

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240223003

鱼类产品中嗜水气单胞菌重组酶聚合酶扩增结合 CRISPR/Cas12a 快速检测及耐药性分析

高子惠^{1#}, 曲心平^{1#}, 凌 莉², 于海洋¹, 张 蕾¹, 胡 蝶¹, 吴 笛¹,
何雨霏¹, 郑秋月^{1*}, 曹际娟^{1*}

(1. 大连民族大学生命科学学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600; }

2. 广州海关技术中心, 广州 510623)

摘 要: **目的** 建立重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)结合簇状规则间隔短链重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein, CRISPR-Cas)新方法, 检测鱼类产品中嗜水气单胞菌, 并分析其耐药性。**方法** 采用基于最新的 CRISPR 基因编辑技术建立 RPA 结合 CRISPR/Cas12a 新方法, 快速检测嗜水气单胞菌, 同时采用环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)方法比对两种方法的检出率。筛查嗜水气单胞菌分离株的耐药性, 采用纸片扩散法测定耐药表型, 采用荧光染料(SYBR green, SYBG)实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)测定耐药基因, 分析耐药表型与耐药基因结果的一致性。**结果** 在 74 例鱼类样品中, 基于 RPA-CRISPR/Cas12a 和 LAMP 同时检测出 6 例嗜水气单胞菌。分析耐药性测试结果发现, 分离株对 5 大类 10 种抗生素的耐药情况差异较大, 耐药表型与耐药基因结果一致性较高。**结论** 所建立的 RPA-CRISPR/Cas12a 方法适用于嗜水气单胞菌快速检测。而细菌耐药性的产生机制比较复杂, 耐药表型的产生在一定程度上受耐药基因调控。研究结果为水产品中嗜水气单胞菌快速检测和耐药性筛查提供新思路和方法。**关键词:** 嗜水气单胞菌; 重组酶聚合酶扩增; 簇状规则间隔短链重复序列及其相关蛋白; 环介导等温扩增; 实时荧光定量聚合酶链式反应; 耐药表型; 耐药基因

Rapid detection and drug resistance analysis of *Aeromonas hydrophila* recombinase polymerase amplification combined with CRISPR/Cas12a in fish products

GAO Zi-Hui^{1#}, QU Xin-Ping^{1#}, LING Li², YU Hai-Yang¹, ZHANG Lei¹,
HU Die¹, WU Di¹, HE Yu-Fei¹, ZHENG Qiu-Yue^{1*}, CAO Ji-Juan^{1*}

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100805)、大连民族大学创新创业训练计划项目(202312026111)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1100805), and the Dalian Minzu University Innovation and Entrepreneurship Training program (202312026111)

#高子惠、曲心平为共同第一作者

#GAO Zi-Hui and QU Xin-Ping are Co-first Authors

*通信作者: 郑秋月, 博士, 教授, 主要研究方向为生物与食品安全。E-mail: 20211484@dlnu.edu.cn

曹际娟, 博士, 教授, 主要研究方向为生物与食品安全。E-mail: 20191414@dlnu.edu.cn

*Corresponding author: ZHENG Qiu-Yue, Ph.D, Professor, Dalian Minzu University, No.18, Liaohe West Road, Xipu New District, Dalian 116600, China. E-mail: 20211484@dlnu.edu.cn

CAO Ji-Juan, Ph.D, Professor, Dalian Minzu University, No.18, Liaohe West Road, Xipu New District, Dalian 116600, China. E-mail: 20191414@dlnu.edu.cn

(1. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 2. Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To establish a new method using recombinase polymerase amplification (RPA) combined with clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein (CRISPR-Cas) to detect *Aeromonas hydrophila* in fish products and analyze its drug resistance. **Methods** A new method of RPA combined with CRISPR/Cas12a was established based on the latest CRISPR gene editing technology to rapidly detect *Aeromonas hydrophila*, and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was used to compare the results of the two methods. To screen the drug resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates, the disk diffusion method was used to determine the drug resistance phenotype, SYBR Green (SYBG) real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to determine the drug resistance genes, and the consistency of the drug resistance phenotype and drug resistance gene results was analyzed. **Results** Among 74 fish samples, 6 cases of *Aeromonas hydrophila* were simultaneously detected based on RPA-CRISPR/Cas12a and LAMP. Analysis of the drug resistance test results found that the isolates had great differences in resistance to 10 antibiotics in 5 major categories, and the results of drug-resistant phenotypes and drug-resistant genes were highly consistent. **Conclusion** The established RPA-CRISPR/Cas12a method is suitable for rapid detection of *Aeromonas hydrophila*. The mechanism of bacterial drug resistance is relatively complex, and the generation of drug-resistant phenotypes is regulated by drug-resistant genes to a certain extent. The research results provide new ideas and methods for rapid detection and drug resistance screening of *Aeromonas hydrophila* in aquatic products.

