

瓜类细菌性果斑病 RPA-CRISPR/Cas12a 快速检测技术的建立及应用

阿依加玛丽·阿卜杜扎伊尔^{1,2}, 李相霖^{2,3}, 赵廷昌²,
玉山江·麦麦提⁴, 关巍², 杨玉文², 麦合木提江·米吉提¹

(1. 新疆农业大学农学院·农业农村部西北荒漠绿洲农林外来入侵生物防控重点实验室(部省共建) 乌鲁木齐 830052;
2. 中国农业科学院植物保护研究所·植物病虫害综合治理全国重点实验室 北京 100193; 3. 沈阳农业大学
植物保护学院 沈阳 110866; 4. 新疆维吾尔自治区农业科学院植物保护研究所 乌鲁木齐 830091)

摘要: 瓜类细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB), 是我国检疫性种传细菌病害, 对西瓜甜瓜产业的健康发展造成严重危害, 种子带菌检测对该病害的综合防控具有重要意义。针对该病害在简易实验室及田间快速检测的需求, 本研究设计了西瓜噬酸菌特异性的重组酶聚合酶等温扩增技术(RPA)引物和规则成簇的间隔短回文重复序列(CRISPR) crRNA, 通过优化反应时间、温度、crRNA 与 LbCas12a 蛋白浓度配比、荧光和试纸条报告分子浓度, 构建了 RPA-CRISPR/Cas12a 快速检测方法。结果表明, 该体系在 39 °C 恒温条件下 RPA 扩增 10 min, CRISPR/Cas12a 在 41 °C 孵育 10 min, 反应结束后通过蓝光照射或侧向流层析试纸条 5 min 即可肉眼直接观察检测结果。该检测技术特异性好、灵敏度高, 相比蓝光照射, 侧向流层析试纸条具有更高的灵敏度, 其 DNA 最低检测量为 0.000 1 pg·μL⁻¹, 菌悬液最低检测量为 1 CFU·mL⁻¹。该技术可直接对病组织研磨液和种子浸泡液进行检测, 在实际种子样品检测中, 当 600 粒健康种子样品中掺杂 1 粒带菌种子时, 仍能检测到, 满足了西甜瓜种子高通量检测的需求, 为种子生产企业和农户的田间现场快速检测瓜类细菌性果斑病提供了技术支持。

关键词: 瓜类细菌性果斑病; 重组酶聚合酶等温扩增; CRISPR; 检测技术

中图分类号: S41-30

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2026)07-082-11

Development and application of a recombinase polymerase isothermal amplification coupled with CRISPR/Cas12a detection system for bacterial fruit blotch

Ayijiamali Abuduzhayier^{1, 2}, Li Xianglin^{2, 3}, Zhao Tingchang², Yushanjiang Maimaiti⁴, Guan Wei², Yang Yuwen², Maihemutijiang Mijiti¹

(1. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University/Key Laboratory of Prevention and Control of Invasive Alien Species in Agriculture & Forestry of the North-Western Desert Oasis (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Urumqi 830052, Xinjiang, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100193, China; 3. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China; 4. Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China)

Abstract: Bacterial fruit blotch (BFB) is a quarantine seed-borne bacterial disease in China, causing serious harm to the healthy development of the watermelon and melon industry. Detection of seed-borne bacteria is of great significance for the integrated management of this disease. To meet the demand for rapid detection in simple laboratories and in the field, this study designed specific recombinase polymerase isothermal amplification (RPA) primers and CRISPR/Cas12a crRNAs specific to *Paracitovorax citrulli*. By optimizing the reaction time, temperature, the concentration ratio of crRNA to LbCas12a protein, and the concentrations of fluorescent and lateral flow strip reporter molecules, a rapid CRISPR/Cas12a detection method was constructed. The results showed that the system was subjected to RPA amplification at

收稿日期: 2026-02-04; 修回日期: 2026-04-10

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFD1401200); 新疆维吾尔自治区重大科技专项(2023A02009, 2024A02007); 国家西甜瓜产业技术体系(CARS-25)

作者简介: 阿依加玛丽·阿卜杜扎伊尔, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为作物细菌病害发生规律与防控。E-mail: 1834301547@qq.com

通信作者: 杨玉文, 男, 副研究员, 研究方向为作物细菌病害发生规律与防控。E-mail: yangyuwen@126.com

39 °C for 10 minutes, followed by CRISPR/Cas12a incubation at 41 °C for 10 minutes. After the reaction was complete, the detection results could be directly observed with the naked eye by blue light irradiation or lateral flow strip for 5 minutes. This detection technology has good specificity and high sensitivity. Compared with blue light irradiation, lateral flow strip showed better sensitivity, with a minimum detection limit of 0.000 1 pg · μL⁻¹ and a minimum bacterial suspension detection limit of 1 CFU · mL⁻¹. The technology can be directly applied to detect infected tissue grinding fluid and seed soaking solution. In actual seed sample detection, when one contaminated seed was mixed with 600 healthy seeds, it could still be detected, meeting the high-throughput detection requirements for watermelon and melon seeds. This provides technical support for seed production enterprises and farmers to quickly detect bacterial fruit blotch in the field.

Key words: Bacterial fruit blotch; Recombinase polymerase isothermal amplification; CRISPR; Detection technology

西瓜噬酸菌(*Paracidovorax citrulli*, Pc)是引发瓜类细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)的高危种传细菌^[1]。细菌性果斑病具有暴发性强、扩散迅速、传染性高等特点,是严重危害我国西瓜、甜瓜生产的检疫性病害。瓜类细菌性果斑病于1965年在美国佛罗里达州首次被报道,之后该病在美洲持续扩散,1989年已蔓延至南卡罗来纳、印第安纳等9个州及关岛、提尼安岛等太平洋岛屿,当年即造成50%~90%的产量损失^[2]。在我国,张兴平等^[3]于1988年首次报道在陕西发现疑似西瓜果斑病,随后在20世纪90年代,该病害在山东、新疆、海南、内蒙古、北京等西瓜、甜瓜主产区陆续暴发,发生范围持续扩大,对西瓜、甜瓜产业造成了巨大损失^[4]。新疆作为厚皮甜瓜的起源中心,是我国种植面积最大、种质资源最丰富的地区。新疆有许多远近闻名的甜瓜品种,如金黄香软的老汉瓜、松脆可口的伽师瓜等,然而因其对瓜类细菌性果斑病抗性较差,一直以来受到其严重危害,使甜瓜的产量和品质急剧下降,给当地瓜农的收入造成巨大损失^[5]。

