够感染上述免疫力低下的人群(如糖尿病患者),还常见于健康人群,显示出其广泛的宿主范围^[2]。此外, hvKP 具有更强的耐药性和传播性,更容易在社区发生获得性感染,因而 hvKP 的感染也与致死率相关^[3-5]。目前对 hvKP 的确切定义尚未统一,其诊断主要依赖于基于表征的传统的微生物培养方法。如以平板培养法进行拉丝试验,将具有黏性的菌丝体长度作为检测指标,以菌丝体长度大于 5 mm 的界定为 hvKP^[6-9],尽管这种方法在基层

实验室中可行,但其耗时长且准确率低,而且并非所有的 hvKP 的菌丝体都具有高黏性^[8],这导致了假阳性结果的发生,甚至无法有效区分 hvKP 与 cKP。此外,小鼠致死试验以及血清杀伤试验也可作为 hvKP 检测方法,分别以致死量和菌落计数作为检测指标来界定其菌种类型^[9-11]。但其在检测耗时过长的同时,也不适用于大量样本的分析及快速检测。

随着现代分子生物学的飞速发展,基于基因水平的检测,因其灵敏度较高,特异性好且满足大批量样品检测需求的特点,逐渐成为病原菌检测技术开发的热点,其中主要包括 PCR、基因测序及等温扩增等。特别是实时荧光定量 PCR 已在某些病原菌的检测中成为金标准,并在疫情防控期间和疾病诊断中发挥了重要的作用,但其弊端是不仅需要大型的仪器与严格的操作环境,还需要专业的技术人员来进行操作,使得在基层部署时存在阻碍与困难^[12-13]。基因测序作为权威的鉴定手段,准确率高但花费非常昂贵,并且其产生的数据量巨大,需要具有高度科研能力的专业人员来操作,在临床应用方面大材小用。相比之下,等温扩增技术(isothermal amplification technology, IAT)因操作简便、快速,成为了基层实验室理想的选择。然而,其在灵敏度和特异度方面仍然存在限制,可能导致假阳性结果^[14-15]。为了放大该技术的优势而弥补缺点,有学者尝试将其与成簇规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR associated protein, CRISPR-Cas)检测系统相结合,提升其检测灵敏度,以实现病原菌的超灵敏检测^[16-20]。

CRISPR 是 1987 年在大肠杆菌基因组中被首次发现,而直到 2005 年才被证明 CRISPR-Cas 系统是古细菌与细菌在适应外界环境时进化出的免疫系统的一部分^[21-22]。在众多的 Cas 蛋白

酶中,Cas9 和 Cas12 特异性作用于 DNA 序列,Cas13 特异性作用于 RNA 序列。其中 Cas12a 在 crRNA 引导下切割原始间隔区相邻基序(protospacer adjacent motif, PAM) (TTTN)序列下游 18-25 nt 的靶标 DNA,发挥其识别功能和非特异性单链 DNA 切割活性。由于 crRNA 序列长度仅为 40 nt,设计简单,因此广泛用于核酸的特异性和灵敏度检测^[23-25]。迄今为止,已开发了 DNA 内切酶靶向 CRISPR 反式报告基因(DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter, DETECTR)荧光检测^[23]、基于 Cas12a 的视觉检测(Cas12a-based visual detection, Cas12VDet)^[24]、侧向流试纸条检测^[17,26]、金纳米检测法^[18,27]等技术平台,还有基于以上方法而开发出的新型平台^[28-31]用于细菌、病毒的检测。在已经报道的 hvKP 的检测方法当中,仅有的等温扩增方法与 CRISPR 系统相偶联的方法是以环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)为基础建立的,但由于 LAMP 本身需要在 60-70 °C 条件下进行 60 min 的反应,并且引物设计复杂,而 Cas 酶发挥内切酶活性的温度为 37 °C,因此单纯将 LAMP 和 CRISPR-Cas 系统联用需分步进行,增加了操作复杂性和气溶胶污染风险^[32]。与之相比,重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术的反应条件更为温和(37-42 °C),只需 10-25 min 即可完成扩增,更便于与 CRISPR-Cas 系统集成。通过 RPA-CRISPR-Cas 联用,一方面能弥补 RPA 灵敏度不足的缺点,降低了假阳性结果,提高了检测过程的准确性。

RPA 与 CRISPR-Cas 系统的结合技术展现出巨大的发展潜力,尤其是设备和操作要求低的特性使其非常适合应用于资源有限的基层和偏远地区。hvKP 毒力强、易传播,常见于社区传染以及有基础疾病或者有合并症的年老患

者,常引起多部位侵袭性感染,治疗难度大,致死率高,更重要的是基于传统的细菌表征的检测方法难以将其与 cKP 进行区分,极大地延缓了患者被治愈的进程。但现如今在鉴别富含 cKP 和 hvKP 临床样本的过程中,研究者发现 *peg-344* 基因在检测 hvKP 方面表现出了较高的准确性(0.97)、敏感性(0.99)和特异性(0.96),在预测因感染 hvKP 而引起的严重症状或死亡方面, *peg-344* 基因的表现优于其他基因组检测,

这表明 *peg-344* 基因在预测高毒力表型方面具有显著优势,为其作为 hvKP 鉴定标志物提供了有力支持^[13,33],因此可以用于 hvKP 与 cKP 的快速区分检测。本研究以此为基础,以期开发一种基于 RPA 和 CRISPR/Cas12a 系统的一体化快速检测方法 one-pot RPA-CRISPR/Cas12a (OPRCC),以实现更快速、灵敏和简便的 hvKP 检测,为满足公共卫生监测的需求提供新的解决方案(图 1)。

