

基于 CRISPR/Cas12b 的乳粉中克罗诺杆菌属检测

张懿翔¹, 张清平¹, 李林显², 王亮¹, 杨捷琳³, 刘洋^{1*}

(¹上海市质量监督检验技术研究院/国家市场监督管理总局重点实验室(乳及乳制品检测与监控技术) 上海 200233

²吐露港生物科技有限公司 上海 200233

³上海海关动植物与食品检验检疫技术中心 上海 200135)

摘要 目的:开发一种基于 CRISPR/Cas12b 的克罗诺杆菌属分子检测方法。方法:以克罗诺杆菌属特异性基因序列为候选区域,针对区域设计扩增引物和向导 RNA 靶向序列,对其进行条件优化、特异性检测、反应体系优化,并用人工污染样品对体系的灵敏度、重复性进行验证。结果:该方法的特异性很好,方法的灵敏度达 0.01 ng/μL,在人工污染样品中可检测到初始菌量<10 CFU/g 的样品,方法检出限<10 CFU/100 g。对市售的 51 份乳粉样品进行检测,结果与传统国标方法一致。结论:建立的 CRISPR/Cas12b 方法可用于乳粉中克罗诺杆菌属的快速检测。

关键词 CRISPR; Cas12b; 克罗诺杆菌属; 检测

文章编号 1009-7848(2022)06-0267-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.06.028

食品安全是关乎人民生命健康和社会和谐的重大战略问题。婴幼儿配方食品是部分婴幼儿的唯一食物来源,对婴幼儿健康及生命安全有重要影响。克罗诺杆菌为革兰氏阴性菌,是一种普遍存在于大自然中的条件致病菌。一旦感染该菌,会对婴幼儿的健康造成严重危害,可引发坏死性小肠结肠炎、菌血症和新生儿脑膜炎等疾病,甚至可能留下严重的神经系统后遗症,死亡率高达 40%~80%^[1-3]。

在婴幼儿配方乳粉中存在克罗诺杆菌属高污染风险^[4-8]。在生产过程中控制克罗诺杆菌污染是婴幼儿配方食品安全控制的关键环节,而快速精确检测是其质量保证的重要手段。

CRISPR 是指成簇的、规律间隔的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats),是大多数细菌及古细菌中抵御病毒入侵的一种获得性免疫方式,该序列是许多原核生物的免疫系统^[9]。CRISPR/Cas 系统的发现可以追溯到 1987 年。ISHINO 等^[10]首次在大肠杆菌的基因组中发现串联的间隔重复序列,然而,当时未引起学术界的关注。2002 年,Jansen 等^[11]将这一

奇特的重复间隔序列正式命名为串联间隔短回文重复序列(CRISPR)。CRISPR/Cas 系统本质上是一系列由 RNA 引导的核酸内切酶^[12-14]。近年来,CRISPR 技术在基因组编辑领域表现出巨大的应用价值,在分子检测、病原菌检测,包括最近的新冠检测等领域也开始有重要的突破性应用^[15-22]。本研究使用的 Cas12b 属于第 2 类 CRISPR/Cas 系统中的 V 型,具有附带切割活性^[23-24]。在靶标核酸存在的情况下,Cas 蛋白在 crRNA 引导下特异性结合靶标核酸并被激发出单链核酸非特异性切割活性,从而将体系中单链核酸报告分子切开并释放出可检测的信号。

本研究基于 CRISPR-Cas12b 蛋白,利用团队原创建立的 CRISPR-Cas12b 检测技术来建立重要食源性致病菌的分子检测方法,对婴幼儿配方食品中致病菌克罗诺杆菌属进行快速定性筛选检测,这对提升我国婴幼儿配方食品企业质量控制能力和民众关切的婴幼儿食品安全水平具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

选择 8 株克罗诺杆菌属参比菌株和 31 株实验室分离株,以及 30 株非克罗诺杆菌属的纯化标准菌株进行特异性检测(表 1、表 2)。

收稿日期: 2021-06-23

基金项目: 国家市场监督管理总局技术保障专项项目
(2019YJ018)

