

• 论 著 •

RAA-CRISPR 双模式平台在肺炎支原体快速检测中的应用*

杨泓钊, 罗洁, 唱凯[△]

陆军军医大学第一附属医院检验科, 重庆 400038

摘要:**目的** 建立基于重组酶介导等温核酸扩增(RAA)、CRISPR/Cas12a 及侧向流层析试纸条(LFIA)技术的肺炎支原体(MP)双模式快速检测平台。**方法** 靶向 MP P1 基因保守区设计 RAA 引物及 crRNA。系统优化 RAA 反应时间、CRISPR/Cas12a 体系核心组分浓度及 CRISPR 反应时间等关键参数,通过实时荧光监测/LFIA 裸眼可视化判读双模式,评估该平台和分析性能:灵敏度(梯度稀释 MP 质粒模板,10⁻¹~10⁵ copy/ μ L)、特异度(7 种呼吸道病原体包括人型支原体、肺炎衣原体等)及临床一致性[以实时荧光定量 PCR(qPCR)为金标准验证 25 例咽拭子样本]。**结果** 建立的 RAA-CRISPR 双模式平台最佳反应条件为 RAA 反应时间 15 min、Cas12a 80 nmol/L、crRNA 90 nmol/L、CRISPR 反应时间 40 min。荧光模式检测限(LOD)为 1 copy/ μ L,检出率达 98.3%(59/60,95%CI:94.7%~99.8%);LFIA 模式 LOD 为 1 copy/ μ L,检出率达 96.7%(58/60,95%CI:88.4%~99.5%);与所有测试病原体无交叉反应。临床验证结果显示,该平台检测结果与 qPCR 完全一致,灵敏度、特异度及总符合率均为 100.0%,检测时间较短,全程 $\leq$ 55 min。**结论** 建立的 RAA-CRISPR 双模式平台兼具超敏性、可视化及操作便捷性,可为 MP 感染的基层即时检验(POCT)提供高效解决方案。

关键词:肺炎支原体; 重组酶介导等温核酸扩增; CRISPR/Cas12a; 侧向流层析试纸条; 可视化检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.22.002 中图法分类号:R446.5;R375.2

文章编号:1673-4130(2025)22-2698-07 文献标志码:A

Application of RAA-CRISPR dual-mode platform in rapid detection of Mycoplasma pneumoniae*

YANG Hongzhao, LUO Jie, CHANG Kai[△]

Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To establish a dual-mode detection platform for Mycoplasma pneumoniae (MP) based on recombinase aided amplification (RAA), CRISPR/Cas12a, and lateral flow immunochromatographic assay (LFIA). **Methods** RAA primers and crRNA were designed to target the conserved region of the MP P1 gene. Key parameters including RAA reaction time, core component concentrations of the CRISPR/Cas12a system, and CRISPR reaction time were systematically optimized. The analytical performance of the platform was evaluated via dual-mode of real-time fluorescence monitoring and LFIA naked-eye visual interpretation. Sensitivity was assessed using serially diluted MP plasmid templates (10⁻¹–10⁵ copy/ μ L), specificity against seven respiratory pathogens, including Mycoplasma hominis and Chlamydia pneumoniae, and clinical concordance with 25 throat swab samples validated by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) as the gold standard. **Results** The optimal reaction conditions of the established RAA-CRISPR dual-mode platform were determined as follows: RAA reaction time of 15 min, Cas12a concentration of 80 nmol/L, crRNA concentration of 90 nmol/L, and CRISPR reaction time of 40 min. The limit of detection (LOD) for the fluorescence mode was 1 copy/ μ L with a detection rate of 98.3% (59/60, 95%CI: 94.7%–99.8%). For the LFIA mode, the LOD was 1 copy/ μ L with a detection rate of 96.7% (58/60, 95%CI: 88.4%–99.5%). No cross-reactivity was observed with any tested pathogens. Clinical validation results showed that the platform's detection re-

* 基金项目: 国家优秀青年科学基金项目(82122042); 国家自然科学基金面上项目(82372352); 重庆市杰出青年科学基金项目(CSTB2022NSCQ-JQX0007)。

作者简介: 杨泓钊, 男, 硕士研究生在读, 主要从事临床检验及生物传感器研究。 [△] 通信作者, E-mail: changkai0203@tmmu.edu.cn。

sults were consistent with qPCR, with sensitivity, specificity, and overall agreement all reaching 100.0%. The detection time was relatively short, with the total detection time lasting no more than 55 minutes. **Conclusion** The established RAA-CRISPR dual-mode platform combines ultrasensitivity, visual interpretation, and operational simplicity, can provide an efficient solution for point-of-care testing (POCT) of MP infections at primary healthcare settings.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*; recombinase aided amplification; CRISPR/Cas12a; lateral flow immunochromatographic assay; visual detection

