

感染性疾病新方法新技术专题·论著

基于 RPA-CRISPR 的结核分枝杆菌利福平耐药基因突变检测方法的构建和临床应用评价*

赵珍珍¹, 张 艳², 斯艳君¹, 陈 豪¹, 应斌武^{1△}

1. 四川大学华西医院实验医学科/四川大学华西医院临床检验医学研究中心/四川省医学检验临床医学研究中心, 四川成都 610041; 2. 成都市郫都区中医医院检验科, 四川成都 611730

摘要:目的 整合规律成簇间隔短回文重复(CRISPR)序列与其相关效应蛋白(Cas)检测系统、重组酶聚合酶扩增(RPA), 构建针对结核分枝杆菌利福平耐药相关 rpoB 基因突变的快速检测方法。方法 通过文献分析确定 rpoB 基因中的高频突变位点 D516Y(GAC→TAC)、H526D(CAC→GAC)和 S531L(TCG→TTG)为检测靶标, 构建野生型和突变型质粒。设计并筛选 RPA 等温扩增引物, 以及靶向突变位点的 CRISPR-RNA (crRNA), 优化 LbaCas12a 蛋白浓度及反应条件, 验证其反式切割活性和特异性; 整合 RPA 扩增与 CRISPR 检测, 优化扩增时间、模板量, 通过荧光信号差异区分野生型与突变型质粒, 进一步利用扩增管的物理结构建立单管 RPA-CRISPR 检测系统, 改善检测性能。收集结核患者的临床分离菌株, 利用 RPA-CRISPR 反应体系进行 rpoB 目标突变位点检测。结果 利用 BLAST 及 Oligo calc 寡核苷酸属性计算器等在线工具、2% 琼脂糖凝胶电泳筛选出特异性引物 F2/R7(扩增子 289 bp)建立 RPA 扩增体系。针对 3 个目标突变位点, 分别设计了包含 23 nt 间隔序列的 516-TAC-crRNA、22 nt 间隔序列的 526-GAC-crRNA 及 23 nt 间隔序列的 531-TTG-crRNA, 优化 CRISPR-Cas12a 体系, 证实其反式切割活性及突变识别特异性($P < 0.05$), 确定 Cas12a/crRNA 浓度组合为 150/100 nmol/L(516 位点)和 200/50 nmol/L(526/531 位点), 3 个检测体系中的荧光报告基团浓度均为 250 nmol/L。RPA-CRISPR 检测系统的最佳反应条件为 RPA 等温扩增时间为 20 min, DNA 模板及扩增产物加样量均为 5 μ L。利用扩增管的物理结构建立单管 RPA-CRISPR 检测系统, 其能够在 42 $^{\circ}$ C 30 min 内完成检测, 并且检测 3 种突变型质粒灵敏度均为 10^5 copies/ μ L。单管 RPA-CRISPR 方法对 25 例临床分离菌株进行检测, 结果检测到 2 例 rpoB_D516Y 突变、1 例 rpoB_H526D 突变和 8 例 rpoB_S531L 突变, 与全基因组测序(WGS)符合率达 96%。结论 单管 RPA-CRISPR 方法有效避免了气溶胶污染, 具有操作简便、快速高效的特点, 为资源有限条件下的结核分枝杆菌利福平耐药性检测提供了可能性。

关键词: 结核分枝杆菌; 利福平耐药; rpoB 基因; CRISPR-Cas12a; 重组酶聚合酶扩增

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2026. 15. 003

中图法分类号: R446. 5

文章编号: 1673-4130(2026)15-1809-08

文献标识码: A

Construction and clinical evaluation of an RPA-CRISPR-based method for detecting rifampicin resistance gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis**

Zhao Zhenzhen¹, Zhang Yan², Si Yanjun¹, Chen Hao¹, Ying Binwu^{1△}

1. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University/Clinical Laboratory Medicine Research Center, West China Hospital, Sichuan University/Sichuan Clinical Research Center for Laboratory Medicine, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Traditional Chinese Medicine Hospital of Pidu District, Chengdu, Sichuan 611730, China

Abstract: Objective To develop a rapid detection method targeting rpoB gene mutations associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) by integrating clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated proteins (Cas12a) and recombinase polymerase amplification (RPA). **Methods** High-frequency mutation loci within rpoB [D516Y(GAC→TAC), H526D (CAC→GAC), and S531L (TCG→TTG)] were identified through literature analysis, and wild-and mutant-type plasmids were constructed. RPA primers were designed and screened, and CRISPR-RNAs (crRNAs) targeting the mu-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(82102484); 四川大学华西医院学科卓越发展 1·3·5 工程项目(高端人才支持计划)(ZYGD23036)。