作者简介: 张懿翔(1987—),男,硕士生,工程师

通信作者: 刘洋 E-mail: liuyang@sqi.org.cn

表1 克罗诺杆菌属阳性菌株名称及其编号

Table 1 The name and number of positive strains of *Cronobacter*

编号	菌株名称	菌株号	菌种来源
1	阪崎克罗诺杆菌	ATCC25944	中国工业微生物菌种保藏管理中心
2	普遍克罗诺杆菌	NCTC 9529	上海海关
3	都柏林克罗诺杆菌	DSM 18705	上海海关
4	丙二酸盐阳性克罗诺杆菌	DSM 18702	上海海关
5	苏黎世克罗诺杆菌	DSM 18703	上海海关
6	都柏林克罗诺杆菌	DSM 18706	上海海关
7	穆汀斯克罗诺杆菌	ATCC 51329	上海海关
8	都柏林克罗诺杆菌	DSM 18707	上海海关
9	克罗诺杆菌属 1-31	奶粉	分离自样品

表2 克罗诺杆菌属阴性菌株名称及其编号

Table 2 The name and number of negative strains of *Cronobacter*

编号	菌株名称	菌株号	菌种来源
1	铜绿假单胞菌	ATCC10104	中国工业微生物菌种保藏管理中心
2	奇异变形杆菌	ATCC33420	中国工业微生物菌种保藏管理中心
3	大肠杆菌	ATCC25922	中国工业微生物菌种保藏管理中心
4	金黄色葡萄球菌	ATCC6538	中国工业微生物菌种保藏管理中心
5	粪肠球菌	ATCC29212	中国工业微生物菌种保藏管理中心
6	产气肠杆菌	ATCC13048	中国工业微生物菌种保藏管理中心
7	成团泛菌	ATCC27155	中国工业微生物菌种保藏管理中心
8	单核细胞增生李斯特氏菌	ATCC19114	中国工业微生物菌种保藏管理中心
9	蜡样芽孢杆菌	ATCC11778	中国工业微生物菌种保藏管理中心
10	EHEC(O157:H7)	CICC21530	中国工业微生物菌种保藏管理中心
11	宋内氏志贺氏菌	ATCC 25931	中国工业微生物菌种保藏管理中心
12	甲型副伤寒沙门氏菌	ATCC 9150	中国工业微生物菌种保藏管理中心
13	鼠伤寒沙门氏菌	ATCC 13311	中国工业微生物菌种保藏管理中心
14	猪霍乱沙门氏菌	ATCC 7001	中国工业微生物菌种保藏管理中心
15	肠炎沙门氏菌	ATCC 13076	中国工业微生物菌种保藏管理中心
16	鸭沙门氏菌	ATCC 9270	中国工业微生物菌种保藏管理中心
17	阴沟肠杆菌	ATCC 35030	中国工业微生物菌种保藏管理中心
18	肺炎克雷伯氏菌	ATCC 700603	中国工业微生物菌种保藏管理中心
19	大肠杆菌	ATCC 11229	中国工业微生物菌种保藏管理中心
20	婴儿双歧杆菌	CICC 6069	中国工业微生物菌种保藏管理中心
21	德氏保加利亚亚种	CICC 6097	中国工业微生物菌种保藏管理中心
22	动物双歧杆菌	DSMZ 10140	德国微生物菌种保藏中心
23	植物乳杆菌	ATCC 8014	中国工业微生物菌种保藏管理中心
24	痢疾志贺氏菌	CMCC(B) 51105	中国工业微生物菌种保藏管理中心
25	福氏志贺氏菌	CMCC(B) 51572	中国工业微生物菌种保藏管理中心
26	ETEC	CICC10413	中国工业微生物菌种保藏管理中心
27	EPEC	CICC10372	中国工业微生物菌种保藏管理中心
28	弗氏柠檬酸杆菌	ATCC 43864	中国工业微生物菌种保藏管理中心
29	粘质沙雷氏菌	ATCC 14041	中国工业微生物菌种保藏管理中心
30	痢疾志贺氏菌	CMCC(B) 51105	中国工业微生物菌种保藏管理中心

1.2 仪器与设备

ABI7500PCR 扩增仪、BIO-RADPCR 扩增仪, 美国 BIO-RAD; Vortex Genie2 漩涡振荡器, 美国 SI; 移液枪, 美国 GILSON; SW-CJ-2D 超净工作台, 苏州净化; ESCO LA2-4A1 生物安全柜, 新加坡艺思高。