KEY WORDS: *Aeromonas hydrophila*; recombinase polymerase amplification; clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protei; loop-mediated isothermal amplification; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; drug-resistant phenotype; drug-resistant gene

0 引 言

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属弧菌科气单胞菌属,在自然界中分布广泛,是一种人-畜-水生动物共患的条件致病菌,可感染鸟类、爬行类和两栖类,还可引起草鱼^[1]、青鱼^[2]、罗非鱼^[3]、鲤鱼^[4]、斑点叉尾鮰^[5]、中华鳖^[6]、日本鳗鲡^[7]等水产动物大规模的急性传染病,导致养殖鱼类大规模死亡,给水产养殖业带来巨大经济损失^[8]。嗜水气单胞菌作为一种新兴的肠道病原体和食源性病原体,可通过水源和食源感染人类,引发人类食物中毒、腹泻、急性肠胃炎、败血症等疾病,对水产品质量安全以及人类健康构成威胁^[9]。目前对嗜水气单胞菌的治疗主要依赖于抗生素,尚无有效手段,因此病原体的早期检测对于预防和控制这些感染显得尤为重要^[10]。

近年来随着抗生素的过度使用和滥用,水产品中耐药基因污染严重,给人类带来十分严峻的环境问题和健康问题;致使抗生素耐药细菌(antibiotic-resistant bacteria, ARB)和抗生素耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)迅速出现,进而导致 ARGs 在水生环境中广泛存在,并降低抗生素对人类和动物病原体的治疗效果^[11]。水产养殖中常用的抗生素包括磺胺类、大环内酯类、喹诺酮类、四环素类、氨基糖苷类等,常见报道的相关基因是磺胺类、四

环素类、喹诺酮类、大环内酯类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类以及氯霉素类耐药基因,虽然氯霉素类及部分喹诺酮类抗生素已被禁止使用,但相关的耐药基因在水产品中仍被检出^[12]。SHIN 等^[13]对水产品中的抗性组研究显示,环丙沙星和诺氟沙星与相应的耐药基因有很强的相关性,其残留物可以促进耐药基因的产生。AHMED^[14]对铜绿假单胞菌临床菌株的 ARGs 进行评估,发现抗生素耐药性最高的菌株获得的 ARGs 也最多。LI 等^[15]调查发现我国沿海 13 个养殖基地的水产品中均存在耐药基因污染,其中磺胺类 sulII 及四环素类 tetM 耐药基因检出率最高。全球范围内,抗生素的耐药性是一个日益严重的问题,人类通过食用动物源性食品或接触环境中的动物粪便获得 ARB 及 ARGs,据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报告,已有 700 万人死于耐药性感染,到 2050 年将有超过 10 万人死亡^[16-17]。CARVALHO 等^[18]在患有败血症新生儿和母亲的直肠微生物群中筛选到 blaCTX-M-15、blaNDM 等耐药基因,以及大肠杆菌、肺炎克雷伯菌等多种细菌,并证实耐药性可以在新生儿之间以及新生儿和母亲之间传播,易引发新生儿败血症。

目前,针对细菌耐药性的检测,抗生素敏感性实验(antimicrobial susceptibility testing, AST)是目前较常使用的方法,包括纸片扩散法、琼脂稀释法、肉汤稀释法、浓度

梯度法等经典方法,这种方法不仅耗时耗力,而且操作过程中可能会对实验人员安全产生一定的威胁,其也需要较长的时间和复杂的操作流程,且可能存在一定的误差率^[19]。针对细菌耐药基因的检测,目前存在免疫杂交技术、核酸杂交技术、核酸扩增技术等分子生物学技术以及全基因组测序、宏基因组测序和微生物单细胞转录组测序等高通量测序技术和基因芯片技术,但分子生物学技术所需探针价格昂贵;高通量测序技术实验周期长、成本高、步骤复杂、缺乏标准化和自动化的分析流程;基因芯片技术表型和基因型标记之间的相关性差、无最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值、无法检测新的或非特征性的耐药基因^[20]。基于簇状规则间隔短链重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein, CRISPR-Cas)系统的核酸检测技术具有快速、准确和对环境、仪器、操作人员要求低的优点,具有良好的前景和发展潜力。CRISPR/Cas 系统通过改变引导 RNA (guide RNA, gRNA)序列,达到易被重新编码以检测目标核酸的目的,并且对外源核酸高度特异,不对内源 DNA 和转录产物造成损害,在室温下即可反应,已与等温扩增技术相结合逐渐被应用到食源性致病菌检测中^[21]。党生^[22]将等温扩增重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)与 CRISPR/Cas12a 系统有效结合,开发了一种新型、快速、敏感、特异的布鲁氏菌感染核酸检测方法,检测过程可在 30 min 内完成。陈大伟等^[23]建立基于 RPA/CRISPR-Cas12a 技术单核细胞增生李斯特菌的快速检测方法,检测过程控制在 30 min,同时具有较高的灵敏度,20 μL 体系可检测到最低 0.0015 ng 靶标核酸。可见, RPA-CRISPR/Cas12a 在食源性致病菌检测方面展示出了快速省力、安全可靠的特点,并具有极高的灵敏度和特异性,在食品检测和动植物疾病检测方面具有较大的应用前景。

本研究收集了大连地区水产养殖企业的 74 例鱼类样品,采用所建立的 RPA 结合 CRISPR/Cas12a 检测方法快速检测鱼类样品受嗜水气单胞菌感染水平,同时采用环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)方法进行验证。采用纸片扩散法对分离出来的嗜水气单胞菌作耐药表型测定,采用荧光染料(SYBR Green, SYBG)实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)检测耐药基因,并分析药敏纸片方法与耐药基因检测方法结果的一致性。本研究旨在为水产品中嗜水气单胞菌快速检测和耐药性筛查提供新思路和方法。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