肺炎支原体是儿童和青少年社区获得性肺炎的主要病原体, 流行病学研究显示其占病例的 10%~40%, 重症感染可引发坏死性肺炎、呼吸衰竭甚至死亡^[1-3]。早期快速诊断对阻断肺炎支原体感染重症化进程至关重要^[4], 但现有技术难以在保证高灵敏度的同时兼顾检测速度与基层适用性^[5]。目前肺炎支原体感染的临床诊断依赖血清学检测、PCR 及分离培养技术, 但这些方法存在显著局限, 例如, 血清学检测窗口期滞后, 易受既往感染干扰; PCR 虽对靶基因灵敏度极高, 却依赖标准化分子实验室及专业操作, 在基层难以推广; 而分离培养周期长(可达数周)且灵敏度不高, 故常规诊断价值有限^[6]。近年发展的重组酶介导等温核酸扩增(RAA)技术可在 37℃ 恒温条件下 30 min 内完成靶基因扩增, 摆脱了 PCR 对热循环仪的依赖^[7-8]。CRISPR-Cas 系统则通过 crRNA 引导靶序列特异度识别, 并激活反式切割活性, 实现核酸信号指数级放大^[9-12]。尽管基于 CRISPR 系统核酸酶(如 Cas12a、Cas12b、Cas13a 和 Cas14)的检测方法快速发展, 但多局限于单一检测模式, 难以适配多元化的应用场景需求^[13-16]。为此, 本研究构建 RAA-CRISPR/Cas12a[实时荧光监测/侧向流层析试纸条(荧光/LFIA)]双模式检测平台。该平台核心机制为三级联反应路径: RAA 恒温扩增肺炎支原体 P1 基因靶序列, 扩增产物激活 Cas12a 反式切割活性, 进而通过切割不同探针实现双信号输出。经 crRNA 筛选、CRISPR/Cas12a 系统核心组分浓度与反应时间协同优化, 该平台检测限达 1 copy/ μ L, 全程耗时 $\leq$ 55 min, 为肺炎支原体基层即时检验(POCT)提供了一种超敏、快速且兼具场景适应性的创新解决方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 临床样本 纳入 2025 年 5 月 1 日至 9 月 10 日本院呼吸道门诊 25 例疑似肺炎支原体感染患者的咽拭子样本, 经实时荧光定量 PCR(qPCR)检测确认阳性 15 例、阴性 10 例。本研究经陆军军医大学第一附属医院伦理委员会批准(批准号: KY2025066), 所有参与者或法定代理人均签署知情同意书。

1.1.2 标准质粒 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成包含 7 种呼吸道病原体[肺炎支原体

(MP)、人型支原体(MH)、肺炎衣原体(CP)、肺炎链球菌(SpN)、肺炎克雷伯菌(KP)、流感嗜血杆菌(HI)、甲型流感病毒(IAV)]目标基因片段的质粒。

1.2 仪器与试剂 LbCas12a 蛋白、NEBufferTM r2.1 购自美国 New England Biolabs 公司; QIAamp DNA Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司; RAA 扩增试剂盒购自江苏奇天基因生物科技有限公司; Cas12/13 专用核酸检测试纸条购自北京宝盈同汇生物技术有限公司; 20 bp DNA Ladder、6 $\times$ 上样缓冲液、TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; Gene-8C 等温荧光检测仪购自杭州奥盛仪器有限公司; 电泳仪、CFX96 qPCR 仪、化学发光成像系统 ChemiDoc XRS 均购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 使用 QIAamp DNA Mini Kit 按说明书提取咽拭子样本总 DNA。提取产物用无菌超纯水稀释 5 倍, 保存于 -20℃ 直至检测。

1.3.2 RAA 引物设计与合成 从 GenBank 获取 MP 参考菌株 M129 (ATCC 29342) 的 P1 基因序列 (GenBank 登录号: U00089.2, nt 180,858-185,741), 经 ClustalW 多序列比对筛选保守区域。依据 RAA 引物设计原则 (Primer Premier 6 设计, Primer-BLAST 验证特异度, OligoEvaluatorTM 评估二级结构) 和 crRNA 设计原则 (GC 占 40%~60%、NU-PACK 预测规避二级结构、BLAST 排除 $\geq$ 15 bp 非靶标同源序列) 设计引物及 crRNA, 最终序列由生工生物合成(表 1)。