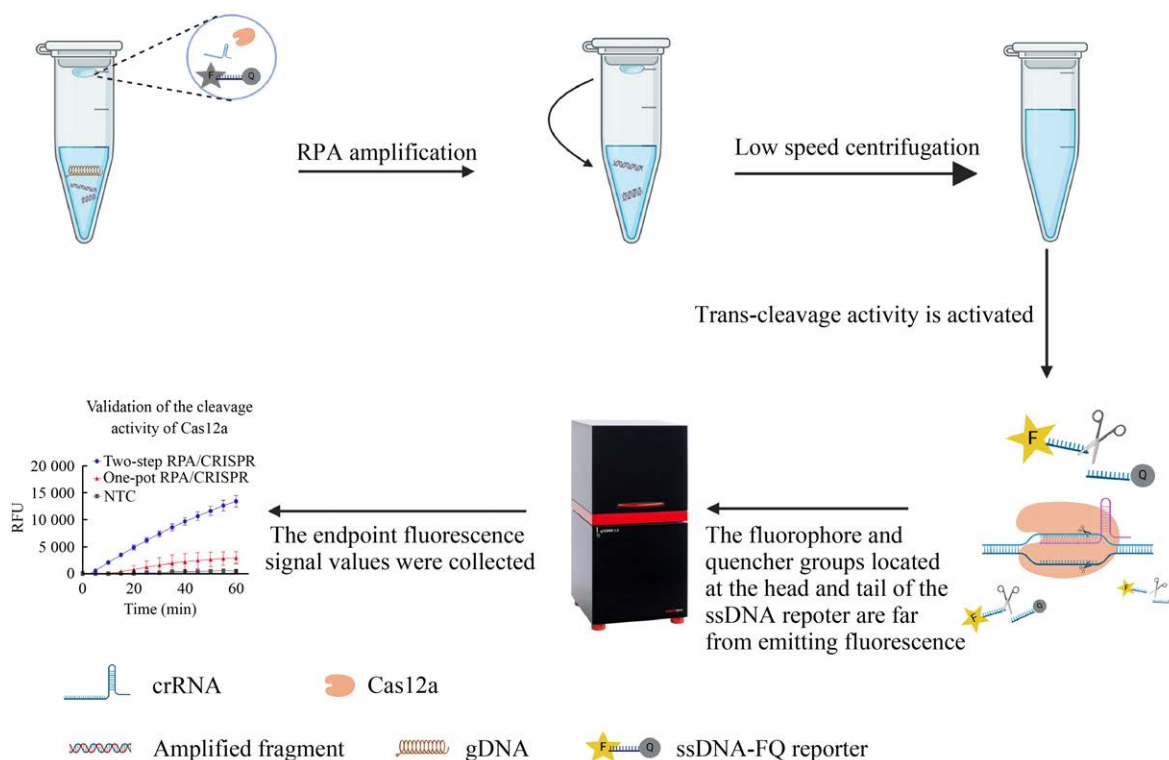


图 1 one-pot RPA-CRISPR/Cas12a 检测 hvKP 的技术流程示意图 将 Cas12a、crRNA、NEB buffer 2.1、ssDNA-FQ reporter 等 CRISPR 反应组分加样在管盖上, Rehydration buffer、靶标 DNA、引物、ddH₂O 等 RPA 反应组分加样在管底, 在 RPA 反应 20 min 后, 将管盖上的组分旋下后进行荧光检测反应, 如 Cas12a 酶活性被激活, 则荧光团 FAM (F) 与淬灭团 (Q) 远离发出荧光, 在 qPCR 仪上测量荧光值。部分图片来自 BioRender.com。

Figure 1 Schematic diagram of the technical flow of one-pot RPA-CRISPR/Cas12a for hvKP detection in this study. Cas12a, crRNA, NEB buffer 2.1, and ssDNA-FQ reporter (CRISPR reaction components) were added to the tube cover, while RPA buffer, target DNA, primer, and ddH₂O (RPA reaction components) were added to the bottom of the tube. After RPA reaction for 20 minutes, If the Cas12a enzyme activity was activated, the fluorophore FAM (F) and the quenching group (Q) were far away from the fluorescence, and the fluorescence value was measured on the qPCR instrument. Some images are created in BioRender.com.

1 材料与方法

1.1 样品

本研究共使用了 1 株高毒力肺炎克雷伯氏菌、1 株经典肺炎克雷伯氏菌、6 株弧菌和 6 株其他细菌(表 1)。本研究的参考菌株(Ref.)购自中国海洋微生物菌种保藏管理中心(Marine Culture Collection of China, MCCC)或中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。其他菌株(Clin.)从宁波市第二医院临床样本分离得到,并

通过自动化微生物鉴定系统进行鉴定确认^[34-35]。使用之前保存在 20%甘油中,温度为-80 ℃。新鲜健康血浆来自宁波市第二医院样本库(经宁波市第二医院人体研究伦理委员会审查批准,伦理批号:PJ-NBEY-KY-2025-012-01)。

1.2 主要试剂和仪器

TwistAmp® Basic Kit, TwistDx 公司; LbCas12a, New England Biolabs 公司; 实验所用引物、crRNA 以及 ssDNA-FQ 报告基因序列见表 2,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;细菌基因组提取试剂盒,北京博迈德基因技术有

表 1 本研究中用于特异性检测的试验菌株列表

Table 1 Test strains used in this study for testing the specificity

Number	Type of strain	Origin	OPRCC detection
ATCC43816 (Ref.)	高毒力肺炎克雷伯氏菌 Hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CGMCC	+
ATCC700603 (Ref.)	经典肺炎克雷伯氏菌 Classic <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CGMCC	-
ATCC33812 (Ref.)	河流弧菌 <i>Vibrio fluvialis</i>	MCCC	-
CGMCC1.1599 (Ref.)	哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	CGMCC	-
ATCC27562 (Ref.)	创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	MCCC	-
ATCC33653 (Ref.)	拟态弧菌 <i>Vibrio mimicus</i>	CGMCC	-
ATCC17749 (Ref.)	解藻酸弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	CGMCC	-
ATCC14100 (Ref.)	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	CGMCC	-
NBEY13625 (Clin.)	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	Clinical isolate	-
NBEY13629 (Clin.)	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical isolate	-
NBEY13635 (Clin.)	鲍氏不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	Clinical isolate	-
NBEY13685 (Clin.)	屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	Clinical isolate	-
NBEY13627 (Clin.)	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	Clinical isolate	-
NBEY13396 (Clin.)	阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	Clinical isolate	-

Ref: 参考菌株; Clin: 临床菌株; MCCC: 中国海洋微生物菌种保藏管理中心; CGMCC: 中国普通微生物菌种保藏管理中心。
+: 可检出; -: 未检出。

Ref: Reference strain; Clin: Clinical strains; MCCC: Marine Culture Collection of China; CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Center. +: Detectable; -: Not detected.