作者简介: 赵珍珍, 女, 副主任技师, 主要从事结核病分子诊断研究。△ 通信作者, E-mail: yingbinwu@scu.edu.cn。

tations were designed. LbaCas12a protein concentration and reaction conditions were optimized to validate CRISPR system trans-cleavage activity and specificity. The RPA-CRISPR system was integrated by optimizing amplification time and template input and fluorescence signal differences to distinguish wild-type and mutant plasmids. A single-tube RPA-CRISPR system was developed using the physical structure of amplification tubes to enhance performance. Clinical isolates from tuberculosis patients were tested using the single-tube RPA-CRISPR system. **Results** Specific primers (F2/R7, amplicon 289 bp) were selected by using BLAST, Oligo Calc, and 2% agarose gel electrophoresis. Three crRNAs [516-TAC-crRNA (23 nt), 526-GAC-crRNA (22 nt), and 531-TTG-crRNA (23 nt)] were designed. Optimized CRISPR-Cas12a systems were demonstrated trans-cleavage activity and mutation-specific recognition ($P < 0.05$), with Cas12a/crRNA concentrations of 150/100 nmol/L (516 site) and 200/50 nmol/L (526/531 sites), and 250 nmol/L fluorescent reporter. The optimal RPA-CRISPR conditions included 20 min RPA amplification and 5 μ L DNA template/amplicon input. The single-tube system achieved detection within 30 min at 42 $^{\circ}$ C, with sensitivity of 10^5 copies/ μ L for all three mutants. Testing 25 clinical isolates with RPA-CRISPR assay revealed 2 rpoB_D516Y, 1 rpoB_H526D, and 8 rpoB_S531L mutations, showing 96% concordance with whole-genome sequencing (WGS). **Conclusion** The single-tube RPA-CRISPR method minimizes aerosol contamination, offers simplicity and rapidity, and holds potential for rifampicin resistance detection in MTB under resource-limited settings.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; rifampicin resistance; rpoB gene; CRISPR-Cas12a; recombinase polymerase amplification

据世界卫生组织(WHO)全球结核病报告,2023 年全球估算的结核病患病人数约为 1 080 万,新诊断病例 820 万^[1]。利福平是抗结核治疗中的核心药物,WHO 建议对所有经细菌学证实的结核病患者进行利福平耐药性检测,目前实验室的检测策略受到基础设施不足及专业技术要求较高等多方面的限制,耐药性检测的覆盖率仍显不足。全球利福平耐药结核病(RR-TB)患者估计约 40 万,登记治疗的人数仅为 17.6 万,得到诊断和治疗的患者仅占到 44%^[1]。

规律成簇间隔短回文重复(CRISPR)序列与其相关效应蛋白(Cas)构成的 CRISPR-Cas 系统,作为一种新兴的分子诊断技术,因其高效、快速的优势在病原体检测领域备受关注^[2]。CRISPR-Cas 利用 CRISPR-RNA(crRNA)特异性识别靶核酸序列,激活 Cas 蛋白的核酸酶切割活性,进而将这一过程转化为可检测的荧光或化学信号^[3]。为提高检测灵敏度,CRISPR-Cas 系统常与核酸扩增技术联用。重组酶聚合酶扩增(RPA)是一种高效的等温扩增技术,通过重组酶、单链 DNA 结合蛋白和链置换 DNA 聚合酶的共同作用,可在恒定温度下实现靶序列的高效扩增^[4]。CRISPR-Cas 系统和 RPA 扩增技术均具备反应速度快、设备要求低等显著优势,其联合应用在核酸检测领域中快速发展,如 DETECTR^[5] 和 HOLMES^[6] 等平台。因此,本研究整合 RPA 及 CRISPR-Cas 系统,构建针对结核分枝杆菌利福平耐药相关 rpoB 基因突变的快速检测方法,进一步评估该方法的实际临床应用价值,以期为利福平耐药筛查的广泛开展提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 基于文献报道,结核分枝杆菌(MTB)利福平耐药相关突变主要集中于 rpoB 基因的利福平耐药决定区^[7-8],本研究针对高频突变位点 rpoB_D516Y(GAC→TAC)、rpoB_H526D(CAC→GAC)和 rpoB_S531L(TCG→TTG)构建基于 CRISPR 的检测体系。从 NCBI 数据库获取 MTB H37Rv 菌株的 rpoB 基因参考序列(NC_000962.3),选取覆盖 81 bp 利福平耐药决定区的 450 bp 作为靶序列,分别克隆至大肠埃希菌 pUC57 质粒,构建 3 154 bp 的野生型和突变型重组质粒。突变型通过定点插入设计基因片段实现。质粒由深圳易致生物合成,采用天根公司试剂盒在生物安全柜内完成质粒提取。该体系为耐药突变检测提供标准化模板。

1.2 方法

1.2.1 构建 RPA 等温扩增体系 利用 Primer3 Plus 在线软件,以覆盖 81 bp 利福平耐药决定区的 450 bp 基因片段为靶序列,设计 RPA 扩增引物。经 BLAST 和 Oligo calc 分析特异性并排除二级结构后,由生工生物工程股份有限公司合成。通过 2%琼脂糖凝胶电泳筛选最佳扩增产物对应的引物。采用深圳易致生物冻干型 RPA 试剂盒,配制 20 μ L 体系:向含有酶的冻干粉反应管中加入 10 μ L 的 Rehydration Buffer (2 $\times$)、0.5 μ L 浓度为 20 μ mol/L 的上游引物、0.5 μ L 浓度为 20 μ mol/L 的下游引物及 1~7 μ L 的 DNA 模板,ddH₂O 将反应体系补足至 18 μ L,最后加入 2 μ L 的 Starter(10 $\times$),39 $^{\circ}$ C 反应 40 min。