病害早期的快速、准确诊断是病害综合防控的重要保障。针对西瓜甜瓜种子、种苗的带菌情况进行快速精准检测显得尤为重要。目前,瓜类细菌性果斑病的检测主要通过病原菌血清学鉴定、分子生物学方法等技术手段开展。学者们先后建立了DAS-Dot-ELISA检测法^[6]、基于免疫磁分离和聚合酶链反应(IMS-PCR)的检测方法^[7]、基于TaqMan探针的实时荧光PCR检测技术^[8-9],以及可以一步区分西瓜噬酸菌不同组的多重PCR技术^[10]。为了实现病害的田间快速诊断,吴秀芹等^[11]建立了环介导等温扩增方法快速检测瓜类细菌性果斑病菌,该技术不需要昂贵设备,检测操作简便,结果直接可视,然而由于假阳性问题,严重限制了该技术在生产上的应用。

重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)是一种由重组酶、单链DNA结合蛋白和链置换Bsu聚合酶参与的恒温扩增。该

技术主要模仿T4噬菌体内的核酸复制机制^[12],依赖重组酶uvsX^[13]和单链结合蛋白Gp32在体外恒温条件下实现DNA模板的特异性识别与结合,并通过链置换DNA聚合酶Bsu实现模板DNA的扩增。RPA技术具有恒温反应、检测时间短、特异性强、灵敏度高、结果直观可视等优点,非常适用于疾病诊断和现场检测。目前,该技术已在动植物病原菌检测中应用。Rohrman等^[14]应用RPA-LFD技术快速检测HIV,并成功应用此方法检测干血渍中提取的DNA; Kersting等^[15]采用RPA-LFD技术检测恶性疟原虫;在植物病原菌检测中,该技术也已应用在番茄花叶病毒^[16]、梨火疫病^[17]、西瓜细菌性果斑病^[18]的检测中。

CRISPR/Cas12a系统由规则成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)与相关核酸酶(CRISPR associated 12a, Cas12a)共同构成。Doudna团队^[19]发现,CRISPR系统在剪切靶向双链DNA的同时,Cas12a的非特异性核酸内切酶活性会被激活,对体系内的单链DNA产生任意切割活性。该技术具备高灵敏度、高特异性、快速检测及低成本等显著技术优势,在动植物病原菌的检测中已有应用^[20-21],证明其在植物病原菌的检测中具有很大的应用潜力。

本研究拟建立并优化瓜类细菌性果斑病的RPA-CRISPR/Cas12a检测技术体系,并将该体系应用于甜瓜种子、种苗带菌的批量检测,为瓜类细菌性果斑病的田间诊断和种子检测提供简单便携、灵敏度高、特异性强、结果直观可视的检测技术。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养条件

试验于2025年4—12月在中国农业科学院植物保护研究所蔬菜病害组实验室进行(以下简称本实验室)。

所用供试菌株的具体信息见表1。西瓜噬酸菌于含氨苄西林(50 μg · mL⁻¹)的King's B(KB)培养

表 1 本试验所用的供试菌株
Table 1 The bacterial strains used in this test

菌株 Strain	细菌 Bacterium	寄主 Host	来源 Source
pslb65	西瓜噬酸菌 <i>P. citrulli</i>	甜瓜 Melon	本实验室 This laboratory
pslb1	西瓜噬酸菌 <i>P. citrulli</i>	甜瓜 Melon	本实验室 This laboratory
Aac5	西瓜噬酸菌 <i>P. citrulli</i>	西瓜 Watermelon	本实验室 This laboratory
pslbtw14	西瓜噬酸菌 <i>P. citrulli</i>	西瓜 Watermelon	本实验室 This laboratory
3183	燕麦噬酸菌 <i>P. avenae</i>	水稻 Rice	本实验室 This laboratory
2826	卡特莱兰噬酸菌 <i>P. cattleyae</i>	洋兰 Orchid	本实验室 This laboratory
B-1	丁香假单胞菌斑点致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	白菜 Chinese cabbage	本实验室 This laboratory
TE-6	茄科雷尔氏菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	烟草 Tobacco	本实验室 This laboratory
00383	稻黄单胞菌稻致病变种 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	水稻 Rice	本实验室 This laboratory
XV14	野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	番茄 Tomato	本实验室 This laboratory

基(胰蛋白胨 15 g、甘油 15 mL、MgSO₄ 1.5 g、K₂HPO₄ 1.5 g,pH=7.0,固体培养基添加琼脂粉 15 g) 28℃培养;燕麦噬酸菌等其他植物病原菌于 KB 培养基 28℃培养;大肠杆菌及其衍生菌株于 LB(胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g、pH=7.0,固体培养基添加琼脂粉 15 g)培养基 37℃培养。

1.2 RPA 引物和 crRNA 的设计及筛选

1.2.1 RPA 引物和 crRNA 的设计 依据 *Paracidovorax citrulli* 的 *upgB* 基因(胞外溶解结合蛋白族 I) 序列(Aave-0609)作为靶标 DNA 序列在线设计特异性引物(深圳易致生物科技有限公司,https://ezas-say.com/primer),选取 FP GC%、RP GC%和 max dimerisation percentage score 较低的引物,确保该靶标 DNA 序列包含 Cas 蛋白的识别区域(TTTN),并设计 crRNA。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.2.2 RPA 引物和 crRNA 的筛选 RPA 扩增按照 RPA 基础扩增试剂盒(TwistDX 公司,英国)说明书进行,振荡或吸打混匀后放入恒温金水浴反应器中,在 39℃孵育 30 min。利用 PCR 清洁试剂盒(苏州优逸兰迪生物科技有限公司,江苏)回收 RPA 产物做 CRISPR 模板开展后续试验。

CRISPR-Cas12a 荧光检测体系: DEPC-H₂O 13.4 μL(北京山承伟业科技有限公司),NEBuffer 3.1 (10×)2 μL,5 μmol·L⁻¹ Cas12a 0.4 μL(NEB 公司),40 U·μL⁻¹ RNase inhibitor 0.5 μL(天根生化科技有限公司),0.1 mol·L⁻¹ DTT 0.5 μL(天根生化科技有限公司),5 μmol·L⁻¹ 荧光报告分子 FQ-DNA 0.8 μL,10 μmol·L⁻¹ Va-crRNA 0.4 μL,将上述溶液加入反应管中充分混匀后,加入 2 μL RPA 扩增产物,振荡离心后迅速将反应管转移到实时荧光定量 PCR 仪(QuantStudio™ 6 Flex,赛默飞世尔科技公司)中,