表 2 引物及 crRNA 序列

Table 2 Primers and crRNA sequences

Name	Sequence (5'→3')
RPA-F	ATGTAAACCCAGGACTTGCCGCTATTATATTTGC
RPA-R	GATGAGGATGAACGAAAGTGAAGCTAATGCGATAA
crRNA	UAAUUUCUACUAAAGUGUAGAUGAAUGAAAAACAAACUCAAUAC
PCR-F	CCTCCAGTCTTTGCTACC
PCR-R	GCAAGTTGAAATAGACGC
ssDNA-FQ reporter	6-FAM/TTATTTTATTTATT/BHQ1

限公司; qPCR 染料 TB Green® Premix ExTaq™ II (Tli RNaseH Plus), 宝日医生物技术(北京)有限公司。

ND-1000 分光光度计, Thermo Scientific 公司; 实时荧光定量梯度 PCR 仪, 耶拿公司。

1.3 细菌基因组 DNA 及临床血液样本的制备

所有菌株在 LB 肉汤培养基中 37 °C、180 r/min 培养 48 h 后, 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, DNA 在 80 μL 无核酸酶的水中洗脱。

为了比较 OPRCC 方法与 qPCR 在临床样本中的诊断性能, 对 hvKP 的临床样本进行模拟验证, 从宁波市第二医院样本库获取新鲜健康血浆, 经 hvKP 的 qPCR 特异性扩增后结果为阴性, 扩增正向引物: 5'-CCTCCAGTCTTTGCTACC-3'; 扩增反向引物: 5'-GCAAGTTGAAATAGACGC-3'。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45 个循环。将血浆与浓度为 5.5×10^0 – 5.5×10^8 CFU/mL 等 9 个浓度的菌液以体积比 1:1 混合, 95 °C 煮沸 10 min 后 12 000×g 离心 2 min, 取上清液作为模板。

1.4 引物及 crRNA 的设计及合成

选择 hvKP 的 *peg344* 基因作为靶基因, RPA 引物设计原则根据 TwistAmp® Basic Kit 操作手册, PCR 引物设计原则满足: (1) 避免重复碱基, 尤其是 G; (2) T_m =58–60 °C; (3) G+C=30%–80%;

(4) 3'端最后 5 个碱基内不能有多于 2 个的 G 或 C; (5) PCR 扩增产物长度为 80–150 bp; (6) 引物的退火温度 60 °C 以上, RPA 引物及 PCR 均使用 primer 软件设计。

crRNA 设计原则: 在靶标序列中寻找 PAM 位点即“TTTN”结构, 从而设计长度为 10–26 nt 的 crRNA, PAM 序列应位于被靶向的非互补 DNA 序列的 5'末端, 位置示意图见图 2, 具体序列见表 2。crRNA 序列经 BLAST 特异性比对的结果已提交到国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDCX0001767。

1.5 OPRCC 检测方法的建立

将 RPA 预扩增和 Cas12a/crRNA 裂解检测结合在同一反应中(图 1)。在八连管中将 RPA 预扩增的组分放入管底部, 其余组分放入管顶部, 最终 22 μL 反应体系。管盖上: 1 μmol/L LbCas12a 1 μL, 2 μmol/L crRNA 1 μL, 10 μmol/L ssDNA-FQ reporter 1 μL, NEB buffer 2.1 2 μL; 管底: Rehydration buffer 8.4 μL、RPA 正向引物 RPA-F 和反向引物 RPA-R (10 μmol/L) 各 0.3 μL、靶标 DNA 1 μL、ddH₂O 6 μL、magnesium acetate (280 mmol/L) 1 μL。在 qPCR 仪上 37 °C 孵育 20 min, 后将八连管在掌上离心机上 5 000×g 离心 15 s 保证管盖上的液体旋下, 然后继续孵育 60 min, 此时每 5 min 测量 1 次荧光。实验组使用含有不同浓度基因组 DNA 的溶液, 非靶标对照组使用不含基因组 DNA 的无菌水。

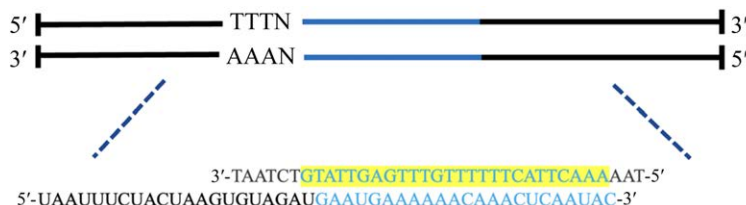


图 2 crRNA 设计示意图 以 *peg344* 基因为靶基因, 双链 DNA 靶位点用黄色高亮标记。

Figure 2 Schematic diagram of the crRNA design crRNA design diagram with *peg344* gene as the target gene, double-stranded DNA target sites are highlighted in yellow.

1.6 qPCR 反应体系的建立

每次反应中加入 10 μL 的 2×Mix 溶液、0.4 μL PCR 正向引物 PCR-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 和反向引物 PCR-R (10 $\mu\text{mol/L}$)、适量的基因组 DNA 和无菌水, 总计 20 μL 。采用实时荧光定量梯度 PCR 仪对新鲜健康人的血浆中不同浓度的细菌进行 qPCR 分析, 引物序列见表 2。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环。

1.7 统计学及回归分析

基因组 DNA 灵敏度回归分析由 GraphPad Prism10.1.1 软件进行线性回归分析及二项式回归分析; 全文所有实验均采用 3 个生物学重复, 使用 GraphPad Prism10.1.1 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 RPA-Cas12a/crRNA 对靶标序列的切割反应

在测试 RPA-Cas12a/crRNA 的复合体结构对靶标序列的切割活性时, 将所有试剂混匀后均放入同一管内进行反应, 结果表明反应产生的荧光信号值非常微弱(图 3A), 通过查阅了相关文献之后得知可能是 RPA 反应与 Cas12a/crRNA 复合体的切割反应同时进行时会互相干扰而导致酶活性降低, 使得其对 ssDNA-FQ reporter 的非特异性切割效果减弱, 荧光基团与猝灭基团不会远离而发出荧光^[24], 这大大影响检测的灵敏度, 所以在建立体系之前, 以 RPA 扩增反应产物为模板与 Cas12a/crRNA 复合物结合, 将一体化反应拆分为两步法反应先进行测试, 最终的 20 μL 检测体系由 LbCas12a、crRNA、ssDNA-FQ reporter、NEB buffer 2.1、RPA 扩增产物和无核酸酶水组成。结果表明, 当 RPA 反应不与 Cas12a/crRNA 反应同时进行, Cas12a/crRNA 复合体对靶标序列进行了有

效切割, 实时荧光信号值曲线呈上升趋势且信号强劲(图 3A)。

2.2 OPRCC 检测体系的建立

建立一体化(one-pot)检测模式之前, 对 3 种不同的加样方法进行讨论, CRISPR on the lid: 将 CRISPR 体系中的试剂(NEB buffer 2.1、Cas12a、ssDNA-FQ reporter、crRNA)放在管盖上, 荧光检测之前旋下; CRISPR on the wall: 将 CRISPR 体系中的试剂放在管壁上, 荧光检测之前旋下; all in: 将所有试剂均加入至管底直接进行荧光检测(图 3B)。结果表明, 只要 RPA 反应不与 CRISPR 反应同时进行, Cas12a 酶活性可以被正常激活发出荧光, 所以在建立 one-pot 体系选择将两组组分在同一管内不同位置分布, 当将 RPA 组分放在管底部, CRISPR 组分终点荧光信号值最强, 最终 22 μL 反应体系包括 LbCas12a、crRNA、ssDNA-FQ reporter、NEB buffer 2.1 (管盖上); Rehydration buffer、RPA-F、RPA-R、靶标 DNA、ddH₂O、magnesium acetate (管底)。