1.2.2 构建 CRISPR-Cas12a 检测体系 基于

Cas12a 特异性识别 5'端富含胸腺嘧啶(T)的前间隔序列邻近基序(PAM)的特征^[9],在突变位点附近筛选 PAM 序列,设计含 20~24 nt 间隔序列及固定发卡结构的 crRNA。采用 LbaCas12a 构建 20 μL 反应体系:含 1× Cas12a Reaction Buffer、50 nmol/L Cas12a、50 nmol/L crRNA、120 nmol/L 荧光报告基团及适量 RPA 产物,37 ℃反应 60 min(每 min 采集荧光)。通过对比缺失关键组分(蛋白、crRNA、模板、报告基团)及野生型/突变型质粒的荧光差异,验证体系反式切割活性与特异性,并优化组分浓度,最终建立可区分 D516Y、H526D、S531L 突变位点的 CRISPR 检测系统。

1.2.3 单管 RPA-CRISPR 检测体系的构建 整合 RPA 扩增与 CRISPR-Cas12a 检测,并对 RPA 扩增时间、RPA 模板加样量、CRISPR-Cas12a 扩增产物加样量进行优化,建立针对 D516Y、H526D 和 S531L 突变位点的两步法 RPA-CRISPR 检测体系。为避免气溶胶污染,进一步利用扩增管的物理结构,将 RPA 扩增体系与 CRISPR-Cas12a 反应体系在单管内进行空间分隔,通过比较不同组合方式下的荧光信号差异,确定单管内反应体系的最佳构建方案,并验证其识别突变靶点的特异性、评价其灵敏度。

1.2.4 临床分离菌株的 RPA-CRISPR 检测 收集结核病患者样本的临床分离菌株,利用已建立的单管 RPA-CRISPR 反应体系进行 rpoB 基因目标突变位点检测。与 WGS 测序结果进行一致性比较,对于结果不一致的样本,进一步采用靶向测序(tNGS)验证。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析。绘图使用 GraphPad Prism 8.0 软件。采用双尾 Mann-Whitney U 检验和 Fisher 精确检验法比较 CRISPR-Cas12a 系统检测的荧光信号值差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RPA 等温扩增体系的建立 利用 Primer3 Plus 设计 RPA 引物,应用 BLAST 及 Oligo calc 寡核苷酸属性计算器优选出 10 组候选引物,具体序列见表 1。2%琼脂糖凝胶电泳显示,F2/R7 引物组合扩增产物在目标区域呈现特异性单一条带(289 bp),无杂带干扰,扩增效率最优,故选定该引物对构建 RPA 扩增体系。

2.2 rpoB 突变 CRISPR-Cas12a 体系构建 rpoB_D516Y(GAC→TAC)突变位点的 PAM 序列为 TTC,据此设计了包含 23 nt 间隔序列的 516-TAC-crRNA;rpoB_H526D(CAC→GAC)的 PAM 序列为 TTG,设计了包含 22 nt 间隔序列的 526-GAC-crRNA;531 突变位点附近未发现合适的 PAM 序列,因此利用其丝氨酸突变(TCG→TTG)后形成的 TTG 作为 PAM 序

列,设计了包含 23 nt 间隔序列的 531-TTG-crRNA。见表 2。

CRISPR-Cas12a 体系验证显示,完整反应组分[Cas12a/crRNA/Reporter (序 列 TTTAATTT)/RPA 产物]可触发显著荧光信号($P<0.001$),缺失任一组分则无活性(图 1)。针对 D516Y、H526D、S531L 突变的 crRNA 能特异性识别突变型质粒,检测突变型质粒的扩增产物时,3 个反应体系的荧光信号均呈现快速上升趋势,而野生型及阴性对照无响应($P<0.05$)(图 1)。此外,经浓度优化,D516Y 体系最佳为 Cas12a 150 nmol/L/crRNA 100 nmol/L, H526D/S531L 体系为 Cas12a 200 nmol/L/crRNA 50 nmol/L,reporter 统一优化至 250 nmol/L。

表 1 针对 450 bp 目标片段设计的 RPA 引物序列	
引物名称	序列(5'-3')
F1	AGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTT
F2	<u>CCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACG</u>
F3	GTACGGTCGGCGAGCTGATCCAAAACCAGATC
F4	CGTACGGTCGGCGAGCTGATCCAAAACCAG
F5	GATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGG
F6	CAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGT
F7	GGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTG
F8	GACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGA
F9	ACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGAT
F10	CCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGAC
R1	GACCTCCAGCCCGGCACGCTCACGTGACAGA
R2	CAGGGGTTTCGATCGGGCACATCCGGCCGTA
R3	TGACCCGCGCTACACCGACAGCGAGCCGAT
R4	GTACACCGACAGCGAGCCGATCAGACCGAT
R5	TACACCGACAGCGAGCCGATCAGACCGATG
R6	ACACCGACAGCGAGCCGATCAGACCGATGT
R7	<u>CACCGACAGCGAGCCGATCAGACCGATGTT</u>
R8	CGTACACCGACAGCGAGCCGATCAGACCGA
R9	GCGTACACCGACAGCGAGCCGATCAGACCG
R10	CGCGTACACCGACAGCGAGCCGATCAGACC

注:添加下划线的引物序列为筛选出的最佳 RPA 引物。

2.3 RPA-CRISPR 检测体系的建立 RPA 扩增时间为 20、30、40 min 时的荧光信号强度差异无统计学意义($P>0.05$),表明 RPA 扩增体系在反应 20 min 时已达到稳定。因此,后续实验中的 RPA 扩增反应时间优化为 20 min。经模板量优化,5 μL DNA 模板使 RPA 扩增产物在 CRISPR-Cas12a 体系中触发最快荧光上升及最高终点信号。进一步优化 PRA 产物加样量,5 μL 时同样获得最优响应,故确定两阶段最