在 37℃、30 min 条件下进行实时荧光检测。
侧向流层析试纸条检测体系: DEPC-H₂O 12.2 μL, NEBuffer 3.1 (10×) 2 μL, 5 μmol·L⁻¹ Cas12a 0.4 μL(NEB 公司),40 U·μL⁻¹ RNase inhibitor 0.5 μL,0.1 mol·L⁻¹ DTT 0.5 μL,5 μmol·L⁻¹ 侧向流层析试纸条报告分子 Va-DNA 2 μL, 10 μmol·L⁻¹ Va-crRNA 0.4 μL,将以上溶液加入反应管中充分混匀后,加入 2 μL RPA 扩增产物,振荡离心后放入恒温金水浴反应器中,于 37℃孵育 20 min。反应完成后将反应管取出并加入 80 μL 去离子水,混合均匀后将侧向流层析试纸条(南京沃博生物科技有限公司)的样品端浸于溶液中,读取结果,如果同时出现 C 线和 T 线或只出现 T 线,表明 RPA 反应产物中含有目标菌 DNA 扩增产物;如果只出现 C 线,表明 RPA 反应产物中没有目标菌 DNA 扩增产物。

1.3 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的特异性

将表 1 中供试菌株的 DNA 作为模板,以无菌水作为阴性对照,于 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系中扩增,分别采用荧光检测法和侧向流层析试纸条法进行检测验证,设置 3 次重复,以检测本试验设计的引物及 crRNA 的特异性。

1.4 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系优化

1.4.1 RPA 反应时间优化 设置 6 个 RPA 反应时间,分别为 5、10、15、20、25、30 min,并保持其他条件不变,通过反应产物的琼脂糖凝胶电泳条带强弱来确定最适反应时间。

1.4.2 CRISPR/Cas12a 荧光反应温度优化 设置 5 个 CRISPR/Cas12a 荧光反应温度梯度:37、38、39、40、41℃,扩增模板为 RPA 反应产物,并保持其他反应条件不变,进行 CRISPR/Cas12a 荧光检测,通

过实时荧光定量 PCR 仪检测并记录不同反应时间点的荧光强度值。

1.4.3 CRISPR/Cas12a 荧光检测体系优化 Cas12a 和 crRNA 的浓度比例优化:保持 CRISPR 反应体系中 Cas12a 浓度恒定为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 设置 crRNA 浓度梯度为 50、100、200、500、1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使 Cas12a 与 crRNA 的浓度比依次为 1:0.5、1:1、1:2、1:5、1:10, 其余反应条件保持一致;以无菌水作为阴性对照,通过实时荧光定量 PCR 仪检测并观察不同 Cas12a 与 crRNA 浓度比对荧光信号强度的影响。

Cas12a 和 crRNA 浓度优化:设置 CRISPR 反应体系中 Cas12a 与 crRNA 的浓度组合为:400 和 2000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、200 和 1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100 和 500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50 和 250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、25 和 125 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 等 5 个组合,其余反应条件保持一致;以无菌水作为阴性对照,利用实时荧光定量 PCR 仪检测不同 Cas12a 与 crRNA 浓度组合的荧光信号强度。

1.4.4 CRISPR/Cas12a 报告分子浓度的优化 荧光报告分子浓度的优化:设置 CRISPR 反应体系中荧光报告分子 5 个浓度梯度 50、100、200、400 及 800 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余反应条件保持完全一致,以无菌水作为阴性对照,通过实时荧光定量 PCR 仪监测不同报告分子浓度下的荧光信号强度变化,以评估浓度对荧光信号输出性能的影响。

试纸条检测体系优化:设置 CRISPR 反应体系中荧光报告分子 5 个浓度梯度 50、100、200、400 及 800 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余反应条件保持一致,并以无菌水作为阴性对照,系统比较不同报告分子浓度下控制条带与检测条带的显色强度。

1.4.5 RPA-CRISPR/Cas12a 反应时间优化 设置 5、10、20、30、40 min 5 个反应时间进行 RPA 扩增,分别使用不同反应时间的产物作为模板进行 CRISPR/Cas12a 检测,通过实时荧光定量 PCR 仪检测并记录 CRISPR/Cas12a 5、10、15、20、25、30、35 min 7 个反应时间的荧光强度值,以确定 RPA-CRISPR/Cas12a 的最优反应时间。

1.4.6 RPA-CRISPR/Cas 检测体系灵敏度 将提取的 DNA 和 $\text{OD}_{600}=0.3$ 的菌悬液分别进行 10 倍梯度稀释。DNA 浓度(ρ , 后同)稀释梯度为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.01 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.001 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.0001 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;菌悬液稀释梯度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 、 $1 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 95°C 温浴 10 min。分别取 $2 \mu\text{L}$ 不同浓度的 DNA 和菌悬液作为模板进行 RPA-CRISPR/Cas12a 检测,

确定检测的最低限。每个浓度梯度设置 3 次重复,并与实时荧光 PCR 方法^[20]进行比较。

1.5 植物组织及种子样品的检测

分别剪取自然发病甜瓜的叶片及茎部病健交界组织 0.1 g, 放入 2 mL 离心管中, 加入 800 μL 无菌水, 用无菌玻璃棒充分研磨后静置 5 min, 取上清作为待测模板;将人工接菌的单粒种子, 100 粒健康种子中分别混合 10 粒、5 粒、1 粒带菌种子, 200 粒、400 粒和 600 粒健康种子中分别混合 1 粒带菌种子, 分别放入 20 mL 或 50 mL 的无菌离心管中, 加适量无菌水(以没过种子为宜), 28°C 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇培 5 min 后取上清液作为待测模板^[10]。采用本研究建立的 RPA-CRISPR/Cas12a 体系进行检测, 将所得结果与 qPCR 检测结果进行对比。

2 结果与分析

2.1 RPA 引物设计及筛选

设计 4 对 RPA 引物和 4 条 crRNA, 引物信息详见表 2。RPA 引物筛选分三轮进行, 第一轮引物筛选, 先选定反向 R4 引物(选定 R4 作为反向引物是因为 GC 含量最低)去筛选所有的正向引物, 结果显示(图 1-A)有条带的有 F1+R4 和 F2+R4。第二轮引物筛选, 将正向 F1 和 F2 引物对所有的反向引物进行筛选。结果显示(图 1-A)有条带的为 F1+R4、F2+R2、F2+R3 和 F2+R4。第三轮引物筛选, 将 F1+R4、F2+R2、F2+R3 和 F2+R4 进行 qPCR 检测, 溶解曲线结果(图 1-B)可见只有 F2+R4 是单峰曲线, 因此确定 F2+R4 作为 RPA 扩增引物, 开展后续试验。