2.3 crRNA/Cas12a 的浓度优化

设置 0.50:1、0.75:1、1.00:1、1.25:1、1.50:1、1.75:1、2.00:1 以上 7 个不同浓度比值进行 RPA-CRISPR/Cas12a 反应(图 3C、3D)。实验结果表明, 当 crRNA/Cas12a 比值越大时, 终点荧光信号值越大, 切割效果越好, 但因成本限制问题, 最终选择了 2:1 作为最优条件。最后优化的结果为 1 $\mu\text{mol/L}$ LbCas12a、2 $\mu\text{mol/L}$ crRNA、10 $\mu\text{mol/L}$ ssDNA-FQ reporter。

2.4 RPA-CRISPR/Cas12a 灵敏度评价

以不同浓度的基因组 DNA 进行 RPA-CRISPR/Cas12a 的灵敏度测试, 将初始模板(58.1 ng/ μL)梯度稀释后作为靶标进行 RPA 扩增 20 min 后, 取其产物作为检测靶标进行 Cas12a/crRNA 切割反应, 反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行

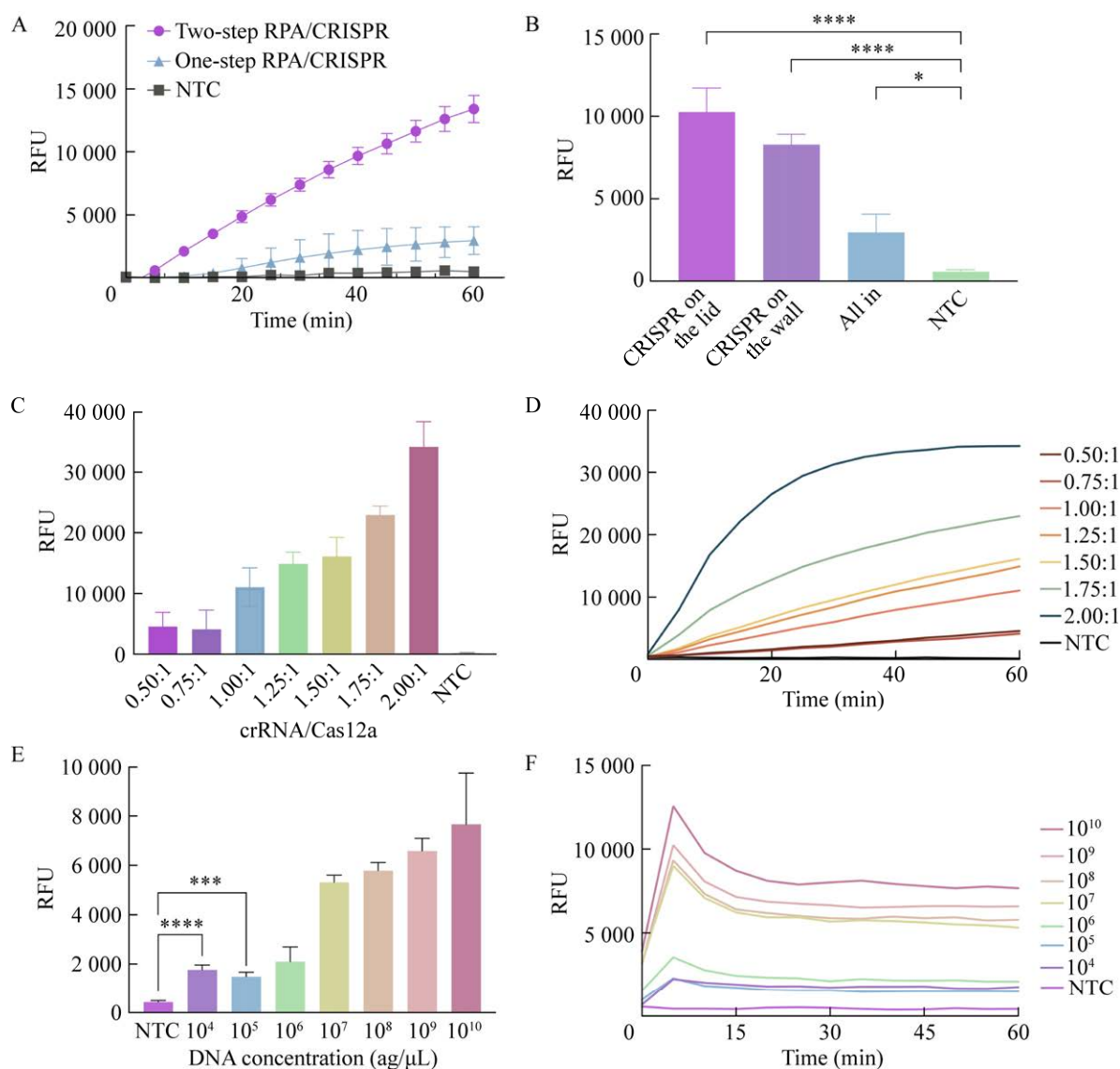


图3 检测体系的优化示意图 A: 切割活性验证对比示意图; B: one-pot 加样方法对比示意图; C-D: crRNA/Cas12a 浓度比值优化示意图; E-F: 两步法灵敏度测试示意图。NTC: 非靶标对照。

Figure 3 Schematic diagram of the optimization of the detection system. A: Comparison of cleavage activity verification; B: Comparison of one-pot sampling method; C-D: Optimization of crRNA/Cas12a concentration ratio; E-F: Sensitivity test of two-step method. NTC: Non target control. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

60 min, 每 5 min 测量 1 次荧光值。结果表明, 在扩增产物与 Cas12a/crRNA 复合体结合后, Cas12a 酶活性被激活, 对 ssDNA-FQ reporter 进行非特异性切割, 从而发出荧光信号, 试验组与非靶标对照组荧光信号差异极显著($P<0.0001$),

最终检测的基因组 DNA 浓度低至 58.1 fg/μL (图 3E、3F)。

2.5 OPRCC 灵敏度和特异性评价及回归分析

以 hvKP 标准菌的 DNA 初始浓度(5.81 ng/μL)