佳加样量均为 5 μ L。见图 2。

2.4 单管 RPA-CRISPR 检测体系的建立 基于上述已建立的 RPA-CRISPR 检测方法,利用扩增管的特殊结构,设计了两种 RPA 扩增和 CRISPR-Cas12a 反应分隔的单管方案,见图 3。两种方案下的荧光信号变化:第 1 种组合方式,即 5 μ L 的 RPA 扩增体系置于管盖、15 μ L 的 CRISPR-Cas12a 反应体系置于管底时的反应动力学及荧光信号强度显著优于第 2 种组合方式($P<0.001$)。因此,采用第 1 种方案建立单管内 RPA-CRISPR 反应体系,实现 RPA 扩增与 CRISPR 检测的时序性高效偶联。进一步比较单管 37、38、39、40、41、42、43 $^{\circ}$ C 反应条件下的荧光信号变

化,发现统一 RPA-CRISPR 检测体系温度至 42 $^{\circ}$ C,反应荧光信号迅速上升,且终点信号值显著高于其温度组,差异有统计学意义($P<0.001$)。进一步优化发现,CRISPR-Cas12a 反应 10 min 即可有效区分 $10^5\sim 10^8$ copies/ μ L 突变型与野生型质粒($P<0.05$)。最终建立 30 min 单管检测体系:RPA 扩增 20 min, Cas12a 检测 10 min,显著提升检测效率。单管 RPA-CRISPR 体系可特异性区分 rpoB D516Y、H526D 和 S531L 3 个突变位点($P<0.001$),灵敏度为 10^5 copies/ μ L($10^5\sim 10^8$ copies/ μ L 显著区分, 10^4 copies/ μ L 不区分)。

表 2 针对目标突变靶点设计的 crRNA 序列

名称	序列(5'-3')
516-TAC-crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU AUGUACCAGAACAAACCCGCGUC
526-GAC-crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU UCGGUCAACCCCGACAGCGGGU
531-TTG-crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU GCGCUGGGGCCCGCGGUCUGUC

注:加粗碱基为 crRNA 的 5'端固定部分。

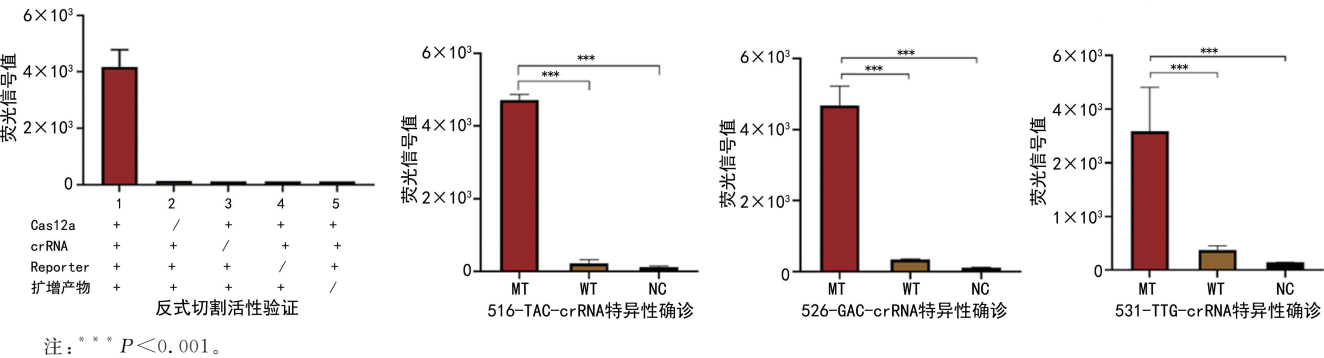


图 1 rpoB 基因突变 CRISPR-Cas12a 体系建立

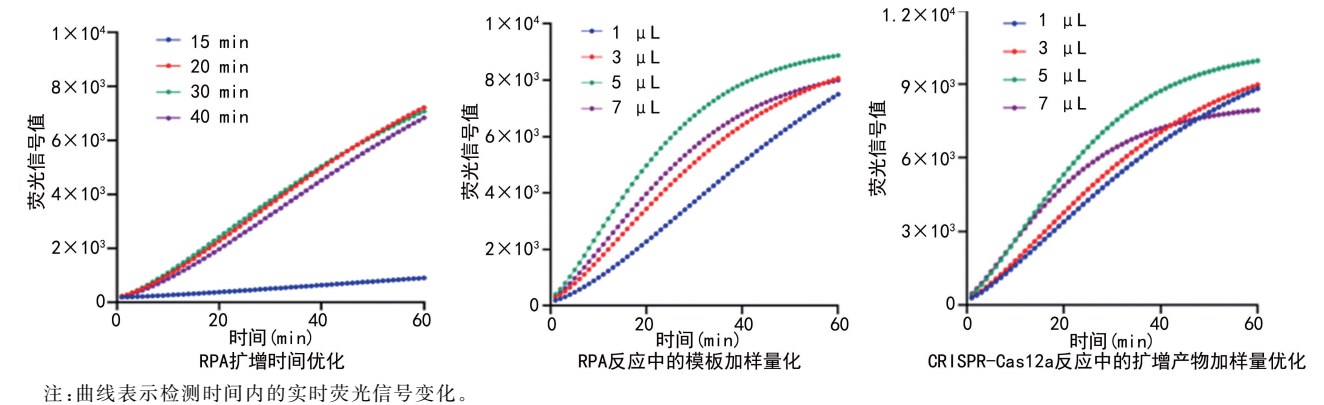


图 2 两步法 RPA-CRISPR 反应体系优化

2.5 临床分离菌株单管 RPA-CRISPR 的检测结果 研究共纳入 25 例临床分离菌株,包括痰液 16 例、肺泡灌洗液 5 例、病理组织 2 例及穿刺液 2 例。采用单管 RPA-CRISPR 方法对 25 例临床分离菌株进行检测,检测到 2 例 D516Y 突变、1 例 H526D 突变