2.2 crRNA 的筛选

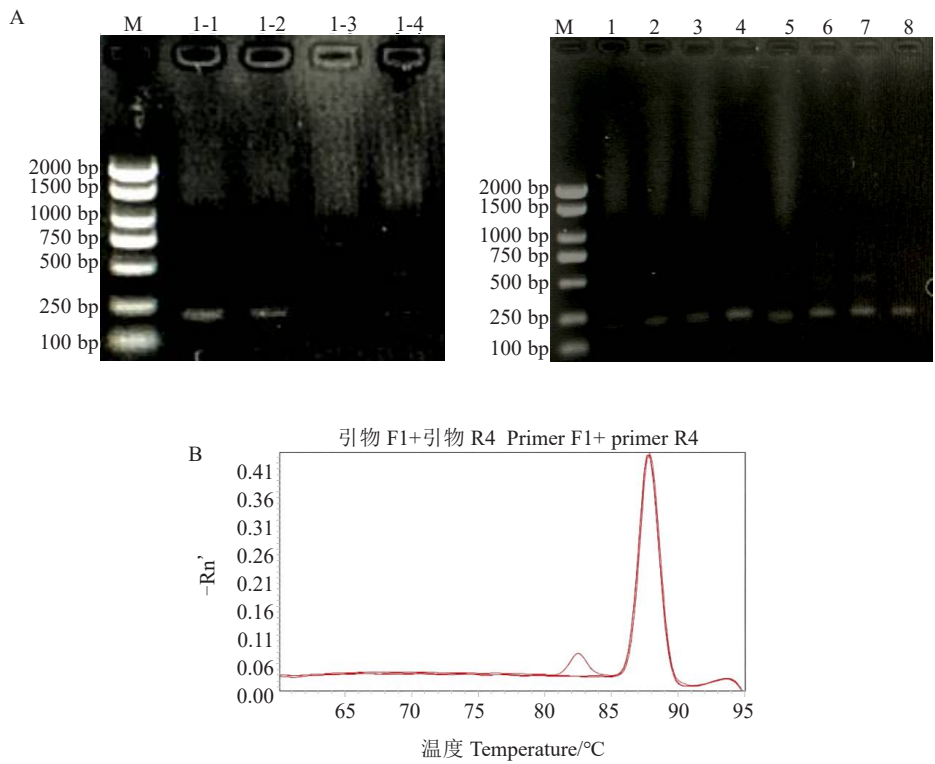
将设计的 4 条 crRNA 引物 crRNA 1~4 按照 1.2.2 中的 CRISPR 反应体系进行荧光检测, 通过蓝光观察及荧光定量 PCR 仪测定荧光强度, 筛选最佳 crRNA。结果显示(图 2), 蓝光下 crRNA1~4 荧光强度均出现绿色荧光, 随着反应时间的增加, 荧光定量 PCR 检测中 crRNA4 信号值在 25 min 后明显高于 crRNA1~3, 试纸条检测线 crRNA4 也强于 crRNA1~3, 综合确定 crRNA4 作为 gRNA 用于后续试验。

2.3 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系的特异性

使用建立的 RPA-CRISPR/Cas12a 体系分别对西瓜噬酸菌、燕麦噬酸菌、卡特莱兰噬酸菌、丁香假单胞菌斑点致病变种、稻黄单胞菌稻致病变种、茄科雷尔氏菌及野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种进行检测, 以无菌水作为阴性对照。结果显示(图 3), 在蓝光下只有 Pc 的反应产生明亮的荧光,

表 2 引物、报告分子和探针序列
Table 2 Sequences of primers, reporters, and probes

试验 Experiment	引物名称 Primer name	序列 Sequence	备注 Note
RPA 扩增 RPA amplification	Ac-F1	AGCGAATTCCAGCCGTCCACGCTCAGCAAGG	本研究设计 Designed by this study
	Ac-F2	CCACGCTCAGCAAGGACCAGCAGATGGCCGA	
	Ac-F3	GCCAAGGGCGTGAAGGAAATCTCGGTCGTCT	
	Ac-F4	GAAGCTGCAGGCCAAGGGCGTGAAGGAAATC	
	Ac-R1	GAGGTCGTGCTTGACGGTGATGCCGGTGATT	
	Ac-R2	TTCTTGGATGAGGTCGTGCTTGACGGTGATG	
	Ac-R3	CGTCGCCTTCCTGGATGAGGTCGTGCTTGAC	
	Ac-R4	GTCGCCTTCCTGGATGAGGTCGTGCTTGACG	
	crRNA1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGACGAGACGACCGAGAUUUCCUUCA	
	crRNA2	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAGACCGCCUGGCGUUCGCCGCCAC	
	crRNA3	UAAUUUCUACUAAGUGUAGACCGAGAACGCCUUGGCGAGGGUCU	
	crRNA4	UAAUUUCUACUAAGUGUAGACCTTACGCCCUUGGCCUUGCAGCU	
CRISPR 荧光检测 CRISPR fluorescent detection	FQ-reporter	6-FAM/CCACCC/BHQ1	
CRISPR 试纸条检测 CRISPR lateral flow assay	FB-reporter	6-FAM/TTTTTTTTTT/Biotin	
实时荧光定量 PCR Real-time PCR	A. citrulli-FP	CTGATAATCCTCGGCTCAACA	[21]
	A. citrulli-RP	TGAGCGCATTCTGACGAG	
	A. citrulli-P	AAGAAATACGCCCTCGCCAATCTCC-BHQ1	



注:A. RPA 凝胶电泳结果;B. qPCR 溶解曲线。图 A 中的 1-1~1-4 分别代表 F1+R4、F2+R4、F3+R4、F4+R4;1~8 分别代表 F1+R1、F1+R2、F1+R3、F1+R4、F2+R1、F2+R2、F2+R3、F2+R4。

Note: A. RPA gel electrophoresis results; B. The results of qPCR melting curve. In figure A, lanes 1-1-1-4 represent F1+R4, F2+R4, F3+R4, and F4+R4, respectively; 1-5-1-8 correspond to F1+R1, F1+R2, F1+R3, F1+R4, F2+R1, F2+R2, F2+R3, and F2+R4, respectively.