为基础,测试了前述建立的 one-pot 检测体系的灵敏度。结果表明,试验组与非靶标对照组荧光信号差异极显著($P<0.0001$),本研究建立的 OPRCC 检测体系可检测出低至 $58.1\text{ fg}/\mu\text{L}$ 的 hvKP 的 DNA 样本(图 4A),与 2.4 中非一体化检测灵敏度一致,并没有因加样方式的不同而导致灵敏度的偏差,并且在图 4A 中显示整个检测过程的荧光信号强劲,在荧光检测的 15 min

左右就达到饱和状态,整个过程包含 RPA 预扩增的时间小于 40 min。以包括经典肺炎克雷伯氏菌在内的 13 种非特异性菌种基因组 DNA 和 hvKP 标准菌基因组 DNA 作为检测靶标对该体系的特异性进行评估,结果表明,除靶标外,其余结果与非靶标对照结果无差异(图 4B)。

通过 hvKP 基因组对数 DNA 浓度与终点荧光信号值的线性回归拟合结果显示其 R^2 仅为

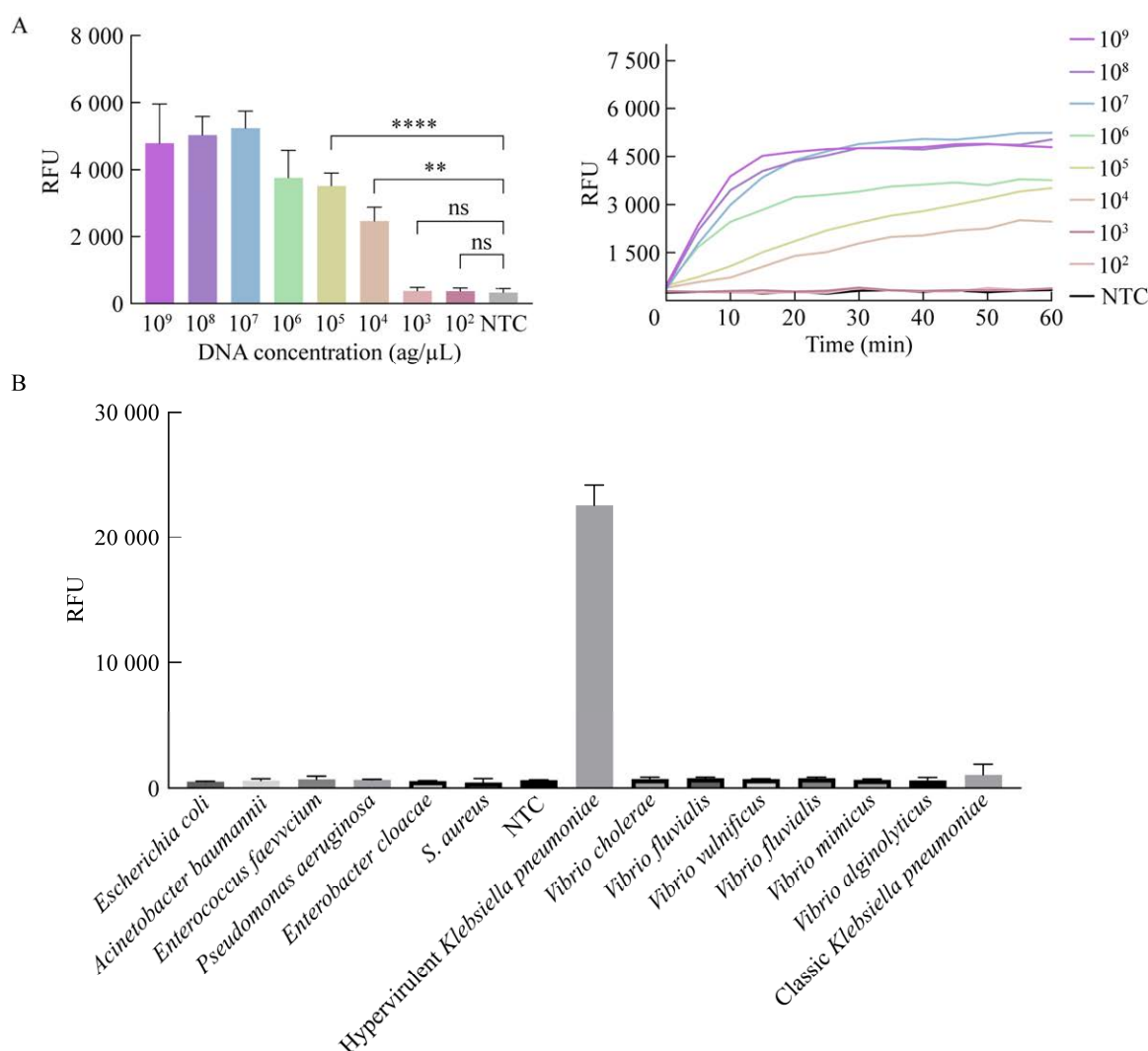


图 4 OPRCC 的性能测试示意图 A: OPRCC 灵敏度示意图; B: OPRCC 的特异性测试示意图。NTC: 非靶标对照。

Figure 4 Schematic of OPRCC performance testing. A: Schematic of OPRCC sensitivity; B: Schematic of OPRCC specificity testing. NTC: Non target control. ns: Not significant; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$.

0.811 (图 5), 相关系数较低, 但有研究者在进行 RPA 反应时发现运用二项式多元回归后相关系数得到了进一步提高^[35], 本文也对数据结果进行了二项式回归分析, 其 R^2 确实得到了相应的提升, 但仍不理想, 而对于定量分析, 理想的相关系数应该大于 0.98, 其原因可能由于 RPA 叠加 CRISPR/Cas 系统进行检测时确实由于 CRISPR/Cas 系统的加入提高了 RPA 的检测灵敏度, 但也由于过度的反应体系的加入进一步导致了整个系统中起始模板同步扩增的不稳定性从而加剧了定量检测的困难^[36-37]。

2.6 OPRCC 检测体系在血液样本中的可靠性评估

根据前期的实验结果, 本研究所建立的 OPRCC 检测体系表现出高度的特异性和灵敏度。为进一步验证其在实际应用中的性能, 以模拟 hvKP 感染的血液样本为对象, 并与常规的 qPCR 方法进行比较, 以评估该方法的可靠性。结果表明, 基于 OPRCC 检测方法可检出血液样本中菌液浓度范围为 5.5×10^0 – 5.5×10^8 CFU/mL, 相较于于