1.3 主要试剂与材料

Phanta[®] Max Super -Fidelity DNA Poly-

merase, 南京诺唯赞 Vazyme, P505-d1; NEBuffer 3.1(10×), NEB, B7203S; UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, ThermoFisher, 10977023; RNA 酶抑制剂, Takara, 2313B; Cas12b 蛋白, 吐露港生物; 细菌 DNA 提取试剂盒 DP302-02, 天根生化科技(北京)有限公司, U8110。

PCR 引物与探针见表 3。

表 3 引物与探针
Table 3 Primers and probes

引物名称	引物序列	引物长度/bp
primer3-F	AACACGCTTTCTAACGTTGATAAGG	25
primer3-R	CTTTTGTCTGTAAGAGCAGAGGTGAG	25
Cas12b-tracrRNA	GUCUAGAGGACAGAAUUUUUCAAACGGGUGUGCCAAUGGCC ACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGUUGAGCUUCUAAAAA	78
crRNA-per3-1	CGAGCGAUCUGAGAAGUGGCACAUAAGGCCAAUAAUAAUG	40
FAM-N12-Eclipse	FAM-nnnnnnnnnnn-Eclipse	12

2 试验方法

2.1 引物设计

通过基因组比较和候选靶点选择, 以 16S rRNA 基因保守序列、克罗诺杆菌菌株特异性关键基因序列、编码致病性相关基因序列及其他文献报道可区分菌株的特异性序列候选区域, 针对每个区域设计 2~3 对扩增引物和向导 RNA 靶向序列进行生物信息学测试, 挑选效率最高和特异性最好的组合, 通过 NCBI 在线工具进行序列分析和比对, 利用 Prime Express 软件 V3.0(ABI, Foster City, CA, USA) 设计出 4 对引物和向导 RNA 组合, 经过特异性及灵敏度测试, 最终筛选出 1 对, 序列见表 3。CRISPR 反应的报告探针为 12 个随机序列的单链 DNA 序列, 在探针的 5' 端标记 FAM, 3' 端标记 Eclipse。所有引物/探针均由上海生工生物有限公司合成, 所有 RNA 引物序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

2.2 核酸提取方法

2.2.1 标准菌株核酸提取方法 将标准菌株接种于营养肉汤中, 36℃ 培养 12 h, 吸取 1 mL 培养液, 加入 2 mL 无菌离心管中, 13 000 r/min, 离心 5 min, 去除上清, 重复上述步骤 1 次, 即共吸取培养液 2 mL 取沉淀。然后根据试剂盒进行提取。

2.2.2 试验样品核酸提取方法 样品进行前处理: 取样品 100 g 加入到 900 mL 的 BWP 中, 混匀, 36℃ 培养 12 h。取 2 mL 的样品培养液加入 2 mL 离心管中 13 400 g 离心 5 min, 而后提取核酸。

2.3 体系及条件

2.3.1 PCR 反应 反应体系包括 25 μL PCR 反应混合液, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, dNTP 1 μL, DNA 聚合酶 1 μL, DNA 模板 2 μL, 用超纯水补足总体积为 50 μL。扩增反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 15 s 40 个循环; 4℃ 保存。

2.3.2 CRISPR 反应 20 μL 的 CRISPR 反应体系包括: 10×NEBuffer 3.1 2 μL, Cas12b (5 μmol/L) 1 μL, RNA 酶抑制剂 (40 U/μL) 0.25 μL, crRNA (10 μmol/L), tracrRNA (10 μmol/L) 和探针 (10 μmol/L) 各 1 μL, 待测 DNA 模板 2 μL, 用超纯水补足总体积为 20 μL。于 ABI7500 荧光 PCR 仪(美国, ABI 公司)上进行扩增, 设置 48℃ 程序, 每 1 min 检测一次 FAM 荧光, 持续 15 min。

2.4 PCR 扩增条件优化

以克罗诺杆菌属(ATCC 25944)标准菌株核酸为模板, 优化扩增温度。退火温度设置为 54, 56, 58, 60, 62℃ 共 5 个温度梯度, 选择最适合的退