1.3.3 RAA-CRISPR/Cas12a 荧光检测体系的可行性验证及 crRNA 筛选 可行性验证: 以 MP 的 DNA 质粒标准品 (10^5 copy/ μ L) 为模板, 使用 1.3.2 设计好的 RAA 引物进行扩增。RAA 反应体系(总体积 40 μ L) 包含 25 μ L 反应缓冲液、RAA-F/RAA-R (10 μ mol/L) 各 2 μ L 及 11 μ L 纯化水。体系混匀后转移至基础反应单元, 依次加入 5 μ L 乙酸镁溶液和 5 μ L MP 质粒标准品; 37℃ 反应 40 min。取 5 μ L 扩增产物进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析。crRNA 筛选实验: 取 RAA 产物加入 CRISPR/Cas12a 荧光检测体系(总体积 20 μ L), 含 2 μ L LbCas12a 蛋

白(800 nmol/L)、2 μ L NE Buffer™ r2. 1、2 μ L crRNA1 或 crRNA2(600 nmol/L)、2 μ L FQ 探针(4 μ mol/L)、2 μ L RAA 产物及 10 μ L 纯化水。以无菌水为阴性对照($n=3$)。Gene-8C 等温荧光检测仪检

测方法:37 $^{\circ}$ C 预热 10 s,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,每 15 秒采集 FAM 通道荧光。以反应前 15 s 荧光均值为基线,将实时信号扣除基线后,获得归一化的相对荧光单位(RFU)用于后续分析。

表 1 引物、crRNA、探针序列

名称	序列(5′-3′)	长度(nt)
RAA-F	CTTTAACAATAACCGCTGGTTTGAATATGTA	31
RAA-R	CTACTAAGTTCAGGTTGCTTTCAAGTTCAT	30
PCR-F	TATGTACCACGGATGGCAGT	20
PCR-R	ACGGTAGCGGTATCACCCAT	20
crRNA1	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGCGGGUACCAUUACCAUGGGUG	43
crRNA2	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAAUAUGUACCACGGAUGGCAGU	43
FQ 探针	FAM-TTTATTTTATT-BHQ1	11
FB 探针	FAM-TTTTTTTTATTTTTTTT-Biotin	15

1.3.4 RAA 扩增时间及 crRNA 浓度优化 RAA 扩增时间优化:以 MP 质粒(10^5 copy/ μ L)为模板,按 1.3.3 进行 RAA 扩增,设置时间梯度(10、15、20、25 min),每组设阴性对照($n=3$),通过 Gene-8C 监测 RFU 值。Cas12a 及 crRNA 浓度优化(棋盘格法):基于 RAA 扩增时间的优化结果,固定体系其他组分,分别测试 crRNA1 终浓度(30、60、90、120、150 nmol/L)和 Cas12a 终浓度(20、40、60、80、100 nmol/L)组合,体系步骤同 1.3.3。每组设 3 个重复,通过 Gene-8C 监测 RFU 值。

1.3.5 RAA-CRISPR/Cas12a 荧光检测体系的灵敏度和特异度分析 灵敏度分析:将 MP 质粒 10 倍梯度稀释(0.1、1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 copy/ μ L),按优化条件检测($n=3$,阴性对照为无菌水),确定信号临界点。依据临床和实验室标准化协会(CLSI)EP17-A2 指南^[17]进行 LOD 验证:在初步确定的临界范围附近,选择包含预设阳性、临界阳性及阴性的浓度,进行 3 批次独立检测,每批次各浓度重复 20 次。通过 Gene-8C 监测 RFU 值。特异度验证:取 1.1.2 制备的 7 种呼吸道病原体质粒稀释至 10^5 copy/ μ L。按优化条件检测($n=3$,阴性对照为无菌水)。通过 Gene-8C 监测 RFU 值。

1.3.6 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 检测体系建立及反应时间优化 体系构建:RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 体系(总体积 20 μ L)含以下组分,即 2 μ L Cas12a 蛋白(800 nmol/L)、2 μ L NE Buffer™ r2. 1、2 μ L crRNA1 (900 nmol/L)、2 μ L FB 探针(4 μ mol/L)、2 μ L RAA 产物及 10 μ L 纯化水。将反应体系于 37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min。取 5 μ L 反应产物,与 45 μ L 纯化水 10 倍稀释后,滴加至试纸条加样区,室温

孵育 2 min 判读(阳性:T/C 线均显色;阴性:仅 C 线显色)。CRISPR 反应时间优化:以 MP 质粒(10^2 copy/ μ L)为模板,测试 CRISPR 时间梯度(30、35、40、45、50 min),每组以无菌水为阴性对照。观察试纸条显色情况。