图 1 RPA 引物筛选
Fig. 1 Screening of RPA primers

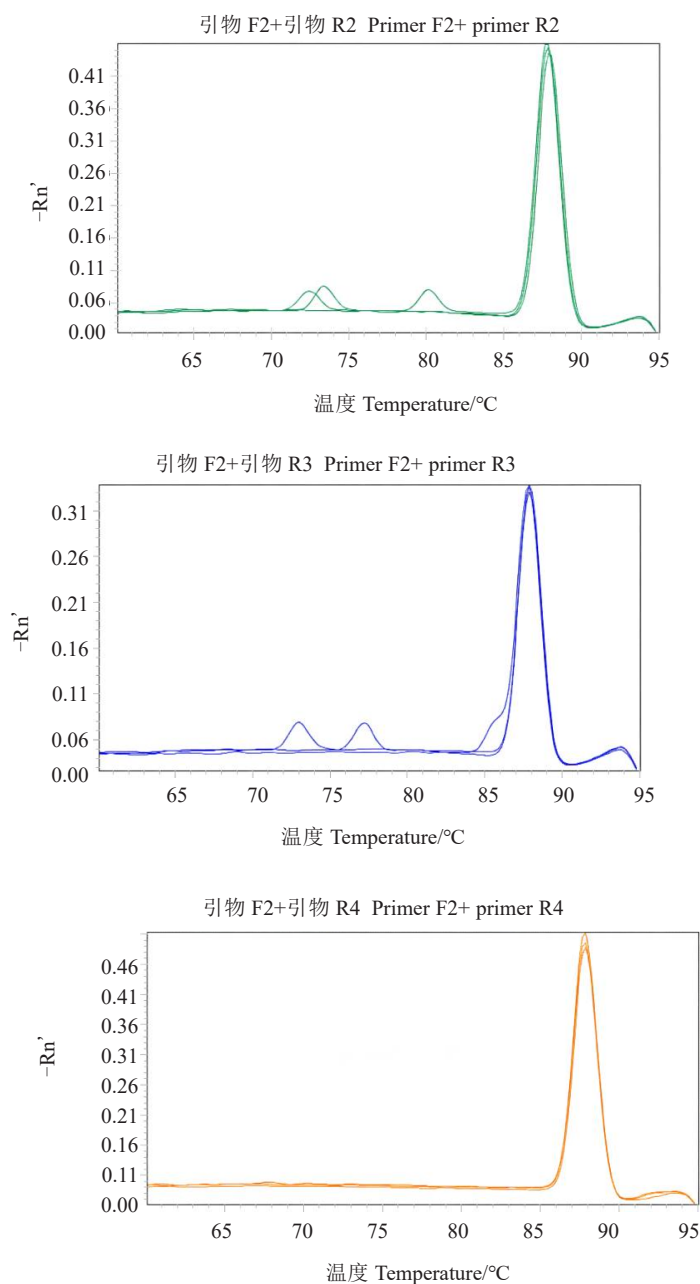


图1 (续)

Fig. 1 (Continued)

其他菌株未见荧光,同时试纸条也只有 Pc 出现明显的阳性检测线,其他菌株未出现阳性检测线。

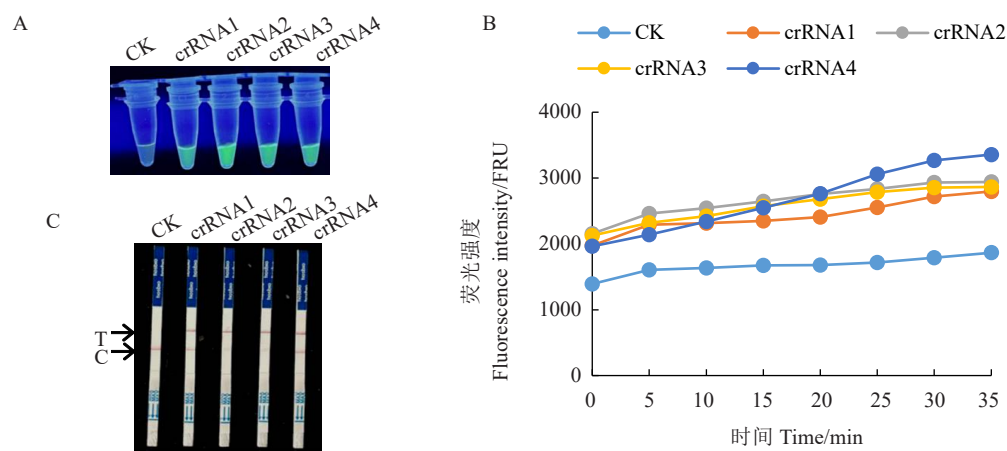
2.4 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系优化

2.4.1 RPA 反应时间优化 琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 4),反应 5 min 即可观察到目标条带,但条带不明亮;反应持续至 20 min 时,目标条带清晰可见且亮度明显提升。

2.4.2 CRISPR/Cas12a 反应温度优化 CRISPR/Cas12a 荧光检测结果显示(图 5),荧光信号强度随着反应温度升高而增强,荧光定量 PCR 检测到的荧

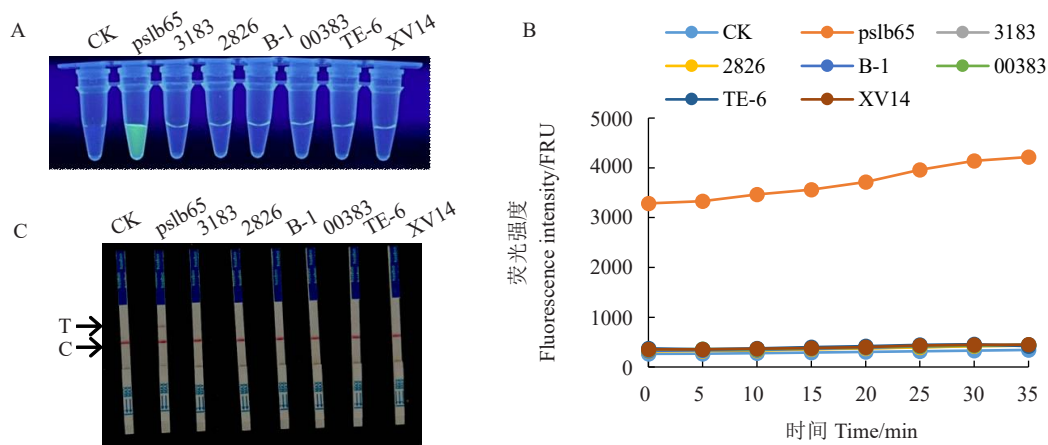
光信号值也随之增大。为了满足快速简便检测和高灵敏度的要求,选择 41 °C 作为后续试验的扩增条件。

2.4.3 CRISPR/Cas12a 荧光体系的优化 LbCas12a 蛋白和 crRNA 的浓度比例优化:CRISPR/Cas12a 荧光检测结果显示(图 6-A),当 LbCas12a 蛋白浓度为 $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Cas12a 和 crRNA 的浓度比例为 1:5 时,荧光信号值最高,为 2 794.322 RFU。crRNA 浓度处于过低或过高水平时,反应体系的荧光信号均无法达到峰值。基于此,二者浓度比例设定为 1:5



注:A. 不同 crRNA 的 CRISPR 检测荧光亮度;B. 不同 crRNA 的 CRISPR 检测荧光信号值;C. 不同 crRNA 的 CRISPR 试纸条检测结果。
Note: A. Fluorescence intensity of CRISPR detection with different crRNAs; B. Fluorescence signal value of CRISPR detection with different crRNAs; C. CRISPR test strip detection results with different crRNAs.