和 8 例 S531L 突变,其余 14 例未检测到上述 3 种突变,见表 3 所。与 WGS 结果相比,总体符合率为 96%。单管 RPA-CRISPR 方法检测 D516Y、H526D、S531L 位点突变的灵敏度均为 100%,见表 4。其中 1 例样本经 RPA-CRISPR 方法检测到 D516Y(GAC $\rightarrow$

TAC)突变,而 WGS 未检出,经 tNGS 复核,证实该位点存在突变,与 RPA-CRISPR 检测结果一致,且该菌株表型药敏试验结果显示利福平耐药。

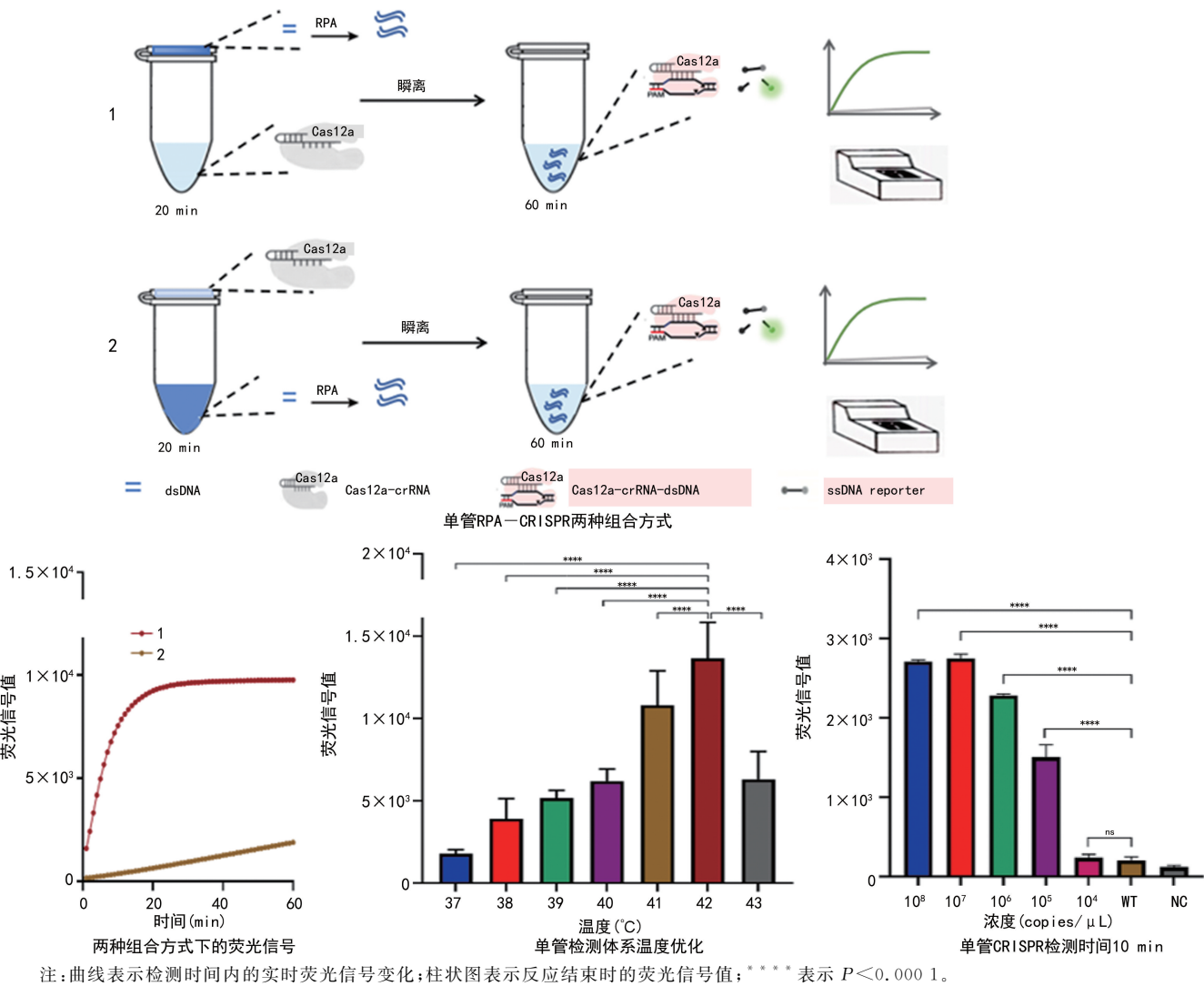


图 3 单管 RPA-CRISPR 检测体系

表 3 单管 RPA-CRISPR 检测 25 例临床分离菌株的终点荧光信号值

菌株编号	516 位点突变检测体系	526 位点突变检测体系	531 位点突变检测体系
1	202.8	145.1	740.6
2	171.9	150.9	124.4
3	129.0	127.2	103.7
4	2 469.0	112.3	96.6
5	128.9	119.2	112.3
6	119.8	133.3	98.8
7	147.1	164.5	124.9
8	134.4	130.0	150.3
9	117.5	134.0	123.3
10	968.7	141.8	133.6
11	154.2	132.2	530.6
12	121.6	121.6	117.5
13	98.9	111.8	464.3
14	98.0	108.2	652.2
15	125.6	116.9	121.9
16	99.2	92.2	555.9