1.3.7 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 体系的灵敏度与特异度验证 灵敏度分析:将 MP 质粒 10 倍梯度稀释(0.1、1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 copy/ μ L),按优化条件检测(以无菌水作阴性对照)。确定信号临界点。依据 CLSI EP17-A2 指南进行 LOD 验证:在初步确定的临界范围附近,选择包含预设阳性、临界阳性及阴性的浓度水平,进行 3 批次独立检测,每批次各浓度重复 20 次,由 2 名经培训的操作者盲法判读试纸条显色结果。特异度验证:取 1.1.2 制备的 7 种呼吸道病原体质粒稀释至 10^3 copy/ μ L。按优化条件检测(阴性对照为无菌水),判读试纸条显色结果。

1.3.8 RAA-CRISPR/Cas12a(荧光/LFIA)检测体系的临床样本性能验证 取 25 份临床咽拭子样本,按 1.3.1 提取 DNA,使用优化后的 RAA-CRISPR/Cas12a(荧光/LFIA)体系对 DNA 样本进行检测。荧光模式的 RFU 阈值基于 LOD 浓度进行 20 次重复检测确定(RFU 阈值=均值-3 $\times$ 标准差)。以 qPCR 为金标准验证:使用 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒,25 μ L 体系含 2 $\times$ 预混液 12.5 μ L、PCR-F/PCR-R (0.4 μ mol/L)各 1 μ L、DNA 样本 2 μ L,以及纯化水 8.5 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s;45 个循环(95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s)。以 Ct 值 ≤ 35 为阳性。以 qPCR 结果分别计算荧光法与 LFIA 法检测临床样本的灵敏度与特异度。灵敏度(%)= 真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$;特异度(%)= 真阴性例数 /

(真阴性例数+假阳性例数)×100%。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism v. 10. 0. 2 分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组对照间比较采用单因素方差分析。95%CI 采用 Clopper-Pearson 法计算。以 *P* < 0. 05 为差异有统计学意义。

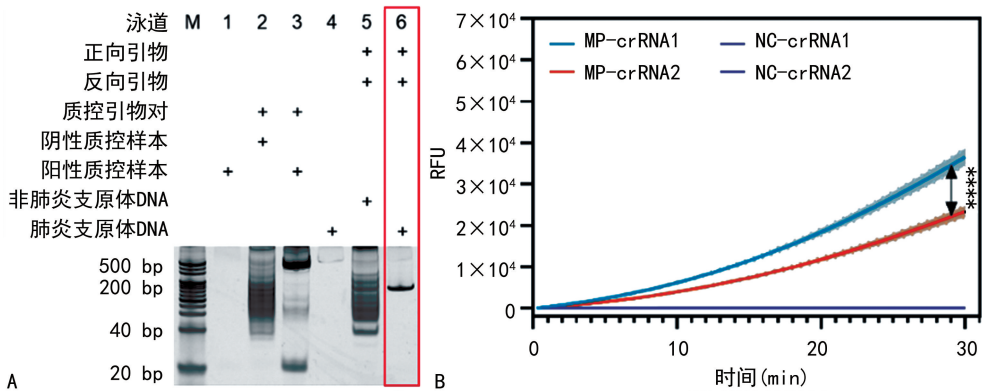
2 结 果

2.1 RAA-CRISPR/Cas12a 荧光检测体系可行性验证及 crRNA 筛选 体系可行性验证结果显示(图 1A): 泳道 6(MP 质粒+MP 引物)可见单一清晰目标条带(164 bp),而其余对照组均无特异度扩增条带,表明 RAA 体系可特异度扩增目标片段。crRNA 切割活性筛选结果显示(图 1B): crRNA1 引导的 Cas12a 反式切割产生显著高于 crRNA2 的荧光信号(*P* < 0. 05),阴性对照组荧光强度未显著升高,表明 crRNA1 对靶序列的识别切割效率更优,故选定为后续体系的核心元件。

2.2 RAA-CRISPR/Cas12a 荧光检测体系反应条件优化 不同 RAA 扩增时间对荧光信号的影响见图 2A。15 min 信号强度显著高于 10 min 组(*P* < 0. 05),与 20 min 组、25 min 组差异无统计学意义(*P* > 0. 05)。同时,15 min 组的背景信号显著低于 20 min 组、25 min 组,差异有统计学意义(*P* < 0. 05),表