从大连地区水产养殖场收集了 74 例鱼类样品,冷冻

保存,每条鱼类样品单独包装在一个干净的聚乙烯袋中,通过冰盒运送到实验室 -20°C 储存备用。以本实验室保存的嗜水气单胞菌标准菌株 CICC10868 提取基因组 DNA 为阳性对照。

抗生素药敏纸片:卡那霉素(kanamycin, KAN, 30 μg /片)、庆大霉素(gentamicin, GEN, 10 μg +2.5 μg /片)、妥布霉素(tobramycin, TOB, 10 μg /片)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP, 5 μg /片)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR, 10 μg /片)、左氟沙星(levofloxacin, LEV, 5 μg /片)、四环素(tetracycline, TET, 30 μg /片)、氟苯尼考(flurfenicol, FFC, 30 μg /片)、氯霉素(chloramphenicol, CHL, 30 μg /片)、复方新诺明(compound sulfamethoxazole, CO SMZ, 25 μg /片)(中国杭州滨河微生物试剂有限公司);MightyPrep reagent for DNA 试剂盒[Code No.9182, 宝日医生物技术(北京)有限公司];SYBG 实时荧光定量 PCR 试剂[Cat#RR820A, 宝生物工程(大连)有限公司];DNA 扩增试剂盒(恒温扩增法)(051011M, IP20010301, 广州双螺旋技术有限公司);营养琼脂(GCM107)、营养肉汤(CM106)(北京陆桥技术股份有限公司);磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 10 $\times$)(惠州逗点生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

Mini-15K 微型高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司);MX-S 混匀仪(上海默威生物科技有限公司);BWS-10 恒温水槽与水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);MyBL-100 金属恒温浴(日本 AS ONE 公司);Flex Quant Studio TM 7 实时荧光 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Microplate Reader Synergy H1 酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.3 前处理及 DNA 提取

在无菌条件下对鱼体表进行消毒,取鱼鳃组织样品 0.1~0.2 g,放入盛有磷酸盐缓冲液的研磨管中,研磨制成约 10%的组织匀浆液,5000 $\times g$ 离心 5 min,收集离心沉淀物于 1.5 mL 微量管中,加入 100 μL 的 MightyPrep 试剂,混合均匀。95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 10 min,冷却至室温后,12000 $\times g$ 离心 2 min,以上清液直接作为模板,取上清液直接用于荧光 LAMP 分析。

嗜水气单胞菌标准菌株接种到 LB (Luria-Bertani)肉汤里,37 $^{\circ}\text{C}$,培养 24 h,取 1 mL 肉汤培养物加到 1.5 mL 微量管中,5000 $\times g$ 离心 5 min,收集沉淀物,沉淀物中加入 100 μL 的 MightyPrep 试剂,混合均匀。95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 10 min,冷却至室温后,12000 $\times g$ 离心 2 min,取上清液作为模板用于荧光 LAMP 分析。

1.4 合成检测用引物及 gRNA

1.4.1 LAMP 引物合成

LAMP 引物自行设计^[24],经过筛选,确定最优引物,由宝生物工程(大连)有限公司合成,具体序列见表 1。

表 1 用于 LAMP 方法的引物/探针
Table 1 Primers/probes used in the LAMP method

方法	引物/探针(位点)	引物/探针序列(5'→3')
LAMP	F3(正向 516 bp~534 bp)	ACTTGTCTCTGGTGGTCAC
	B3	CAACGACAGCGACACC
	FIP (F1c+F2)	CTGGTCAAGACGGTGGTGGTTGGTGGCGGTATCGTA
	(反向 646 bp~663 bp+正向 571 bp~588 bp)	
	BIP (B1c+B2)	GCCACTTGAAC TTGTTCTTGGTGTACGATACCGCCACCAA
	(正向 507 bp~529 bp+反向 572 bp~588 bp)	
	LoopF	TCAACGACAGCGACACC
	LoopB(正向 531 bp~548 bp)	GTCACCTTCTCGCTCAGG

1.4.2 RPA 引物及 gRNA 设计合成

RPA 引物及 gRNA 自行设计, 经过筛选, 确定最优引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 具体序列见表 2。

1.4.3 耐药基因检测引物合成

合成 5 类抗生素 10 个耐药基因的 qPCR 检测引物, 包括: 四环素类耐药基因 *tetA*; 磺胺类耐药基因 *sul1*、*sul2*; 喹诺酮类耐药基因 *qnrA*、*qnrD*、*qnrS*; 氯霉素类耐药基因 *cmlA*、*floR*、*cfr*; 氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')-Ib-cr*。引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成, 具体序列见表 3。

表 2 用于 RPA-CRISPR/Cas12a 方法的引物/探针
Table 2 Primers/probes used for RPA-CRISPR/Cas12a method

方法	引物/探针序列(5'→3')
RPA	FW CATAGGGATAGGAGATGT CAGCCTTG TAGAGC
	RV TGAGCGAGAAGGTGACCA CCAAGAACA
CRISPR-Cas12a	gRNA TCAAGTGGCCACTGGTAGGG ATCTACACTTAGTAGAAATTA CTATAGTGAGTCGTATTA