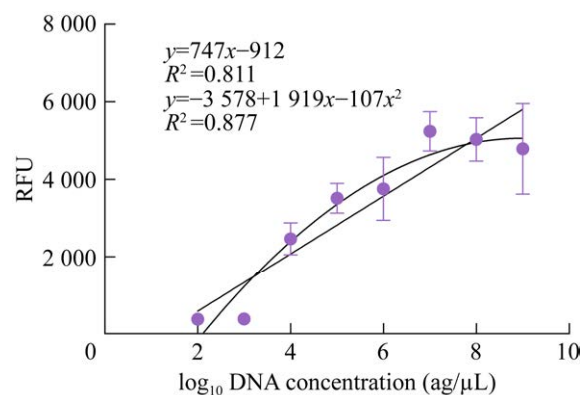


图 5 OPRCC 基因组 DNA 灵敏度线性及二项式多元回归分析 终点荧光信号值与对数 DNA 浓度($n=3$)的相关系数 $R^2=0.811$ (线性回归); $R^2=0.877$ (二项式多元回归)。

Figure 5 OPRCC genomic DNA sensitivity linear and second order polynomial (quadratic) of endpoint fluorescence signal value and log DNA concentration ($n=3$) correlation coefficient $R^2=0.811$ (linear regression); $R^2=0.877$ (second order polynomial (quadratic)).

qPCR (检测浓度为 5.5×10^2 – 5.5×10^8 CFU/mL), 该方法能够检出更低浓度的目标菌, 并且在 15 min 即可观察到结果(图 6A、6B)。

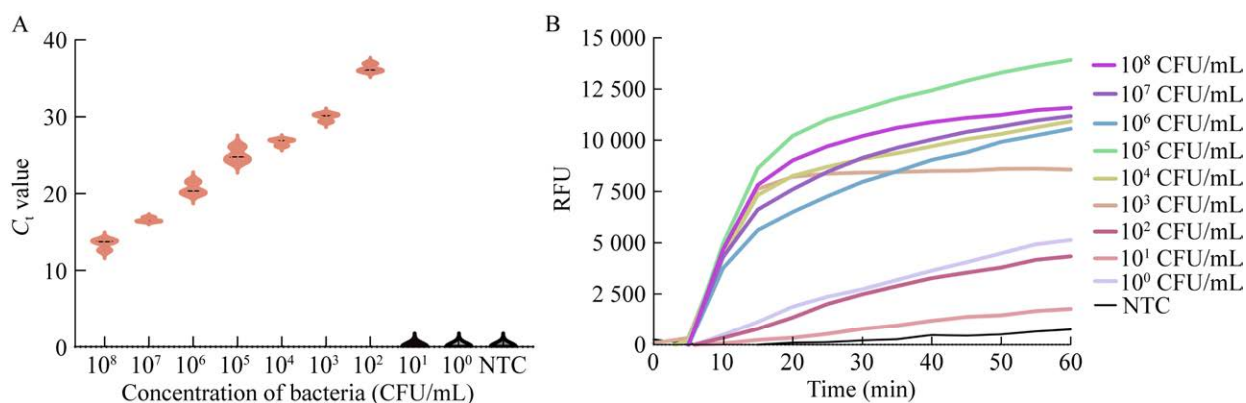


图 6 OPRCC 检测体系在血液样本中的可靠性评估 A: qPCR 在模拟临床样本的检测示意图; B: OPRCC 在模拟临床样本的检测示意图。

Figure 6 Reliability evaluation of OPRCC detection system in blood samples. A: Schematic of qPCR detection in simulated clinical samples; B: Schematic of OPRCC detection in simulated clinical samples.

3 讨论

过去十几年间, 暴发性传染疾病对人类生命健康构成了严重威胁, 尽管随着科技进步, 我们在治疗方面取得了显著成效, 但自新冠疫情暴发以来, 预防措施的重要性更加突显, 尤其是社区性传染病的快速筛查方面, 这项工作已成为公共卫生的重中之重。当前, 肺部健康问题备受关注, 具有高度传染性且与高致死率相关的高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)成为研究重点^[3-5]。

基于 CRISPR/Cas 系统与 RPA 方法联用而建立的一体化反应模式, 不仅延续了 RPA 反应扩增过程中低温、恒温、快速的优势, 并且改善了 RPA 反应灵敏度较低且易出现假阳性结果的局限性, 本文建立的检测体系, 测试了 13 种非特异性菌种, 其中包括一些与 hvKP 相似且常见的院感病原菌, 尤其是经典的肺炎克雷伯氏菌, 检测结果均为阴性。表明本体系具有良好的特异性。在灵敏度检测中, 本文检测出的最低基因组 DNA 浓度为 58.1 fg/ μ L, 而在模拟血液样本中可检出的最低浓度为 5.5×10^0 CFU/mL, 这已能满足日常生活中的检测需求。相较于 qPCR 方法(最低检测浓度 5.5×10^2 CFU/mL), 本文所建立的方法在检测模拟血液样本中时, 其灵敏度提高了 100 倍, 整体检测时间由 80–120 min 缩短至 40 min; 相较于传统的基于细菌表征的检测方法, 本文开发的方法不仅缩短了检测时间, 还能更直观地反映检测结果。在总结已有的高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)检测方法时, 发现大多需要大型仪器及专业操作人员, 而本文开发的 OPRCC 方法仅需要 37 °C 的恒温条件与小型便携式荧光阅读器, 并且无须专业操作人员。这种方法在检测指标和检测时间等方面都具有明显优势(表 3)。

基于 RPA-CRISPR/Cas12a 的两步法检测体系已经具有足够的灵敏度和特异度, 但在实际操作中存在一些局限性。如, 需要先进行 RPA 扩增, 然后再将实验产物转移到 Cas12a 反应体系中, 这不仅增加了实验的烦琐程度, 还可能存在气溶胶污染的风险。为此, 研究者们探索了一种完全一体化的检测模式。在这种模式下, 只需在恒温 37 °C 条件下反应 40 min, 即可获得结果, 仅需使用便携式荧光检测仪。这种方法可广泛应用于基层场景, 如社区内的现场检测。然而, 在本研究中我们发现将 RPA 和 CRISPR/Cas12a 的所有组分同时加入反应体系并不能取得理想效果(图 3A)。这可能是因为 Cas12a 的顺式和反式切割活性会对 RPA 引物或扩增的目标 DNA 产生干扰, 从而降低 RPA 的扩增效率^[23,39-40], 所以在建立一体化的检测体系时, 为了避免 RPA 组分与 Cas12a 同时发挥作用, 我们将 CRISPR 的反应组放在管壁或管盖结果表明, 虽然将 CRISPR 组分放在管壁上也能产生终点荧光信号值(图 3B), 但由于液体加在管壁上滑落的几率更大, 且增加了加样难度, 所以最终根据终点荧光信号值与加样时便捷性选择了将 CRISPR 组分放在管盖上作为最终的加样方式(图 1 和图 3B), 而且我们在整个实验过程中也并未发现液体滑落的现象。虽然一体化检测体系相较于传统的两步法在操作步骤和检测条件上具有一定优势。然而, 由于该体系的基本原理限制, 其在实时定量分析方面存在不足, 无法满足样本中目标菌株的定量分析需求, 这也是 CRISPR/Cas 体系应用中的一大局限性。随着数字液滴化技术在核酸扩增中应用, 为 CRISPR/Cas 检测体系的定量分析带来曙光。数字液滴化技术通过泊松分布进行反应终点计数, 无须依赖定量曲线, 从而实现绝对定量分析。有研究者开发了一种基于液滴反应器与 Cas12a 结合的方法,