续表 3 单管 RPA-CRISPR 检测 25 例临床分离菌株的终点荧光信号值

菌株编号	516 位点突变检测体系	526 位点突变检测体系	531 位点突变检测体系
17	113.2	128.6	126.0
18	120.7	124.7	121.2
19	124.8	112.8	406.3
20	135.6	138.2	120.3
21	112.6	118.6	685.7
22	106.4	107.4	441.2
23	114.9	796.1	121.1
24	101.6	118.1	110.3
25	118.4	118.1	126.0

表 4 单管 RPA-CRISPR 检测 25 例临床分离菌株的性能指标 (%)

指标	灵敏度(95%CI)	特异度(95%CI)	阳性预测值(95%CI)	阴性预测值(95%CI)
D516Y	100.00(20.65~100.00)	95.83(79.76~99.26)	50.00(9.45~90.55)	100.00(85.69~100.00)
H526D	100.00(34.24~100.00)	100.00(85.69~100.00)	100.00(34.24~100.00)	100.00(85.69~100.00)
S531L	100.00(67.56~100.00)	100.00(81.57~100.00)	100.00(67.56~100.00)	100.00(81.57~100.00)

3 讨 论

结核病是全球范围内的重大公共卫生问题,尤其是耐药结核病的传播,使其防控更加复杂和困难。利福平作为一线抗结核药物,其耐药性的快速检测对临床治疗和疾病控制至关重要。研究表明,结核分枝杆菌的利福平耐药性主要源于 rpoB 基因突变^[10],使利福平与 RNA 聚合酶的结合能力下降,进而导致耐药性产生。因此,快速、准确地检测结核分枝杆菌 rpoB 基因突变对于指导临床用药和遏制耐药结核病的传播具有重要意义。尽管基于结核分枝杆菌培养的表型耐药试验是耐药性检测的金标准,但其耗时长、操作复杂,难以满足临床快速诊断的需求^[11]。分子诊断技术,如 GeneXpert MTB/RIF 和基因测序,虽然提高了检测速度,但存在设备要求高、成本昂贵等问题,限制了其在资源匮乏地区的推广应用^[12]。近年来,CRISPR-Cas 系统凭借其高效性和特异性的优势,已成为核酸检测领域的重要技术突破,为病原体检测和基因突变分析提供了新的技术平台。然而,现有研究多集中于菌种鉴定,针对耐药突变检测的研究较少,亟须开展深入探索以推动其临床应用。本研究基于 CRISPR-Cas12a 系统,结合 RPA 等温扩增技术,针对结核分枝杆菌 rpoB 基因中的关键突变位点,建立了一种简便、快速的 RPA-CRISPR 检测方法,并通过临床分离菌株的检测验证了其准确性,为利福平耐药性筛查的广泛开展提供了新的技术路径。

近年来,多种 Cas 蛋白已被广泛应用于生物传感平台的开发^[6]。其中,CRISPR-Cas12a 系统因其效应蛋白结构简单、仅需单个 crRNA 引导,兼具高特异性、操作便捷和多场景适用性等优势,成为核酸检测领域的核心工具,广泛应用于病原体检测^[13]和单碱基

突变分析^[14-15]。本研究基于 CRISPR-Cas12a 系统构建结核分枝杆菌 rpoB 基因突变检测体系,其核心检测原理是利用 crRNA 引导 Cas12a 蛋白特异性识别并结合目标 DNA 序列,激活 Cas12a 的核酸酶活性,进而切割荧光报告基团产生可检测信号。其中,crRNA 设计是本研究方法建立的关键环节。Cas12a 蛋白结合的 crRNA 间隔序列长度通常为 16~30 nt,其长度与反应特性密切相关^[6]。此外,PAM 序列突变或 crRNA 间隔序列中与 PAM 相邻的 1~6 位种子区域错配会显著抑制 Cas12a 蛋白的反式切割活性^[16]。本研究综合考虑反应活性和特异性,结合 Cas12a 蛋白识别富含 T 的 PAM 序列特性,设计了含 23 nt 间隔序列的 516-TAC-crRNA、22 nt 间隔序列的 526-GAC-crRNA 及 23 nt 间隔序列的 531-TTG-crRNA。结果显示,基于上述 crRNA 构建的 CRISPR-Cas12a 系统在检测突变型质粒时,产生的荧光信号显著高于野生型质粒。与基于 CRISPR-Cas9 建立的 rpoB 基因突变检测方法^[17]相比,本研究采用的 CRISPR-Cas12a 系统仅需设计 crRNA 即可实现对突变靶标的特异性识别,其固有的反式切割活性能够直接产生可检测信号,无需 Cas9 体系所需的额外信号检测手段,实验方案更加简便高效。

利用 RPA 与 CRISPR-Cas12a 相近的最适温度特性,尝试开发一体化核酸检测系统成为近年来研究热点^[18-19]。但由于 Cas12a 的快速顺式切割作用会干扰 RPA 扩增,两者难以兼容^[20]。为此,本研究针对结核分枝杆菌 rpoB 基因突变检测,初步构建了两步法:首先,于 39 ℃进行 20 min RPA 扩增,再将 5 μL 产物转入 37 ℃的 CRISPR-Cas12a 体系进行荧光检测。该两步法在保证检测特异性的同时显著提升了效率。