注: FW, 上游引物; RV, 下游引物, 表 3 同。

表 3 耐药基因 qPCR 检测引物
Table 3 Primers for qPCR detection of drug resistance genes

抗生素类别	基因	引物	序列(5'→3')	退火温度/℃	产物长度/bp	参考文献
磺胺类	<i>sul1</i>	FW	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	62	163	[25]
		RV	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG			
	<i>sul2</i>	FW	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	62	191	[25]
		RV	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
氯霉素类	<i>cmlA</i>	FW	GCCAGCAGTGCCGTTTAT	55	158	[15]
		RV	GGCCACCTCCCAGTAGAA			
	<i>floR</i>	FW	CGGTCGGTATTGTCTTCACG	56	171	[15]
		RV	TCACGGGCCACGCTGTAT			
喹诺酮类	<i>cfr</i>	FW	TGTGCTACAGGCAACATTGGAT	55	148	[15]
		RV	CAAATACTTGACGGTTGGCTAGA			
	<i>qnrA</i>	FW	AGGATTTCTCACGCCAGGATT	57	124	[26]
		RV	CCGCTTTCAATGAAACTGCA			
	<i>qnrD</i>	FW	AGTGAGTGTTTAGCTCAAGGAG	56.8	175	[26]
		RV	CAGTGCCATTCCAGCGATT			
	<i>qnrS</i>	FW	GTATAGAGTTCCGTGCGTGTGA	54.6	189	[26]
		RV	GGTTCGTTCTATCCAGCGATT			
四环素类	<i>tetA</i>	FW	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	62	210	[27]
		RV	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
氨基糖苷类	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	FW	TGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	55	482	[28]
		RV	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			

1.5 RPA 结合 CRISPR/Cas12a 检测

采用 RPA 结合 CRISPR/Cas12a 方法筛查 74 例鱼类样品中嗜水气单胞菌。提取鱼类样品的基因组 DNA, RPA 检测在金属恒温浴上进行。反应混合物(50 μL)包括 29.4 μL A Buffer, 2 μL RPA 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL RPA 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 3 μL 提取的鱼类样品基因组 DNA, 2.5 μL B Buffer 和 11.1 μL RNase Free H_2O 。反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行 20 min。

将扩增后的 RPA 产物用于 CRISPR/Cas12a 检测。CRISPR/Cas12a 检测在金属恒温浴上进行。反应混合物(40 μL)包括 4 μL 10 $\times$ Buffer, 0.4 μL LbCas12a protein (10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL gRNA (2 $\mu\text{mol/L}$), 29.6 μL RNase Free H_2O , 2 μL RPA product, 2 μL Reporter (10 $\mu\text{mol/L}$)。反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行 60 min, 之后 65 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 终止反应。通过酶标仪读取检测信号, 酶标仪检测荧光强度: 激发波长 480 nm; 扫描波长: 510~650 nm。

1.6 LAMP 荧光法检测

采用 LAMP 方法筛查 74 例鱼类样品中嗜水气单胞菌。提取鱼类样品的基因组 DNA, LAMP 检测在 Flex QuantStudio TM 7 实时荧光 PCR 仪上进行。反应混合物(25 μL)包括 12.5 μL RM-SCI 反应液(1X)、1 μL 的内引物 *FIP/BIP* (1.6 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL 的外引物 *F3/B3* (0.2 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL 的环引物 *LoopF/LoopB* (0.8 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL Bst 聚合酶、0.5 μL 荧光染料、2 μL DNA 模板和 3 μL RNase Free H_2O 。通过实时荧光 PCR 仪来观察荧光扩增曲线, 荧光基团选择 FAM, 淬灭基团选择 None。反应在 63 $^{\circ}\text{C}$ 预热 30 s, 将 63 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 和 63 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 作为一个循环, 于 63 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 处收集荧光信号, 40 个循环, 记录 Ct 值。

1.7 耐药基因 SYBG qPCR 检测

分析从鱼类样品中分离出来的嗜水气单胞菌的耐药性。SYBG qPCR 分析在 Flex QuantStudio TM 7 实时荧光

PCR 仪上进行。建立 25 μL 反应体系: TB Green Premix Ex Taq II (Tli RnaseH Plus) 2 $\times$ 12.5 μL 、PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.5 μL 、DNA 模板 2 μL 和超纯水 8 μL 。反应首先在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 30 s 一个循环的预变性; 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 一个循环。通过观察荧光曲线是否扩增来判断耐药基因是否存在。

1.8 耐药表型检测

采用国际临床实验室标准化委员会(International Committee for Clinical Laboratory Standardization, CLSI)推荐的纸片扩散法进行嗜水气单胞菌分离株的药物敏感性和耐药表型测定。取 1 mL 含有嗜水气单胞菌分离株的鱼鳃组织样品营养肉汤培养物均匀涂布于平板, 涂布 2 个平板, 将药敏纸片等间隔地贴于平板中央, 每个平板贴 3 个药敏纸片。将贴好药敏纸片的平板放入 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 16~18 h, 观察并记录药敏纸片的抑菌圈直径。