火温度。在此基础上分别设置 25,30,35,40,45 个循环数。选择最适宜的循环数。

2.5 特异性检测

特异性测试采用 8 株克罗诺杆菌属菌株,31 株实验室分离株和 30 株非克罗诺杆菌属菌株。将表 1, 表 2 中所列克罗诺杆菌属标准菌株以及其它常见食源性致病菌接种于营养肉汤中,36 °C 培养 12 h,取培养菌悬液 2 mL 提取 DNA。对提取的核酸用超微量分光光度计进行浓度和纯度的测定,确保提取核酸的 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间。利用 PCR 对菌株 DNA 进行扩增,使用 CRISPR 反应检测。

2.6 灵敏度试验

以克罗诺杆菌属(ATCC 25944)标准菌株核酸为模板,对核酸质量浓度分别为 100,10,1,0.1,0.01 ng/ μ L 进行检测。纯菌液检测限 10 倍梯度稀释克罗诺杆菌属(ATCC 25944)纯菌液($10^7\sim 10^2$ CFU/mL),分别吸取 2 mL 提取 DNA 进行检测。

2.7 人工污染样品的制备

选择经传统方法和 CRISPR 方法验证克罗诺杆菌属的奶粉样品作为添加基质。取克罗诺杆菌属(ATCC 25944)的过夜培养菌悬液分别进行 10

倍梯度稀释并平板计数。同时取 $<10\sim 10^4$ CFU/mL 稀释度菌液各 1 mL 分别添加到盛有 100 g 奶粉样品的均质袋中,另取 1 份 100 g 奶粉样品不添加菌液作为空白对照,上述样品中加入 900 mL BPW 缓冲蛋白胨水,用拍击式均质器拍击 2 min,制成系列含有不同浓度的人工污染样品。经过 12 h 的 36 °C 增菌,取各样品匀液 2 mL 提取 DNA,进行 CRISPR 检测。

2.8 实际样品检验

市场上购买婴幼儿配方乳粉共 51 份。根据 2.2.2 节进行前处理,提取样品核酸进行 CRISPR 检测。并用传统方法 GB 4789.40 进行验证。

3 试验结果

3.1 扩增温度和循环数的优化结果

对温度优化扩增结果如图 1 显示,58~62 °C 对于检测的结果影响较小,60 °C 的退火温度检测效果最好,选择 60 °C 作为扩增的退火温度。

对反应循环数的优化结果图如图 2 所示,可以看出,25,30 循环数扩增效果不太明显;35~45 个循环有更为明显的 CRISPR 反应效果。后续试验选择 40 循环作为试验参数。

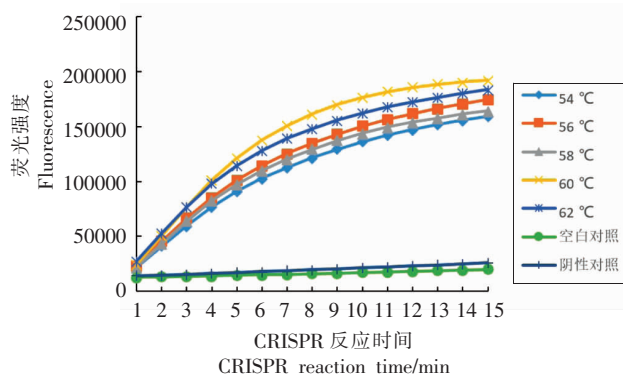


图 1 退火温度优化结果图

Fig.1 Result of TM optimization test

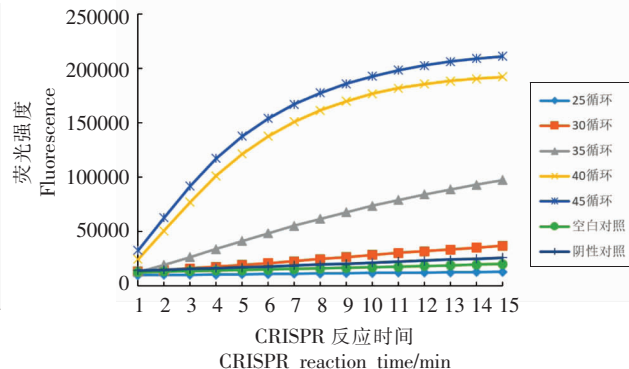


图 2 反应循环优化结果图

Fig.2 Result of reaction cycle optimization test

3.2 特异性结果

特异性检测结果如图 3、图 4 所示,结果发现所有克罗诺杆菌属出现阳性扩增信号,而其它常见食源性致病菌检测均没有明显扩增信号。表明引物探针组具有良好的特异性,方法适用于克罗诺杆菌属的特异性检测。