在基于 CRISPR 的两步法核酸检测中, 因需进行开盖操作, 存在较高的气溶胶污染风险。为解决这一技术问题, 利用扩增管物理结构实现反应体系的空间分隔, 为单管内检测提供了一种有效的技术路径。基于此, 本研究采用单管内空间分隔策略, 通过对 PRA 与 CRISPR-Cas12a 体系组合方式的筛选, 以及反应条件的优化, 成功建立了单管内 RPA-CRISPR 检测方法: 5 μ L 的 RPA 扩增体系置于管盖, 15 μ L 的 CRISPR-Cas12a 反应体系置于管底, 42 $^{\circ}$ C 条件下反应 30 min。该单管内一体化的 RPA-CRISPR 检测方式有效避免了因开盖操作导致的扩增产物污染, 同时简化了操作流程, 缩短了检测时间。本研究采用单管 RPA-CRISPR 法检测 25 例临床菌株样本, 检出 2 例 D516Y 突变、1 例 H526D 突变和 8 例 S531L 突变, 与 WGS 符合率 96%。其中 1 例 WGS 未检出的 516 位点突变, 经 tNGS 复核确认, 且表型药敏结果支持利福平耐药, 证实该技术对结核分枝杆菌利福平耐药突变检测特异性强, 为开发高效低成本诊断方案奠定基础。

目前基于 CRISPR 技术的利福平耐药突变检测研究相对有限, 且不同研究方法间的检测性能存在显著差异。例如, Cao 等^[21]采用 Asy-RPA 与 CRISPR-Cas12a 联用, 实现了 1 fmol/L 的检测灵敏度, 在 60 min 内完成检测。而 Augustin 等^[17]开发的 CARP 平台需依次进行 PCR 扩增、CRISPR-Cas9 切割和 RT-qPCR 检测, 检测灵敏度达到 0.000 1 fg, 但操作烦琐且耗时长达 4 h。相比之下, 本研究通过整合 RPA 高效扩增与 CRISPR-Cas12a 快速切割反应构建的 RPA-CRISPR 检测体系, 显著简化了操作流程并大幅度缩短了检测时间。然而, 针对 3 个突变位点的 RPA-CRISPR 检测体系的灵敏度均为 10^5 copies/ μ L, 与文献报道存在一定差距, 灵敏度差异可能源于 crRNA 间隔序列的碱基组成差异及不同试剂反应体系中缓冲成分的差异。另一方面, rpoB 基因具有 64% 的高 GC 含量, 尤其是在利福平耐药决定区内, 存在多个连续的 G/C 碱基序列, 形成高度稳定的 DNA 二级结构, 显著增加了 RPA 扩增过程中核酸解链难度, 从而限制了重组酶的链置换效率, 最终影响检测灵敏度。

本研究存在以下局限性: 第一, 检测灵敏度不足, 灵敏度改善受 rpoB 基因复杂二级结构限制, 后续拟通过添加解旋酶、甜菜碱等优化反应体系以促进核酸解链; 第二, 当前仅覆盖 rpoB 基因 3 个高频耐药突变位点(516、526、531), 需扩展更多耐药相关基因及突变位点以提升检测体系的普适性; 第三, 现有体系无法实现单管多重检测, 未来可整合多种 Cas 蛋白构建多通道系统, 或结合微流控芯片技术开发多靶标同步检测平台^[22-23]。这些改进方向将推动该技术向更高灵敏度、更广覆盖度及多重检测能力发展。

综上所述, 本研究结合 RPA 扩增技术和

CRISPR-Cas12a 核酸检测技术成功建立了针对结核分枝杆菌 rpoB 基因突变的 RPA-CRISPR 检测方法。该方法具有简便快速、特异等优点, 能够在恒温条件下 30 min 内完成检测, 有效避免了传统方法对复杂仪器设备的依赖, 降低了检测成本。通过对临床分离菌株的检测验证, 证实该方法对结核分枝杆菌 rpoB 基因核心区域的常见突变检测具有较高的准确性和可靠性, 能够有效区分野生型与突变型序列。然而, 该方法的检测灵敏度有待提升, 这为后续方法优化提供了明确的方向和改进重点。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global vaccine market report 2024[M]. Geneva: World Health Organization, 2025.
- [2] 杜瑶, 高宏丹, 刘家坤, 等. CRISPR-Cas 系统在病原核酸检测中的研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(1): 202-216.
- [3] Qian B, Liao K, Zeng D, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas12a mediated multiplexable and portable detection platform for GII genotype porcine epidemic diarrhoea virus rapid diagnosis[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 920801.
- [4] Li W, Tang J, Ma Z, et al. Development of an RPA-CRISPR/Cas12a-based rapid diagnosis strip for the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*[J]. Microorganisms, 2025, 13(4): 826.
- [5] Chen J S, Ma E, Harrington L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439.
- [6] Li S Y, Cheng Q X, Wang J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. Cell Discov, 2018, 4: 20.
- [7] 曹翌明, 李丽, 孟繁荣, 等. 中国结核杆菌利福平耐药株 rpoB 基因 531、526、516 位点碱基突变特点[J]. 现代医院, 2015, 15(7): 7-9.
- [8] 刘海清, 张威. 结核分枝杆菌利福平耐药影响因素及 rpoB 基因突变位点分析[J]. 中国热带医学, 2024, 24(1): 96-101.
- [9] Yamano T, Zetsche B, Ishitani R, et al. Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1[J]. Mol Cell, 2017, 67(4): 633-645.
- [10] García-Marín A M, Cancino-Muñoz I, Torres-Puente M, et al. Role of the first WHO mutation catalogue in the diagnosis of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in the Valencia Region, Spain: a retrospective genomic analysis[J]. Lancet Microbe, 2024, 5(1): e43-e51.
- [11] Domínguez J, Boeree M J, Cambau E, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a 2023 TBnet/RESIST-TB consensus statement[J]. Lancet Infect Dis, 2023, 23(4): e122-e137.
- [12] Ejalu D L, Irioko A, Kirabo R, et al. Cost-effectiveness of GeneXpert Omni compared with GeneXpert MTB/Rif for point-of-care diagnosis of tuberculosis in a low-resource, high-burden setting in Eastern Uganda: a cost-effectiveness analysis based on decision analytical modelling[J]. BMJ Open, 2022, 12(8): e059823. (下转第 1821 页)