图 2 CRISPR 最佳 crRNA 的筛选
Fig. 2 Screening for the optimal crRNA in CRISPR



注:A. 不同菌株荧光亮度;B. 不同菌株荧光信号值;C. 不同菌株试纸条检测结果。
Note: A. Fluorescence intensity of different bacterial strains; B. Fluorescence signal values of different strains; C. Detection results of strips test for different strains.

图 3 特异性检验结果
Fig. 3 Results of specificity test

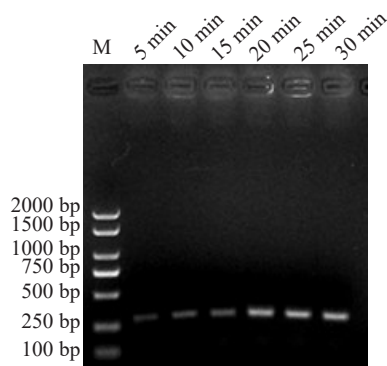
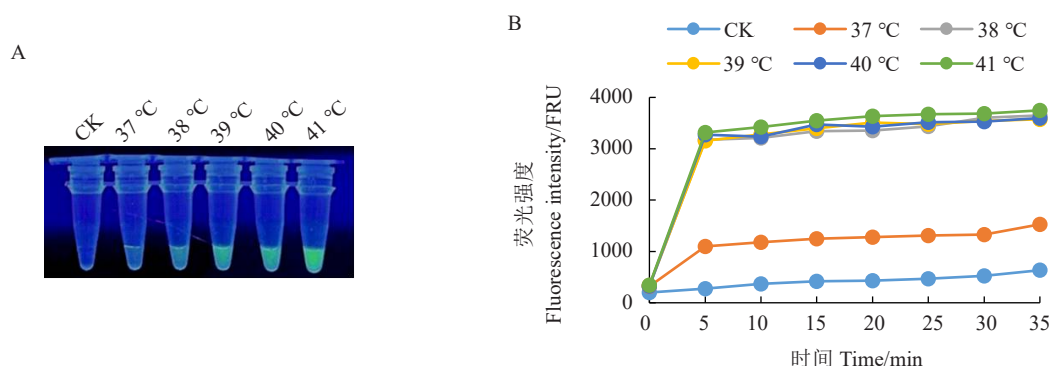


图 4 不同反应时间 RPA 扩增凝胶电泳结果
Fig. 4 Gel electrophoresis results of RPA amplification at different reaction times



注: A. CRISPR/Cas12a 不同反应温度下的荧光亮度; B. CRISPR/Cas12a 不同反应温度和时间的光信号值。

Note: A. Brightness of CRISPR/Cas12a at different temperatures; B. Fluorescence signal values of CRISPR/Cas12a at different reaction temperatures and times.

图 5 不同反应温度 CRISPR/Cas12a 检测结果

Fig. 5 CRISPR/Cas12a detection results under different reaction temperatures

是该试验体系下的最佳选择。

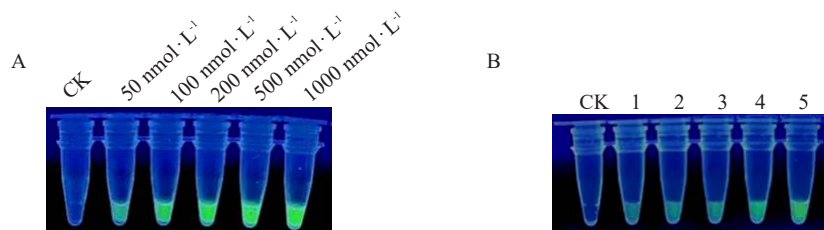
Cas12a 和 crRNA 的浓度优化: CRISPR/Cas12a 荧光检测结果显示, 5 个浓度配比的反应产物均能产生清晰的荧光(图 6-B)。荧光信号随着 Cas12a 与 crRNA 浓度的增加而增强, 当 Cas12a 与 crRNA 浓度分别为 $400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时荧光信号值最高, 达 2921.285 RFU , 综合成本因素考量, 选择 LbCas12a 浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 crRNA 浓度为 $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的组合, 荧光信号值为 2198.323 RFU , 进行后续检测。

2.4.4 CRISPR/Cas12a 报告分子浓度的优化 荧光报告分子浓度对荧光强度的试验结果显示(图 7-A), 荧光信号随报告分子浓度增加而增强, 报告分子终浓度达到 $800 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 荧光信号值最高。然而, 综合考虑检测效果和节约成本, 以 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

的荧光报告分子浓度(荧光信号值为 4106 RFU)作为该体系的荧光报告分子浓度。

试纸条报告分子浓度的优化: 试纸条报告分子 5 个浓度的结果表明(图 7-B), 随着报告分子浓度的升高, 检测条带逐渐加深, 在 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 检测条带已经非常清晰。故以终浓度 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为本检测体系中试纸条报告分子浓度。

2.4.5 RPA-CRISPR/Cas12a 反应时间优化 用 RPA 反应 10 min 的产物做模板, 进行不同反应时间的 CRISPR/Cas12a 荧光检测, 以选择 RPA-CRISPR/Cas12a 体系的最优反应时间。结果显示(图 8), 从反应 10 min 开始即有明显的荧光信号, 荧光信号强度随着扩增时间的增加而增强。为了满足快速检测和高灵敏度的要求, 将 10 min 作为后续试验的扩增条件。



注: A. LbCas12a 浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, crRNA 不同浓度亮度; B. LbCas12a 与 crRNA 不同浓度组合亮度。图 A 中 50~1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别代表 crRNA 不同浓度; 图 B 中 1~5 代表 LbCas12a 与 crRNA 不同浓度组合, 分别是 25 和 $125 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 50 和 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 100 和 $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 200 和 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 400 和 $2000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Note: A. LbCas12a at a concentration of $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, with fluorescence intensity under different crRNA concentrations; B. Fluorescence intensity under different concentration combinations of LbCas12a and crRNA. In figure A, 50-1000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ represents different concentrations of crRNA, respectively. In figure B, 1-5 represent different concentration combinations of LbCas12a and crRNA, which are as follows: 25 and $125 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 50 and $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 100 and $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 200 and $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 400 and $2000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