3.3 CRISPR 结果判定

观察阳性菌株和阴性菌株的检测结果显示,阳性菌株的荧光信号随着反应进行有明显的增长趋势,而阴性菌株的荧光信号没有明显增长,通过增长趋势的差异可以判定检测结果。根据 crisper 检测相关的文献[17],定义判定值 N 来判断检测

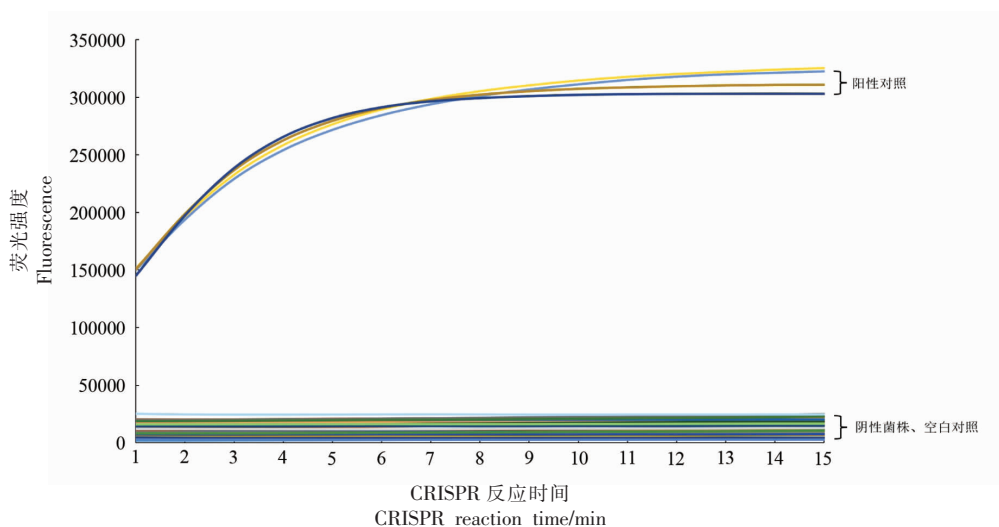


图 3 非克罗诺杆菌属 CRISPR 检测结果

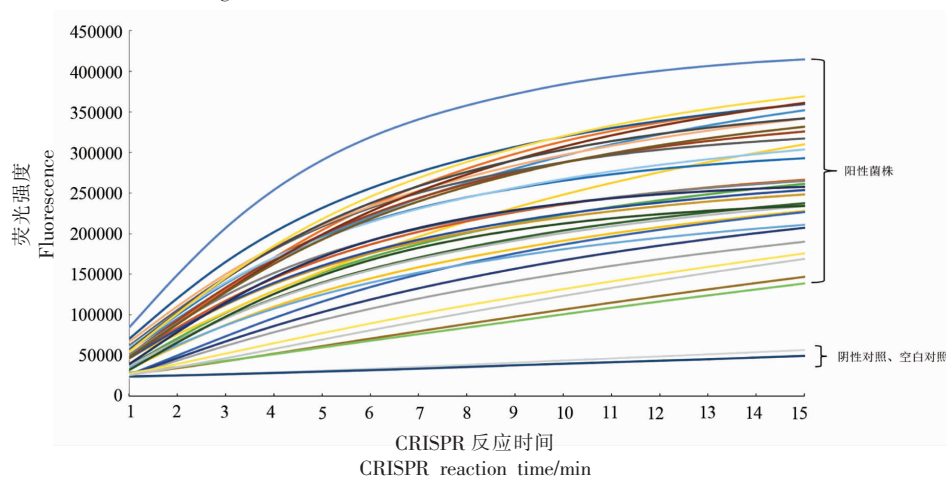
Fig.3 CRISPR detection results of non *Cronobacteria*

图 4 克罗诺杆菌属与分离菌株 CRISPR 检测结果

Fig.4 CRISPR detection results of *Cronobacteria* and its isolates

结果。

计算公式:判定值 $N = (10 \text{ min 样品荧光值} / 10 \text{ min 对照荧光值}) / (2 \text{ min 样品荧光值} / 2 \text{ min 对照荧光值})$

$$\text{判断值 } N = \frac{10 \text{ min SF} / 10 \text{ min CF}}{2 \text{ min SF} / 2 \text{ min CF}}$$