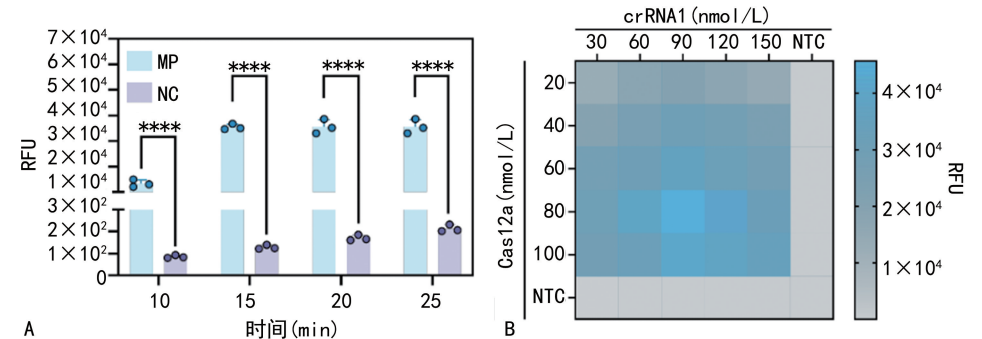
明 15 min 为可实现高信噪比检测的最佳扩增时间。CRISPR/Cas12a 浓度优化结果见图 2B。Cas12a 终浓度为 80 nmol/L、crRNA1 为 90 nmol/L 时,荧光强度达峰值,较次优组合(100 nmol/L Cas12a 和 90 nmol/L crRNA1)提升 12%。浓度过高或过低均导致信号衰减。

2.3 RAA-CRISPR/Cas12a 荧光检测体系灵敏度和特异度 灵敏度测试结果显示(图 3A),≥1 copy/μL 组荧光信号较阴性对照组显著增强(*P* < 0. 05),0. 1 copy/μL 组荧光信号与阴性对照组差异无统计学意义(*P* > 0. 05),检测临界点位于 1 copy/μL 附近。LOD 验证结果显示,在 1 copy/μL 浓度下检出率达 98. 3%(59/60,95%CI:94. 7%~99. 8%);0. 5 copy/μL 水平,检出率为 13. 3%(8/60,95%CI:6. 0%~23. 0%);阴性对照未检出(0/60,95%CI:0~6. 0%)。Probit 回归计算得 LOD_{95%} = 0. 93 copy/μL(95%CI:0. 85~1. 00 copy/μL),故 LOD 确定为 1 copy/μL,基于此计算的 RFU 检测阈值为 4 683. 14。特异性验证结果显示(图 3B):仅 MP 组触发快速荧光响应(RFU 峰值>40 000),与其他病原体差异有统计学意义(*P* < 0. 05);其他病原体组荧光信号与阴性对照相当,差异无统计学意义(*P* > 0. 05)。这表明该检测体系对 MP 具有严格特异度。



注:A为MP质粒RAA扩增产物的PAGE电泳分析(12%胶,110 V,50 min),泳道M为DNA Marker;B为crRNA1/crRNA2引导的Cas12a反式切割荧光动力学曲线(37℃,λ_{ex/em}=485/535 nm);*****P* < 0. 000 1。

图1 RAA-CRISPR/Cas12a体系可行性验证及crRNA筛选

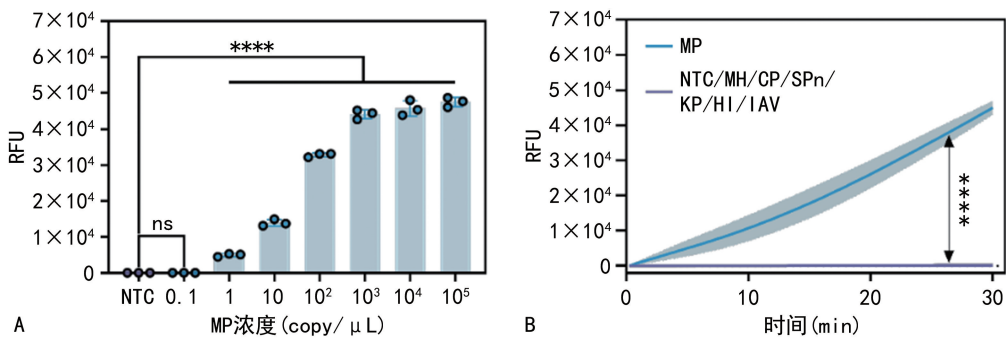


注:A为RAA扩增时间优化荧光强度柱状图;B为Cas12a和crRNA1各摩尔浓度组合条件下荧光强度热图;*****P* < 0. 000 1。

图2 RAA-Cas12a体系反应条件优化

2.4 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 检测体系反应时间优化 CRISPR 反应时间优化结果显示(图 4A),在 30~50 min 的时间梯度内,40 min 时阳性样本组 T