图 6 crRNA 不同浓度扩增效果

Fig. 6 Amplification efficiency at different crRNA concentrations

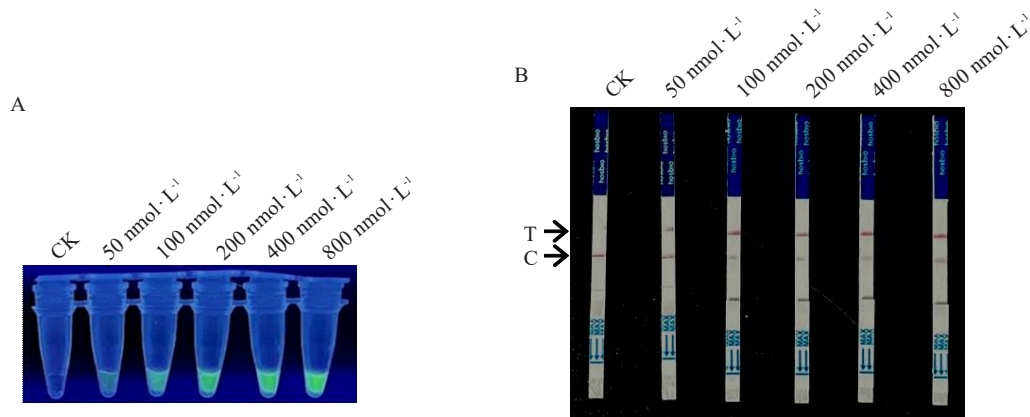


图 7 报告分子不同浓度扩增效果
Fig. 7 Amplification effects of reporter molecules at different concentrations

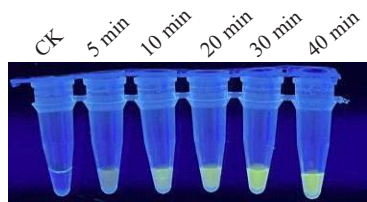
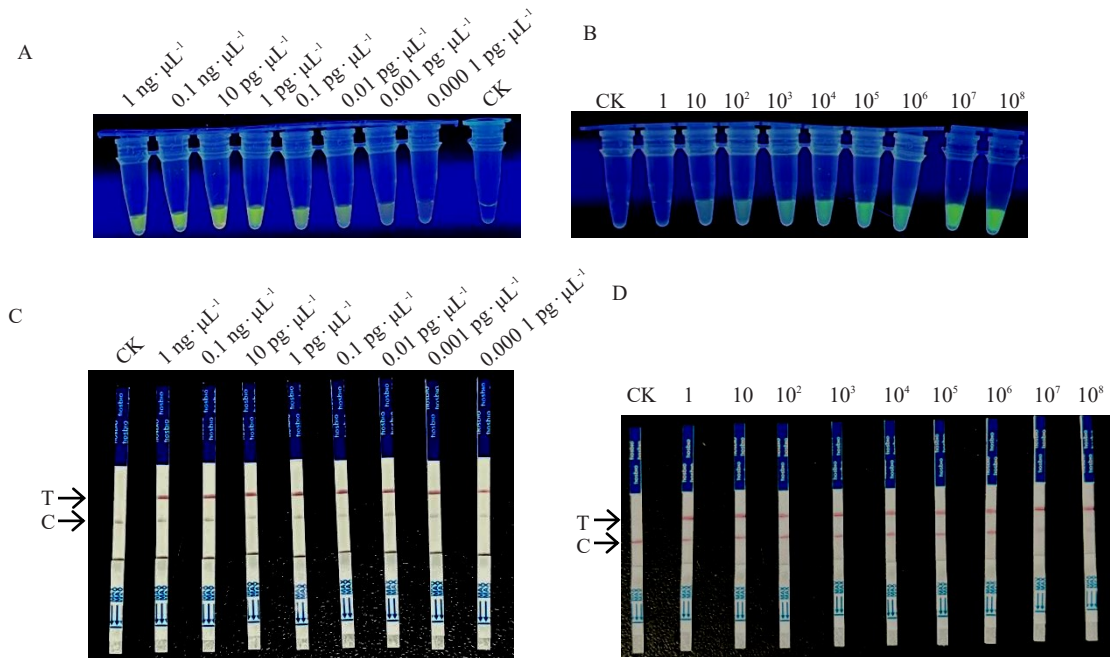


图 8 RPA 10 min 产物做模板 CRISPR/Cas12a 反应不同
时间荧光亮度
Fig. 8 Brightness of CRISPR/Cas12a at different times

2.5 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系灵敏度

将果斑病菌 DNA 10 倍梯度稀释至 $1\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、

$0.1\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.1\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.01\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.001\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.0001\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ；菌悬液稀释梯度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 、 $1\text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为灵敏度检测的模板。检测结果表明(图 9)，当 DNA 模板浓度为 $0.001\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，菌悬液浓度为 $10\text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时仍有明显的荧光信号；当 DNA 模板浓度为 $0.0001\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，菌悬液浓度为 $1\text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时侧向流试纸条仍有清晰的检测线。可见，侧向流试纸条的灵敏度比荧光检测要高 1 个数量级。



注:A. 不同浓度 DNA 荧光亮度;B. 不同浓度菌悬液荧光信号值;C. 不同浓度 DNA 试纸条检测结果;D. 不同浓度菌悬液试纸条检测结果。

Note: A. Fluorescence Intensity of Different DNA Concentrations; B. Fluorescence signal intensities of bacterial suspensions at different concentrations; C. Test Strip Detection Results of Different DNA Concentrations; D. Detection results of test strips for bacterial suspensions at different concentrations.

图 9 果斑病检测灵敏度结果
Fig. 9 Sensitivity results of BFB detection

2.6 植物组织和种子样品的检测

将甜瓜发病子叶、茎研磨液,人工接菌的单粒种子,100粒健康种子中分别混合10粒、5粒、1粒带菌种子,200粒、400粒和600粒健康种子中分别混合1粒带菌种子浸泡液进行检测。结果显示(表3),荧光检测与试纸条检测结果表明,茎、子叶、单粒带菌种子等样品,均呈现强阳性(+++,++);对于低浓度混合样本(600粒健康种子含1粒带菌种子,600+1),仍能稳定、有效地检出(荧光检测++,试纸条+),体现出该方法对果斑病菌具有较高的灵敏度,也说明该技术具有高通量检测带菌种子的能力。

表3 实际样品检测结果
Table 3 Test results of actual samples

甜瓜样品 Melon sample	RPP-CRISPR/Cas12a 快速检测 Rapid detection by RPA-CRISPR/Cas12a		qPCR 检测 qPCR detection
	荧光检测 Fluorescence detection	试纸条检测 Strip test detection	
CK	—	—	—
茎 Stem	+++	+++	++
子叶	+++	+++	+++
Cotyledo			
单粒种子 Single seed	+++	+++	+++
100+10	+++	+++	++
100+5	+++	+++	++
100+1	+++	+++	+
200+1	+++	+++	+
400+1	+++	++	+
600+1	++	+	+

注:表中“100+10”“100+5”“100+1”“200+1”“400+1”“600+1”分别代表100粒健康种子中分别混合10粒、5粒、1粒带菌种子,200粒、400粒和600粒健康种子中分别混合1粒带菌种子;“—”代表阴性,“+”代表阳性,随着“+”数量的增加阳性程度增强。

Note: In the table, the notations “100+10”, “100+5”, “100+1”, “200+1”, “400+1”, and “600+1” respectively represent 10 pathogen-infected seeds mixed with 100 healthy seeds, 5 pathogen-infected seeds mixed with 100 healthy seeds, 1 pathogen-infected seed mixed with 100 healthy seeds, 1 pathogen-infected seed mixed with 200 healthy seeds, 2 pathogen-infected seeds mixed with 400 healthy seeds, and 1 pathogen-infected seed mixed with 600 healthy seeds; “—” indicates a negative result, while “+” indicates positive results and their intensity, with the positive intensity increasing as the number of “+” signs increases.