表 3 OPRCC 与已有 hvKP 检测方法的比较

Table 3 Comparison between OPRCC and existing hvKP assays

Method	Time	Index	Equipment	Minimum detectable concentration in clinical samples (including simulated blood samples)	References
String test	38–58 h	Length of mycelium	Autoclaves, constant temperature incubator, Petri dish, automatic microbial identification system, etc	–	[6-8]
<i>Galleria mellonella</i> infection combined string test	92–106 h	LD ₅₀	Autoclaves, constant temperature incubator, Petri dish, automatic microbial identification system, etc	–	[7]
Murine lethality assay	256–370 h	LD ₅₀	Autoclaves, constant temperature incubator, Petri dish, automatic microbial identification system, etc	–	[9-10]
Serum killing assay	41–46 h	Count of bacteria	Autoclaves, constant temperature incubator, Petri dish, automatic microbial identification system, etc	–	[7-10]
PCR	270 min	Gel electrophoresis bands	Centrifuge, DNA electrophoresis apparatus, gel imaging system, PCR apparatus, water bath, etc	–	[8]
Multiplex PCR	220 min	Gel electrophoresis bands	Centrifuge, DNA electrophoresis apparatus, gel imaging system, PCR apparatus, water bath, etc	–	[38]
Real time-PCR	80–120 min	Ct value	PCR apparatus water bath, etc	550 CFU/mL	This text
OPRCC	40 min	End-point endpoint fluorescence signal values	Water bath, portable fluorescence reader	5.5 CFU/mL	This text

–: 原文中未提到。

–: It is not mentioned in the original text.

通过引入两条 crRNA，实现单分子层面的定量检测^[41]。因此，将数字液滴化技术与本研究建立的 OPRCC 检测体系相结合，可能为解决定量检测瓶颈提供新的思路，值得后续作进一步探索和验证。此外，本文所建立的检测体系在引物与 crRNA 的设计方面也存在局限性。在前期研究中，我们发现目前尚无适用于 RPA 引物和 crRNA 同时设计及筛选的专用网站或软件，这使得我们在设计时需要特别关注 RPA 扩增区域与 crRNA 靶标序列的匹配性，即设计的高质量 crRNA 是否在高质量的 RPA 引物所扩增的

产物之内。随着 RPA 与 CRISPR/Cas 联用的检测体系的优势逐渐显现，基因序列的有效的筛选将成为一项重要且频繁的工作，未来可考虑开发相关网站或软件，以提高工作效率，推动该领域的进一步发展。

4 结论

本研究建立的检测体系对病原菌的检测快速且灵敏，且在模拟血液样本检测中也未受到血浆基质的影响，该方法最低可以检测到 5.5×10^0 CFU/mL 的菌浓度，优于传统的 qPCR

方法(最低检测浓度 5.5×10^2 CFU/mL)。相较于先前依赖复杂的实验室PCR扩增和凝胶电泳检测,本研究建立的一步式快速实时检测方法,大大简化了对 hvKP 的检测流程,这为在设备相对落后的基层医疗机构实现该病原菌的快速诊断提供了新的技术方案,未来该技术有望进一步优化,并拓展至更多病原体的快速检测,为基层医疗机构的疾病预防和控制工作发挥作用,也为全球公共卫生事业提供新的技术支撑。

REFERENCES

- [1] SHON AS, BAJWA RPS, RUSSO TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed[J]. Virulence, 2013, 4(2): 107-118.
- [2] 赵杭, 何知恩, 张慧敏, 曹嘉欣, 孙宝林. 高毒力肺炎克雷伯菌临床感染特征及毒力因子研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2023, 44(2): 83-90.
ZHAO H, HE ZE, ZHANG HM, CAO JX, SUN BL. Research progress of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clinical infection features and virulence factors[J]. World Notes on Antibiotics, 2023, 44(2): 83-90 (in Chinese).
- [3] HENNEQUIN C, ROBIN F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2016, 35(3): 333-341.
- [4] YANG QW, JIA XM, ZHOU ML, ZHANG H, YANG WH, KUDINHA T, XU YC. Emergence of ST11-K47 and ST11-K64 hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in bacterial liver abscesses from China: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Emerging Microbes & Infections, 2020, 9(1): 320-331.
- [5] DAI PP, HU DK. The making of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2022, 36(12): e24743.
- [6] RUSSO TA, MARR CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019, 32(3): e00001-19.
- [7] SHI QC, LAN P, HUANG DY, HUA XT, JIANG Y, ZHOU JC, YU YS. Diversity of virulence level phenotype of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from different sequence type lineage[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 94.
- [8] MAI DM, WU AQ, LI R, CAI DH, TONG HC, WANG N, TAN JQ. Identification of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* based on biomarkers and *Galleria mellonella* infection model[J]. BMC Microbiology, 2023, 23(1): 369.
- [9] COMPAIN F, BABOSAN A, BRISSE S, GENEL N, AUDO J, AILLOUD F, KASSIS-CHIKHANI N, ARLET G, DECRÉ D. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(12): 4377-4380.
- [10] LIU Y, LONG D, XIANG TX, DU FL, WEI DD, WAN LG, DENG Q, CAO XW, ZHANG W. Whole genome assembly and functional portrait of hypervirulent extensively drug-resistant NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST86[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2019, 74(5): 1233-1240.
- [11] MEI YF, LIU PP, WAN LG, LIU Y, WANG LH, WEI DD, DENG Q, CAO XW. Virulence and genomic feature of a virulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 strain of serotype K2 harboring *bla*_{NDM-5} in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 335.
- [12] PARROTT AM, SHI J, AARON J, GREEN DA, WHITTIER S, WU F. Detection of multiple hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a New York City hospital through screening of virulence genes[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2021, 27(4): 583-589.
- [13] BULGER J, MacDONALD U, OLSON R, BEANAN J, RUSSO TA. Metabolite transporter PEG344 is required for full virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain hvKP1 after pulmonary but not subcutaneous challenge[J]. Infection and Immunity, 2017, 85(10): e00093-17.
- [14] LIAO WJ, LONG D, HUANG QS, WEI DD, LIU XB, WAN LG, FENG YL, ZHANG W, LIU Y. Rapid detection to differentiate hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) from classical *K. pneumoniae* by identifying *peg-344* with loop-mediated isothermal amplification (lamp)[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1189.
- [15] YAN C, ZHOU Y, DU SH, DU B, ZHAO HQ, FENG YL, XUE GH, CUI JH, GAN L, FENG JX, FAN Z, FU TT, XU ZY, ZHANG Q, ZHANG R, CUI XH, TIAN ZY, CHEN YJ, ZHANG T, HUANG L, YUAN J. Recombinase-Aided Amplification Assay for Rapid Detection of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) and Characterization of the hvKp Pathotype[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(2): e0398422.
- [16] LI SY, CHENG QX, WANG JM, LI XY, ZHANG ZL, GAO S, CAO RB, ZHAO GP, WANG J. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. Cell Discovery, 2018, 4: 20.
- [17] MYHRVOLD C, FREIJE CA, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, METSKY HC, DURBIN AF, KELLNER MJ, TAN AL, PAUL LM, PARHAM LA, GARCIA KF, BARNES KG, CHAK B, MONDINI A, NOGUEIRA ML, ISERN S, MICHAEL SF, LORENZANA I, YOZWIAK NL, MacINNIS BL, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. Science, 2018, 360(6387): 444-448.
- [18] YUAN CQ, TIAN T, SUN J, HU ML, WANG XS, XIONG EH, CHENG M, BAO YJ, LIN W, JIANG JM, YANG CW, CHEN Q, ZHANG H, WANG H, WANG XR, DENG XB, LIAO XP, LIU YH, WANG Z, ZHANG GH, ZHOU XM. Universal and naked-eye gene detection platform based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas12a/13a system[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(5): 4029-4037.
- [19] LIU YJ, LIU H, YU GL, SUN WB, AIZAZ M, YANG GW, CHEN L. One-tube RPA-CRISPR Cas12a/Cas13a

- rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1278: 341757.
- [20] LI Y, DENG F, ZHANG CC, LIN XF, GOLDYS E. Integrated RPA-CRISPR/Cas12a system towards Point-of-Care *H. pylori* detection[C]//2023 45th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC). July 24–27, 2023, Sydney, Australia. IEEE, 2023: 1-4.
- [21] MOJICA FJM, DíEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, SORIA E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(2): 174-182.
- [22] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A. 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.
- [23] 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.
- [24] WANG B, WANG R, WANG DQ, WU J, LI JX, WANG J, LIU HH, WANG YM. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(19): 12156-12161.
- [25] SWARTS DC, JINEK M. Mechanistic insights into the *Cis*- and *trans*-acting DNase activities of Cas12a[J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(3): 589-600.e4.
- [26] 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.
- [27] LI YY, MANSOUR H, WANG T, POOJARI S, LI F. Naked-eye detection of grapevine red-blotch viral infection using a plasmonic CRISPR Cas12a assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(18): 11510-11513.
- [28] MIAO J, ZUO LL, HE DM, FANG ZX, BERTHET N, YU C, WONG G. Rapid detection of Nipah virus using the one-pot RPA-CRISPR/Cas13a assay[J]. *Virus Research*, 2023, 332: 199130.
- [29] AMAN R, MARSIC T, RAO GS, MAHAS A, ALI Z, ALSANEA M, AL-QAHTANI A, ALHAMLAN F, MAHFOUZ M. iSCAN-V2: a one-pot RT-RPA-CRISPR/Cas12b assay for point-of-care SARS-CoV-2 detection[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 9: 800104.
- [30] GONG JS, ZHANG D, FU LX, DONG YY, WU K, DOU XH, WANG CM. A one-pot convenient RPA-CRISPR-based assay for *Salmonella enterica* serovar *Indiana* detection[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(3): 519.
- [31] LIN M, YUE HH, TIAN T, XIONG EH, ZHU DB, JIANG YZ, ZHOU XM. Glycerol additive boosts 100-fold sensitivity enhancement for one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(23): 8277-8284.
- [32] DENG L, HE XY, LIU K, LI YL, XIA H, QIAN H, LU XX, MAO XH, XIANG Y. One-pot RPA-Cas12a assay for instant and visual detection of *Burkholderia pseudomallei*[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1252: 341059.
- [33] RUSSO TA, OLSON R, FANG CT, STOESSER N, MILLER M, MacDONALD U, HUTSON A, BARKER JH, La HOZ RM, JOHNSON JR. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018, 56(9): e00776-18.
- [34] HU L, FU YD, ZHANG S, PAN ZL, XIA J, ZHU P, GUO J. An assay combining droplet digital PCR with propidium monoazide treatment for the accurate detection of live cells of *Vibrio vulnificus* in plasma samples[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 927285.
- [35] ZHU P, CUI Y, PANG JH, XIONG Z, HUANG ZA, GUO SY, ZHANG S, CAI T. Sensitively and quickly detecting *Vibrio vulnificus* by real time recombinase polymerase amplification targeted to *vvhA* gene[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2021, 57: 101726.
- [36] XU C, LI L, JIN WJ, WAN YS. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos *Terminator* for rapid detection of genetically modified crops[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(10): 18197-18205.
- [37] LILLIS L, SIVERSON J, LEE A, CANTERA J, PARKER M, PIEPENBURG O, LEHMAN DA, BOYLE DS. Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2016, 30(2): 74-78.
- [38] YU FY, LV JN, NIU SQ, DU H, TANG YW, PITOUT JDD, BONOMO RA, KREISWIRTH BN, CHEN L. Multiplex PCR analysis for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistant (sequence type 258 [ST258] and ST11) and hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) strains[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018, 56(9): e00731-18.
- [39] ZETSCHKE B, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, SLAYMAKER IM, MAKAROVA KS, ESSLETZBICHLER P, VOLZ SE, JOUNG J, van der OOST J, REGEV A, KOONIN EV, ZHANG F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [40] LI SY, CHENG QX, LIU JK, NIE XQ, ZHAO GP, WANG J. CRISPR-Cas12a has both *cis*- and *trans*-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. *Cell Research*, 2018, 28(4): 491-493.
- [41] YUE HH, SHU BW, TIAN T, XIONG EH, HUANG MQ, ZHU DB, SUN J, LIU Q, WANG SC, LI YR, ZHOU XM. Droplet Cas12a assay enables DNA quantification from unamplified samples at the single-molecule level[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(11): 4643-4653.