线首次出现肉眼可见红色条带,阴性对照组 T 线无显色,表明 40 min 是实现 T 线显色与低背景信号的最佳反应时间。

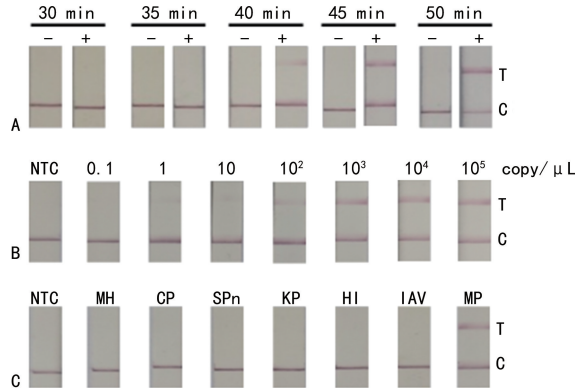


注:A 为 RAA-CRISPR/Cas12a 体系灵敏度检测荧光强度柱状图;B 为 RAA-CRISPR/Cas12a 体系特异性验证荧光动力学曲线;**** $P < 0.0001$ 。

图 3 RAA-CRISPR/Cas12a 体系性能验证

2.5 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 检测体系的灵敏度和特异性 灵敏度测试结果显示(图 4B), ≥ 1 copy/μL 样本在 T 线出现淡红色条带,0.1 copy/μL 及阴性对照组 T 线无显色,检测临界点在 1 copy/μL 附近。LOD 验证显示,在 1 copy/μL 浓度下检出率达 96.7%(58/60,95%CI:88.4%~99.5%);0.5 copy/μL 水平,检出率为 6.7%(4/60,95%CI:2.6%~15.9%);阴性对照均为检出(0/60,95%CI:0~5.0%)。Probit 回归计算得 $LOD_{95\%} = 0.97$ copy/μL(95%CI:0.88~1.06 copy/μL)。故 LOD 确定为 1 copy/μL。特异性验证结果显示(图 4C),仅 MP 组在 T 线产生红色条带;其余病原体组及阴性对照组 T 线无显色且 C 线正常。结果证实体系对 MP 具有严格特异性。

LFIA 模式同步呈现 15 例 T 线显色阳性、10 例无显色。两种模式与 qPCR 结果完全一致,灵敏度、特异性及总符合率均为 100.0%,提示该双模式体系可精准覆盖不同病原体载量的临床样本检测需求。



注:A 为 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 体系反应时间优化实验试纸条显色结果;B 为 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 体系灵敏度检测试纸条显色结果;C 为 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 体系特异性验证试纸条显色结果。

图 4 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 体系反应时间优化及性能验证

2.6 RAA-CRISPR/Cas12a-LFIA 检测体系在临床样本中的验证 为验证临床性能,以 qPCR 为金标准对本研究构建的双模式检测体系进行评价(图 5)。25 例临床咽拭子样本中,qPCR 检出 15 例阳性样本(C_t 值为 24.86~33.01),10 例阴性样本(C_t 值为 36.03~38.48)。本技术荧光模式检出 15 例阳性、10 例阴性,

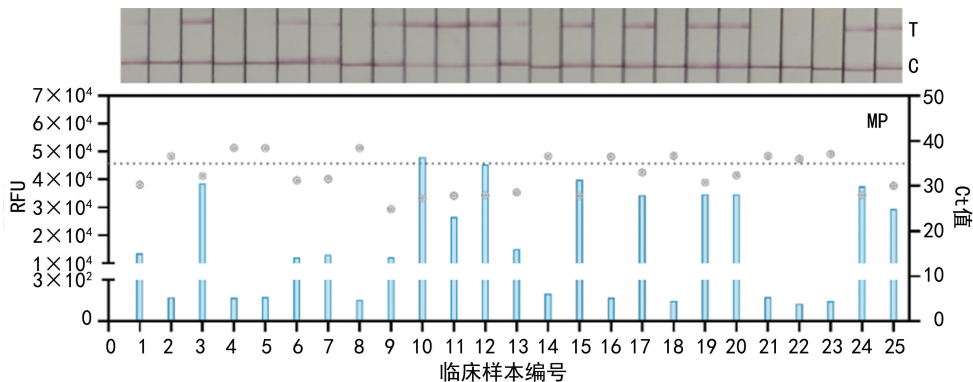


图 5 RAA-CRISPR/Cas12a(荧光/LFIA)与 qPCR 临床样本检测

3 讨 论

本研究构建了一种基于 RAA 与 CRISPR/Cas12a 的双模式检测平台(荧光/LFIA),实现了对 MP 核酸的超灵敏、快速及可视化检测。本平台的核心优势在于其精准的分子设计、高效的多级信号放大,以及对多元化检测场景的适应性。