3 讨论与结论

带菌种子的远距离运输是瓜类细菌性果斑病远距离传播的最主要途径,因此西瓜、甜瓜种子种苗的带菌检测是预防该病害的关键环节。本研究

构建了瓜类细菌性果斑病菌的 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系,无需专业技术人员操作和复杂实验设备,操作简单、快捷、特异性好、灵敏度高、检测结果可视,可满足带菌种子高通量检测的需求。RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系采用两步法,RPA 39℃扩增10 min;CRISPR/Cas12a 41℃恒温扩增10 min,用便携式蓝光手电筒照射或侧向流试纸条5 min后可直接观察检测结果,非常适合田间及现场快速检测。

特异性检测结果显示,该方法与嗜酸菌属其他近缘种无交叉反应;灵敏度检测结果显示,当DNA浓度为0.001 pg·μL⁻¹、菌悬液浓度为10 CFU·mL⁻¹时有明显的荧光,当DNA浓度为0.000 1 pg·μL⁻¹、菌悬液浓度为1 CFU·mL⁻¹时有清晰的检测线,可见本研究的 RPA-CRISPR/Cas12a 检测体系具有较高的灵敏度。2010年熊亮斌等^[6]建立了可快速检测瓜类果斑病菌 DAS-Dot-ELISA 检测法,其灵敏度达1.9×10⁵ CFU·mL⁻¹。回文广等^[9]先后设计了 TaqMan 探针,建立了果斑病菌的实时荧光 PCR 检测技术体系,检测灵敏度达10³~10⁴ CFU·mL⁻¹;杨玉文等^[10]建立的基于多重 PCR 技术的西瓜噬酸菌分组检测方法对西瓜噬酸菌菌悬液分组的检测灵敏度为10⁵ CFU·mL⁻¹。上海市农业科学院发明的一种瓜类细菌性果斑病菌的 RPA 检测引物、探针及检测方法的专利中,反应条件36~38℃恒温孵育反应管15~20 min,将核酸检测试纸条的测试端插入混合后的反应管中,反应2~5 min,其灵敏度为2.5×10⁴ CFU·mL⁻¹^[21]。相较于之前的研究,RPA-CRISPR/Cas12a 检测时间更短,灵敏度更高,假阳性率极低,且使用上更加快速、便携,更适用于田间和基层实验室的检测需求。

RPA-CRISPR/Cas12a 可以直接检测植物组织(茎、子叶)研磨液和种子浸泡液中的病菌,减少了DNA提取的环节,缩短了检测时间。该技术的检测灵敏度高,可以有效检出600粒健康种子中的1粒带菌种子,实现种子带菌的高通量快速检测。该技术为种植户、基层植保工作人员和种子生产企业等提供了一种简单高效的瓜类细菌性果斑病检测方法。

参考文献

[1] 费诺亚,陈华民,杨玉文,等.瓜类细菌性果斑病国外研究新进展[J].中国瓜菜,2022,35(7):1-5.
[2] Webb R E, Goth R W. A seedborne bacterium isolated from watermelon[J]. Plant Disease Report, 1965, 49(10): 818-821.
[3] 张兴平, Rhodes B B. 一种毁灭性的西瓜新病害:细菌性果实

- 腐斑病[J]. 中国西瓜甜瓜, 1990, 3(2): 44-45.
- [4] 季苇芹, 叶云峰, 张爱萍, 等. 我国瓜类细菌性果斑病研究新进展[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(9): 1-8.
- [5] 袁瑞帆, 王福红, 夏咏. 新疆西瓜甜瓜产业发展现状及对策建议[J]. 食品安全导刊, 2024(29): 176-179.
- [6] 熊亮斌, 刘箐, 王天昌, 等. 改良 DAS-Dot-ELISA 检测西瓜细菌性果斑病菌[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1551-1556.
- [7] Walcott R R, Gitaitis R D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction[J]. Plant Disease, 2000, 84(4): 470-474.
- [8] 张祥林, 伍永明, 王翀, 等. 西瓜细菌性果斑病菌的 16S rDNA 序列分析及特异性引物的设计[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 225-231.
- [9] 回文广, 赵廷昌, Schaad N W, 等. 哈密瓜细菌性果斑病菌快速检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2495-2501.
- [10] 杨玉文, 乔培, 刘德华, 等. 基于多重 PCR 技术的西瓜噬酸菌分组检测方法及其应用[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 211-219.
- [11] 吴秀芹, 杨樱子, 罗金燕, 等. 利用环介导等温扩增方法快速检测瓜类细菌性果斑病菌和番茄细菌性溃疡病菌[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1235-1241.
- [12] Piepenbur G O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [13] Yonesak T, Ryo Y, Minagawa T, et al. Purification and some of the functions of the products of bacteriophage T4 recombination genes, *uvsX* and *uvsY*[J]. European Journal of Biochemistry, 1985, 148: 127-134.
- [14] Rohrman B A, Richa Rds-Kortum R R. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA[J]. Lab on a Chip, 2012, 12(17): 3082-3088.
- [15] Kersting S, Rausch V, Bier F F, et al. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis[J]. Malaria Journal, 2014, 13: 99.
- [16] 董铮, 赵振兴, 范奇璇, 等. 基于 RPA-CRISPR/Cas12a 的番茄花叶病毒可视化检测方法的建立[J]. 植物保护, 2024, 50(4): 235-241.
- [17] 蒲姝旸, 张瑾逸, 暴晓阳, 等. 梨火疫病病菌的 RPA 快速检测技术的研发[J]. 植物保护, 2024, 50(4): 242-249.
- [18] 王晨薇, 汪小福, 魏巍, 等. 西瓜细菌性果斑病菌现场快速双模荧光 RPA 检测方法的建立[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(7): 1519-1528.
- [19] 刘晓婷, 李鹏, 左柯铭, 等. 基于 CRISPR-Cas12a 核酸检测研究进展[J]. 动物医学进展, 2024, 45(8): 94-98.
- [20] Tian Q, Feng J J, Hu J, et al. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by real-time PCR with propidium monoazide[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 35457.
- [21] 上海市农业科学院. 一种瓜类细菌性果斑病菌的 RPA 检测引物、探针及检测方法: 202111666812.6[P]. 2022-04-05.