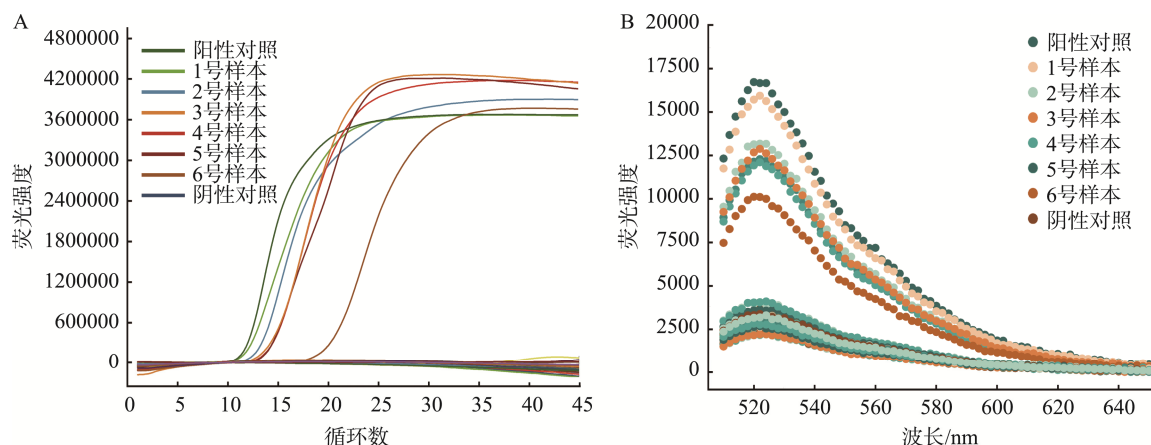
2 结果与分析

2.1 鱼类样品嗜水气单胞菌 LAMP 检测结果

对 74 份鱼类样品提取的 DNA 进行 LAMP 检测, 每个样本做两组平行实验, 检测到 6 个样本为嗜水气单胞菌阳性, 68 份样本没有检测到嗜水气单胞菌为阴性(图 1A)。

2.2 鱼类样品嗜水气单胞菌 RPA 结合 CRISPR/Cas12a 检测结果

对 74 份鱼类样品提取的 DNA 进行 RPA-CRISPR/Cas12a 检测, 每个样本做 3 组平行实验, 检测到 6 个样本为嗜水气单胞菌阳性, 68 份样本没有检测到嗜水气单胞菌为阴性(图 1B), 该结果与 LAMP 检测结果一致。两



注: A: LAMP; B: RPA-CRISPR/Cas12a; 1~6号为嗜水气单胞菌检出样品, 其余为嗜水气单胞菌未检出样品。

图1 鱼类样品6株嗜水气单胞菌检测结果

Fig.1 Test results of 6 strains of *Aeromonas hydrophila* in fish samples

种方法检出的阳性样品经过 SN/T 0751—2010《进出口食品中嗜水气单胞菌检验方法》确认为嗜水气单胞菌检出, 未检出的阴性样品经过 SN/T 0751—2010 确认皆为嗜水气单胞菌阴性结果。

2.3 嗜水气单胞菌分离株耐药表型检测结果

根据抗生素所形成的抑菌圈直径大小将每种抗生素的耐药情况用 S(敏感型, sensitive)、I(中间型, intermediate)、R(耐药型, resistant)记录。6 个嗜水气单胞菌分离株对 5 大类 10 种抗生素的耐药情况差异较大(图 2A), 对四环素类的四环素药物全部产生耐药性, 耐药率为 100%; 对喹诺酮类的环丙沙星、诺氟沙星药物耐药率为 100%; 对左氟沙星耐药率为 66.7% (4/6); 对氨基糖苷类的卡那霉素、庆大霉素和妥布霉素比较敏感, 耐药率分别为 16.7% (1/6)、33.3% (2/6)和 33.3% (2/6); 对磺胺类的复方新诺明产生强耐药性, 耐药率为 100%; 对氯霉素类的氟苯尼考敏感, 对氯霉素表现出强耐药性, 耐药率为 100%。

2.4 嗜水气单胞菌耐药基因检测结果

将 6 个嗜水气单胞菌分离株对 5 类总计 10 种抗生素耐药基因的检出情况进行统计(图 2B)。分析 SYBG qPCR 检测耐药基因结果, 6 株嗜水气单胞菌分离株均检出四环素类抗生素耐药基因 *tetA*, 检出率为 100%; 喹诺酮类抗生素耐药基因 *qnrA*、*qnrD* 和 *qnrS* 检出率分别为 83.3% (5/6)、

66.7% (4/6) 和 66.7% (4/6); 氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')-Ib-cr* 检测结果均为阴性, 没有检测到 Ct 值为阴性; 磺胺类耐药基因 *sul1* 和 *sul2* 检测结果均为阳性, 检出率为 100%; 氯霉素类耐药基因 *cmlA*、*floR* 和 *cfr* 检出率分别为 50% (3/6)、83.3% (5/6)和 66.7% (4/6)。

2.5 耐药表型与耐药基因一致性分析

分析嗜水气单胞菌分离株耐药表型和耐药基因检测结果的一致性(表 4)。结果表明分离株对四环素产生耐药性, 并检出四环素类抗生素耐药基因 *tetA*, 耐药表型和耐药基因两种方法检测结果一致, 相比符合率为 100%。分离株对喹诺酮类的环丙沙星、诺氟沙星药物产生耐药性, 对左氟沙星药物部分耐药, 总体耐药率为 88.9%, 相对应的喹诺酮类抗生素耐药基因 *qnrA*、*qnrD* 和 *qnrS* 也有检出, 检出率为 72.2%。对磺胺类的复方新诺明产生强耐药性, 相应的检出磺胺类耐药基因 *sul1* 和 *sul2*, 耐药基因与药敏实验的相比符合率为 100.0%。对氨基糖苷类的卡那霉素、庆大霉素和妥布霉素比较敏感, 总体耐药率为 27.8%, 相应的未检出氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')-Ib-cr*。对氯霉素类的氟苯尼考比较敏感; 但对氯霉素表现出强耐药性, 总体耐药率为 50%, 相对应的检出氯霉素类耐药基因 *cmlA*、*floR* 和 *cfr*, 检出率为 66.7%。综合检测结果分析, 药敏纸片法与耐药基因两种方法检测结果一致程度较高。