本平台的卓越性能源于对关键反应环节的系统性优化。针对 MP P1 基因保守区设计的 crRNA1 展现出极高的引导效率,其二级结构稳定性确保了与 Cas12a 蛋白的高亲和力结合,为体系的高特异度奠定了基础。通过优化 Cas12a 与 crRNA 的最佳工作浓度(80 nmol/L Cas12a 及 90 nmol/L crRNA)并将 RAA 扩增时间设定为 15 min,本研究创造了高效的低背景反应体系。尤为重要的是,本平台将检测限推进至 1 copy/ μ L,相较于传统 CRISPR 等温扩增技术(LOD=100 copy/ μ L)灵敏度提升了整整 100 倍^[18]。这一进展主要归因于 RAA 与 CRISPR/Cas12a 体系的高效协同,以及反式切割反应条件的精细调控,显著降低了非特异性背景信号。

本研究的核心创新在于突破了单一检测模式的局限,通过精心设计的双探针系统,实现了从同一 CRISPR 反应中同步输出定量与定性信号。荧光模式凭借其高精确定量能力,适用于医院中心实验室进行病原体载量监测;而 LFIA 模式则提供了无须仪器的裸眼判读方案,完美契合基层医疗机构的床旁即时检测需求。平台性能验证显示,2 种模式对临床样本的检测结果显示与 qPCR 金标准完全一致,灵敏度、特异度及总符合率均达 100.0%,证明了结果的可靠性。这种双模式设计有效地平衡了检测精准性与操作便捷性,使该技术具备了更广泛的应用潜力。

为推动本检测平台的临床应用与转化,还需着力解决以下关键问题:首先,当前研究仅在 25 例咽拭子样本中验证了性能,未来需纳入更大样本量,并扩展至肺泡灌洗液等复杂样本类型,以全面评估其临床应用效能;其次,LFIA 模式在极低样本浓度(1 copy/ μ L)下存在肉眼判读的主观性风险,未来的明确方向是集成智能手机图像分析技术,开发客观的定量算法以提升判读准确性^[19-20];最后,成本是基层推广的关键障碍,解决方案包括采用原核表达系统规模化生产 Cas12a 以降低单价,并开发“all-in-one”冻干试剂以实现常温运输与存储^[21]。通过这些具体的技术迭代,有望将平台转化为一款真正适用于多场景的 POCT 产品。

综上所述,本研究开发的 RAA-CRISPR/Cas12a 双模式平台不仅为 MP 的快速诊断提供了一种强有力的工具,更展示了一种兼具高灵敏度、高特异度与

良好适用性的分子诊断新策略。未来的工作将聚焦于上述局限性的克服,通过自动化、智能化与低成本化的技术迭代,推动该平台成为应对呼吸道传染病的有力武器。

参考文献

- [1] GAVAUD A, HOLUB M, ASQUIER-KHATI A, et al. Mycoplasma pneumoniae infection in adult inpatients during the 2023–2024 outbreak in France (MYCADO): a national, retrospective, observational study[J]. Lancet Infect Dis, 2025, 25(7): 801–812.
- [2] SUN H, WANG W Q, LIN L, et al. Case report: Mycoplasma pneumoniae-associated acute pancreatitis [J]. Front Pediatr, 2024, 12: 1416189.
- [3] LENG M, YANG J, ZHOU J. The molecular characteristics, diagnosis, and treatment of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae in children[J]. Front Pediatr, 2023, 11: 1115009.
- [4] CHEN Q, HU T, WU L, et al. Clinical features and biomarkers for early prediction of refractory Mycoplasma Pneumoniae pneumonia in children[J]. Emerg Med Int, 2024, 2024: 9328177.
- [5] XIAO F, ZHOU J, SUN C, et al. Loop-mediated isothermal amplification coupled with nanoparticle-based biosensor: a rapid and sensitive method to detect Mycoplasma pneumoniae [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 882855.
- [6] GAO L, SUN Y. Laboratory diagnosis and treatment of Mycoplasma pneumoniae infection in children: a review [J]. Ann Med, 2024, 56(1): 2386636.
- [7] XIAO X, YANG X, XU K, et al. DNA fragment fusion and nucleic acid detection by fusion recombinase-aided amplification[J]. Anal Chem, 2025, 97(12): 6538–6547.
- [8] DING X, WANG H, CUI M, et al. Development of a real-time recombinase-aided amplification method to rapidly detect methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Microorganisms, 2022, 10(12): 2351.
- [9] LI H, XIE Y, CHEN F, et al. Amplification-free CRISPR/Cas detection technology: challenges, strategies, and perspectives[J]. Chem Soc Rev, 2023, 52(1): 361–382.
- [10] FENG W, NEWBIGGING A M, 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.
- [11] 潘兴, 林永红, 杨柳, 等. CRISPR/Cas 系统在感染性疾病诊断中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(20): 2542–2548.
- [12] 艾力非热·艾尼瓦尔, 宁雅婷, 徐英春, 等. 基于 CRISPR/Cas 系统的病原体核酸检测技术研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2025, 46(19): 2408–2414.
- [13] RANANAWARE S R, VESCO E K, (下转第 2709 页)