感染性疾病新方法新技术专题·论著

基于宏基因组二代测序的寄生虫感染病原谱与
临床特征分析

张为利¹,袁珍朝²,徐 漂³,陆思芬⁴,肖 侠⁴,谢 轶^{1△}

1. 四川大学华西医院实验医学科/四川大学华西医院临床检验医学研究中心/四川省医学检验临床医学研究中心,四川成都 610041;2. 会理市人民医院检验科,四川凉山 615100;3. 古蔺县人民医院医学检验科,四川泸州 646500;4. 四川大学华西医院精准医学中心,四川成都 610041

摘要:目的 利用宏基因组二代测序(mNGS)分析寄生虫感染的病原谱构成,并探讨其与患者临床特征的关系。**方法** 回顾性收集 2022 年 1 月至 2024 年 12 月经 mNGS 检出寄生虫患者的临床资料,分析病原谱特征及实验室炎症指标[白细胞介素-6(IL-6)、C 反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、白细胞计数(WBC)及各类细胞百分比等],比较原虫与蠕虫感染的差异。**结果** 共检出 29 例寄生虫,其中原虫占 55.2%(16/29),以刚地弓形虫为主(31.3%);蠕虫占 44.8%(13/29),以多房棘球绦虫为主(46.2%)。实验室指标分析结果显示,蠕虫组嗜酸性粒细胞百分比和计数均显著高于原虫组($P<0.01$),而 CRP、PCT、IL-6 其他炎症指标在两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** mNGS 可揭示寄生虫感染的病原谱特征,伴有蠕虫感染时嗜酸性粒细胞明显升高的特点。mNGS 联合常规血清学检测可提升诊断准确性,为寄生虫感染的精准诊治提供重要依据。

关键词:宏基因组二代测序; 寄生虫感染; 病原谱; 原虫; 蠕虫

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.15.004 **中图法分类号:**R446

文章编号:1673-4130(2026)15-1816-06 **文献标识码:**A

Analysis of parasite infection pathogen spectrum and clinical characteristics
based on next-generation sequencing of metagenomics

Zhang Weili¹,Yuan Zhenzhao²,Xu Piao³,Lu Sifen⁴,Xiao Xia⁴,Xie Yi^{1△}

1. Department of Laboratory Medicine,West China Hospital,Sichuan University/Clinical Laboratory Medicine Research Center,West China Hospital,Sichuan University/Sichuan Clinical Research Center for Laboratory Medicine,Chengdu,Sichuan 610041,China ;
2. Department of Clinical Laboratory,People's Hospital of HuiLi City,Liangshan , Sichuan 615100,China ;3. Department of Clinical Laboratory,Gulin People's Hospital,Luzhou ,Sichuan 646500,China ;4. Precision Medicine Center,West China Hospital,Sichuan University,Chengdu,Sichuan 610041,China

Abstract: Objective To analyze the composition of the pathogen spectrum of parasitic infections using metagenomic next-generation sequencing (mNGS) and to explore its relationship with the clinical characteristics of patients. **Methods** Clinical data of patients with parasitic infections detected by mNGS from January 2022 to December 2024 were retrospectively collected. The characteristics of the pathogen spectrum and laboratory inflammatory indicators [interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), white blood cell count (WBC), and various cell percentages, etc.] were analyzed. The differences between protozoan and helminth infections were compared. **Results** Totally 29 cases of parasitic infections were detected. Protozoa accounted for 55.2% (16/29), predominantly *Toxoplasma gondii* (31.3%), Helminths accounted for 44.8% (13/29), predominantly *Echinococcus multilocularis* (46.2%). The analysis of laboratory indicators showed that the percentage and count of eosinophils in the helminth group were significantly higher than those in the protozoan group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$), while other inflammatory indicators such as CRP, PCT, IL-6, showed no statistically significant difference between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** mNGS provides a comprehensive characterization of the pathogen spectrum in parasitic infections, with helminth infections exhibiting a marked elevation in eosinophils. The infection by helminth shows a distinct feature of elevated eosinophils. The combination of mNGS and conventional serological tests

作者简介:张为利,女,主管技师,主要从事临床检验诊断学方向的研究。 △ 通信作者,E-mail:xieyi@scu.edu.cn。