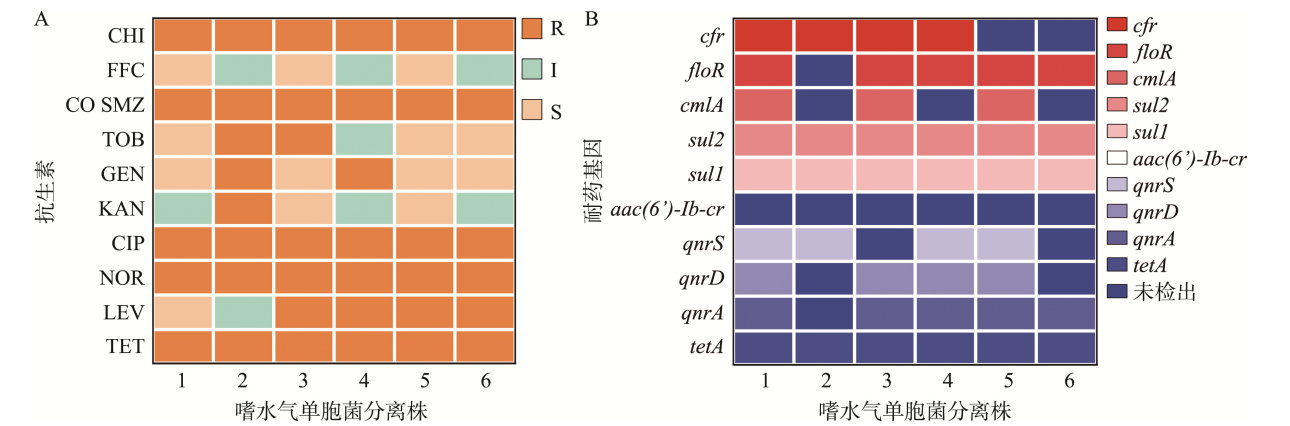


图 2 6 株嗜水气单胞菌分离株(A)耐药表型与(B)耐药基因检测情况
Fig.2 Drug resistance phenotype (A) and drug resistance gene detection (B) of 6 *Aeromonas hydrophila* isolates

类别	药敏纸片结果		耐药基因检测结果	
	阳性个数	耐药率/%	阳性个数	检出率/%
四环素	6	100.0 (6/6)	6	100.0 (6/6)
喹诺酮类	16	88.9 (16/18)	13	72.2 (13/18)
氨基糖苷类	5	27.8 (5/18)	0	100.0 (6/6)
磺胺类	6	100.0 (6/6)	12	100.0 (12/12)
氯霉素类	6	50.0 (6/12)	12	66.7 (12/18)

3 讨论与结论

CRISPR-Cas 系统是广泛存在于古生菌和细菌中的获得性免疫系统,依据所含 Cas 蛋白的不同可分为两大类 6 个型 32 个亚型,其中的二类 CRISPR 系统效应蛋白 Cas12、Cas13、Cas14,不仅具有切割特异靶标序列的顺式核酸酶活性,还有切割非特异单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)或单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA)的反式核酸酶活性,将 ssDNA 或 ssRNA 制成带有荧光基团和淬灭基团的报告分子,待测核酸序列与引导 RNA 的特异性结合会激发 Cas 蛋白核酸酶活性,通过检测非特异切割报告分子产生的荧光信号,可确定样品中是否存在靶标核酸,极大提高了检测的特异性和灵敏度,拓展了 CRISPR-Cas 系统的应用范围。目前 CRISPR-Cas 系统已被纳入各种类型的检测方法中,例如电化学检测、横向分析、基于纳米材料的传感器和纳米/微流控等。等温扩增技术常与 CRISPR 系统偶联,用来生成可检测的扩增子^[29-32]。LAMP 和 RPA 都是可快速扩增用于 CRISPR 检测所需核酸靶标的等温扩增技术,但 LAMP 引物设计烦琐且引物之间易形成二聚体, LAMP 反应温度在 63~65℃,与 CRISPR-Cas 检测系统温度相差较大,难以在同一体系进行,因此 RPA 是替代 LAMP 方法的一种技术手段^[33]。RPA 与 CRISPR-Cas 检测系统温度相近,两者联用,利用 RPA 特异性识别扩增目标区域,核酸内切酶在 gRNA 引导下识别原始间隔区相邻基序(protospacer adjacent motif, PAM)序列下游靶标 DNA,当 Cas12a/gRNA 复合物与扩增的靶标结合并执行双链切割,从而触发 LbCas12a 的反式切割活性去切割 ssDNA reporter。通过这种方式,可以特异性识别病原菌的靶基因片段,对病原菌检测有极高的灵敏度。相比于传统的基于 PCR 的方法,本方法无需购置昂贵的 qPCR 仪,仅采用便携式的恒温扩增仪或一台水浴锅,即可快速得到检测结果,通过酶标仪测定荧光强度,减少人为判读造成的主观误差。此外, RPA-CRISPR/Cas12a 方法检测温度为 37℃,避免了 qPCR 过程中高温造成的损失和污染, RPA 引物和 gRNA 的双重识别排除了相近种属中潜在的非特异性扩增,从而保证嗜水气单胞菌检测的高特异性。