• 论 著 •

外周血 SDC-1、MDA-LDL 与血液透析患者动脉硬化的相关性*

郭立华, 郭 莹, 王 红[△]

吉林大学中日联谊医院肾内科, 吉林长春 130031

摘 要:目的 探讨外周血多配体蛋白聚糖-1(SDC-1)、丙二醛修饰的低密度脂蛋白(MDA-LDL)与血液透析患者动脉硬化(AS)的相关性及其临床预测价值。方法 回顾性选取 2022 年 1 月至 2024 年 6 月该院收治的 125 例血液透析患者作为血液透析组,另选取同期来院体检的 65 例健康者作为对照组。根据是否发生 AS 将血液透析患者分为 AS 组(65 例)和无 AS 组(60 例)。采用酶联免疫吸附试验检测外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平。通过 Spearman 相关分析血液透析患者外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平与肱踝脉搏波速度(baPWV)的相关性,多因素非条件 Logistic 回归确定外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平与血液透析患者 AS 的关系,受试者工作特征(ROC)曲线分析外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平对血液透析患者 AS 的预测效能。结果 与对照组比较,血液透析组外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平升高($P<0.05$)。血液透析患者外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平与左 baPWV、右 baPWV 呈正相关($P<0.05$)。SDC-1 高、MDA-LDL 高均为血液透析患者 AS 的独立危险因素($P<0.05$)。外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平联合预测血液透析患者 AS 的曲线下面积为 0.858,大于外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平单独预测的 0.785、0.778($P<0.05$)。结论 血液透析患者外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平升高与 AS 密切相关,外周血 SDC-1、MDA-LDL 水平联合检测对 AS 的预测效能较高。

关键词:血液透析; 多配体蛋白聚糖-1; 丙二醛修饰的低密度脂蛋白; 动脉硬化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.22.003

中图法分类号:R446.1;R544.1

文章编号:1673-4130(2025)22-2704-06

文献标志码:A

Correlation between peripheral blood SDC-1, MDA-LDL and arteriosclerosis in hemodialysis patients*

GUO Lihua, GUO Ying, WANG Hong[△]

Department of Nephrology, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130031, China

Abstract: Objective To investigate the correlation between peripheral blood syndecan-1 (SDC-1) and malondialdehyde-modified low-density lipoprotein (MDA-LDL) with arteriosclerosis (AS) in hemodialysis patients and their clinical predictive value. **Methods** A total of 125 hemodialysis patients admitted to the hospital from January 2022 to June 2024 as the hemodialysis group, and 65 healthy individuals who underwent physical examination during the same period as the control group. According to whether AS occurred, hemodialysis patients were divided into AS group (65 cases) and non-AS group (60 cases). The levels of SDC-1 and MDA-LDL in peripheral blood were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The correlation between the levels of SDC-1 and MDA-LDL in peripheral blood of hemodialysis patients and brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV) was analyzed by Spearman correlation analysis. Multivariate unconditional Logistic regression was used to determine the relationship between the levels of SDC-1 and MDA-LDL in peripheral blood and AS in hemodialysis patients. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the predictive efficacy of peripheral blood SDC-1 and MDA-LDL levels for AS in hemodialysis patients. **Results** Compared with the control group, the levels of SDC-1 and MDA-LDL in the peripheral blood of the hemodialysis group increased ($P<0.05$). The levels of SDC-1 and MDA-LDL in the peripheral blood of hemodialysis patients were positively correlated with left baPWV and right baPWV ($P<0.05$). High SDC-1 and high MDA-LDL were both independent risk factors for AS in hemodialysis patients ($P<0.05$). The area under the curve for

* 基金项目:吉林省科技计划项目(202037033)。

作者简介:郭立华,女,副主任护师,主要从事肾内科血液透析管理方面研究。 [△] 通信作者, E-mail: w_h01@jlu.edu.cn。