本研究采用所建立的 RPA-CRISPR/Cas12a 方法从收集的 74 例鱼类样品中检测出 6 株嗜水气单胞菌,与 LAMP 方法的检测结果一致。采用药敏纸片法测定分离株对 10 种抗生素的耐药性,发现分离株对 5 大类 10 种抗生素的耐药情况差异较大。分离株的耐药表型和耐药基因一致性分析结果表明,耐药表型与耐药基因具有一定的一致性,细菌耐药性的产生机制比较复杂,耐药表型的产生在一定程度上受耐药基因调控,但耐药基因表达与否受多种物质调控,耐药表型产生原因亦受多种因素影响。因此对食源性致病菌的耐药表型与耐药基因相关性研究是十分必要的。

本研究将继续收集大连地区鱼类样品,进行嗜水气单胞菌的筛查检测及分离株的耐药性分析,防止致病菌及其耐药性通过食物链传递危害人体健康。

参考文献

- [1] 左洋洋, 朱永肖, 罗晓雯, 等. 草鱼源嗜水气单胞菌的毒力与耐药性检测[J]. 河南水产, 2019, (1): 26-29, 39.
- [2] ZUO YY, ZHU YX, LUO XW, *et al.* Detection of virulence and drug resistance of *Aeromonas hydrophila* derived from grass carp [J]. J Henan Aquat Prod, 2019, (1): 26-29, 39.
- [3] 张波, 曾令兵, 罗晓松, 等. 青鱼肠道出血症病原菌的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 607-612.
- [4] ZHANG B, ZENG LB, LUO XS, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacteria of intestinal hemorrhagic disease in black carp [J]. J Huazhong Agric Univ, 2010, 29(5): 607-612.
- [5] SALEH A, ELKENANY R, YOUNIS G. Virulent and multiple antimicrobial resistance *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) in Egypt with sequencing of some virulence-associated genes [J]. Biocontrol Sci, 2021, 26(3): 167-176.
- [6] ZHAO XL, JIN ZH, DI GL, *et al.* Molecular characteristics, pathogenicity and medication regimen of *Aeromonas hydrophila* isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. J Vet Med Sci, 2019, 81(12): 1769-1775.
- [7] 樊威, 周秋文, 王均, 等. 斑点叉尾鲴套肠症病原分离与鉴定[J]. 现代农业科技, 2022, (21): 165-169, 174.
- [8] FAN W, ZHOU DW, WANG J, *et al.* Isolation and identification of the pathogen of intussusception in channel catfish [J]. Mod Agric Sci Technol, 2022, (21): 165-169, 174.
- [9] 薛俊敏, 张飞, 阳钢, 等. 中华鳖“红脖子病”组织病理观察、病原鉴定及药敏试验[J]. 南昌大学学报(理科版), 2017, 41(5): 504-510.
- [10] XUE JJ, ZHANG F, YANG G, *et al.* Histopathological observation, pathogen identification and drug sensitivity test of “redneck disease” in Chinese soft-shell turtle [J]. J Nanchang Univ (Sci Ed), 2017, 41(5): 504-510.
- [11] 刘亚楠, 梁利国, 顾伟, 等. 异育银鲫致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定与药敏特性研究[J]. 水生生态学杂志, 2012, 33(5): 108-113.
- [12] LIU YN, LIANG LG, GU W, *et al.* Isolation, Identification and antibiotic susceptibility test of pathogenic bacteria strain from Hybridized prussian carp [J]. J Hydroecol, 2012, 33(5): 108-113.
- [13] 姜艳丽, 李丽丽. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2015, (2): 142-146.
- [14] JIANG YL, LI LL. Research progress on *Aeromonas hydrophila* [J]. Heilongjiang Agric Sci, 2015, (2): 142-146.
- [15] 蒋霞. 嗜水气单胞菌致病性研究进展[J]. 生物技术世界, 2014, (6): 75, 77.
- [16] JIANG X. Research progress on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. Biotech World, 2014, (6): 75, 77.
- [17] GAO ZH, PIAO YZ, HU B, *et al.* Investigation of antibiotic resistance genotypic and phenotypic characteristics of marine aquaculture fish carried in the Dalian area of China [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1222847.
- [18] WU J, YE F, QU J, *et al.* Insight into the antibiotic resistance of bacteria isolated from popular aquatic products collected in Zhejiang, China [J]. Pol J Microbiol, 2023, 72(1): 61-67.
- [19] 王秋水, 刘悦, 邓婕, 等. 动物性水产品及其养殖环境中抗生素抗性基因的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(5): 1453-1461.

- WANG QS, LIU Y, DENG J, *et al.* Research progress on antibiotic resistance genes in animal aquatic products and their breeding environments [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(5): 1453–1461.
- [13] SHIN H, KIM Y, HAN S, *et al.* Resistome study in aquatic environments [J]. J Microbiol Biotechnol, 2023, 33(3): 277–287.
- [14] AHMED OB. Detection of antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* by whole genome sequencing [J]. Infect Drug Resist, 2022, 15: 6703–6709.
- [15] LI J, SHAO B, SHEN J, *et al.* Occurrence of chloramphenicol-resistance genes as environmental pollutants from swine feedlots [J]. Environ Sci Technol, 2013, 47(6): 2892–2897.
- [16] MOORTHY K, CHANG KC, YANG HH, *et al.* Recent developments in detection and therapeutic approaches for antibiotic-resistant bacterial infections [J]. J Food Drug Anal, 2023, 31(1): 1–19.
- [17] MANCUSO G, MIDIRI A, GERACE E, *et al.* Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens [J]. Pathogens, 2021, 10: 1310.
- [18] CARVALHO MJ, SANDS K, THOMSON K, *et al.* Antibiotic resistance genes in the gut microbiota of mothers and linked neonates with or without sepsis from low- and middle-income countries [J]. Nat Microbiol, 2022, 7(9): 1337–1347.
- [19] 王文涛, 赵良, 侯立功, 等. RPA-CRISPR/Cas12a 在病原微生物检测中的研究进展[J/OL]. 微生物学通报: 1-12. [2024-03-22]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.230911>
- WANG WT, ZHAO L, HOU LG, *et al.* Research progress of RPA-CRISPR/Cas12a in the detection of pathogenic microorganisms [J/OL]. Microbiol China: 1-12. [2024-03-22]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.230911>
- [20] 姜桂来, 郁舒阳, 俞莞茜, 等. 细菌耐药性及耐药基因检测技术和方法的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2022, 15(10): 907–913.
- JIANG GL, YU SY, YU WQ, *et al.* Research progress in the detection techniques and methods of bacterial drug resistance and drug-resistant genes [J]. Chin J New Clin Med, 2022, 15(10): 907–913.
- [21] 曹菁, 王梓莹, 汪官翌, 等. CRISPR/Cas 系统在食品质量安全检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 7052–7058.
- CAO J, WANG ZY, WANG GZ, *et al.* Research progress on the application of CRISPR/Cas system in food quality and safety detection [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(17): 7052–7058.
- [22] 党生. 基于 CRISPR/Cas12a 系统检测布鲁氏菌感染的研究[D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2024.
- DANG S. Detection of *Brucella* infection based on CRISPR/Cas12a system [D]. Tongliao: Inner Mongolia University for the Nationalities, 2024.
- [23] 陈大伟, 李兵兵, 魏明月, 等. 基于 RPA/CRISPR-Cas12a 技术的单核细胞增生李斯特菌快速检测方法建立[J]. 肉类研究, 2023, 37(9): 46–51.
- CHEN DW, LI BB, WEI MY, *et al.* Development of a rapid detection method for *Listeria monocytogenes* based on recombinase polymerase amplification combined with CRISPR-Cas12a technology [J]. Meat Res, 2023, 37(9): 46–51.
- [24] GAO ZH, YANG CH, ZHANG XB, *et al.* Establishment of a rapid LAMP assay for *Aeromonas hydrophila* and comparison with the application of qPCR [J]. Metabolites, 2023, 13(7): 841.
- [25] PEI RT, KIM SC, CARLSON KH, *et al.* Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes(ARG) [J]. Water Res, 2006, 40(12): 2427–2435.
- [26] MINH TLV, QUANG NNM, CHI TT, *et al.* The co-selection of fluoroquinolone resistance genes in the gut flora of Vietnamese children [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42919.
- [27] HUANG MH, QI FF, WANG J, *et al.* Changes of bacterial diversity and tetracycline resistance in sludge from AAO systems upon exposure to tetracycline pressure [J]. J Hazard Mater, 2015, 298: 303–309.
- [28] PARK CH, ROBICSEK A, JACOBY GA, *et al.* Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11): 3953–3955.
- [29] NGUYEN LT, GURIJALA J, RANANAWARE SR, *et al.* CRISPR-ENHANCE: An enhanced nucleic acid detection platform using Cas12a [J]. Methods, 2022, 203: 116–124.
- [30] 游旸, 杜宗敏. 基于 CRISPR-Cas 系统的核酸检测方法研究进展[J]. 军事医学, 2021, 45(12): 955–960.
- YOU Y, DU ZM. Research progress on nucleic acid detection methods based on CRISPR-Cas system [J]. Mil Med Sci, 2021, 45(12): 955–960.
- [31] FENG W, NEWBIGGING AM, TAO J, *et al.* CRISPR technology incorporating amplification strategies: Molecular assays for nucleic acids, proteins, and small molecules [J]. Chem Sci, 2021, 12(13): 4683–4698.
- [32] AHMED MZ, BADANI P, REDDY R, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas advancement in molecular diagnostics and signal readout approaches [J]. J Mol Diagn, 2021, 23(11): 1433–1442.
- [33] YANG Y, WANG D, LV P, *et al.* Research progress on nucleic acid detection and genome editing of CRISPR/Cas12 system [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(4): 3723–3738.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)

作者简介



高子惠, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品质量安全检测。
E-mail: 1165173736@qq.com



曲心平, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 2684548546@qq.com



郑秋月, 博士, 教授, 主要研究方向为生物与食品安全。
E-mail: 20211484@dlnu.edu.cn



曹际娟, 博士, 教授, 主要研究方向为生物与食品安全。
E-mail: 20191414@dlnu.edu.cn