式中:SF——样品荧光值;CF——对照荧光值;对照荧光值为水的荧光值。

统计所有结果,在这 69 个标准菌株的结果中,发现阳性菌株及分离菌株判定值 N 均 ≥ 1.40 ,并且有明显增长趋势,阴性菌株结果均 ≤ 1.20 ,没有明显增长趋势。对于 1.40~1.20 之间的样品进行重复测试,如果 N 值 > 1.20 判定样品 CRISPR 检测

筛选阳性, N 值 ≤ 1.20 时,则判定样品 CRISPR 检测筛选阴性。通过传统方法及 RT-qPCR 验证结果均符合预期。并且当检测低浓度样品的时候(如图 5、图 6、表 4)CRISPR 方法更容易判定结果,阳性样品的抬头更明显。

3.4 灵敏度检测

核酸水平灵敏度检测结果如图 7、表 5 所示,核酸质量浓度在 100~0.01 ng/ μL 之间判定值 N 均 > 1.2 ,判定为阳性。纯菌液检测结果如图 6、表 6 所示,除 10^2 CFU/g 的纯菌液检测结果 ≤ 1.2 以外,重复检测结果均 > 1.2 ,可以稳定检测到 10^3 CFU/g 的纯菌液。

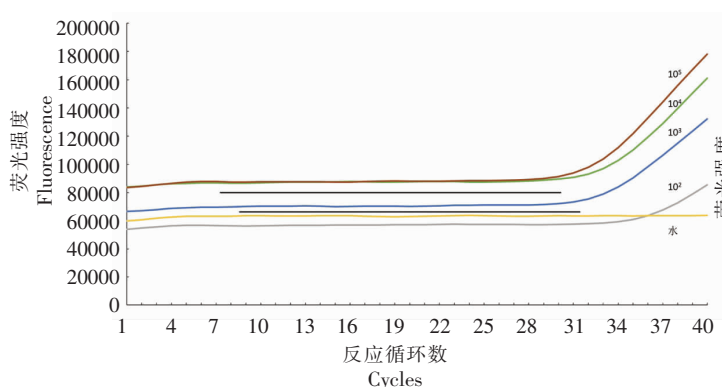


图5 RT-qPCR结果

Fig.5 Results of RT-qPCR

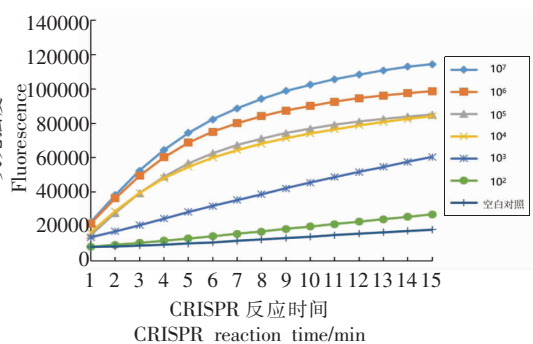


图6 纯菌液 CRISPR 检测结果

Fig.6 CRISPR test results of pure bacterial solution

表4 CT值与N值

Table 4 CT value and N value

方法	10^5 CFU/g	10^4 CFU/g	10^3 CFU/g	10^2 CFU/g
RT-qPCR(CT值)	35.16	36.25	37.13	>40
CRISPR(N值)	1.67	1.55	1.39	1.13

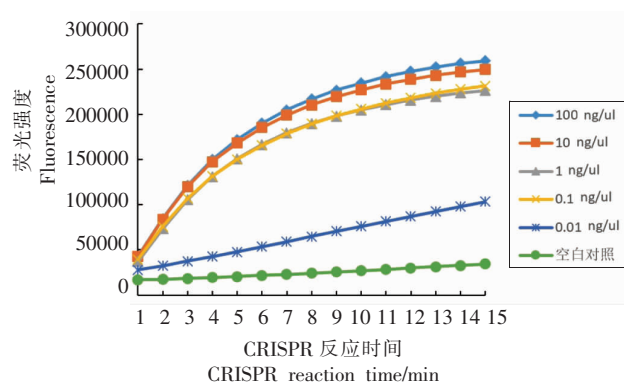


图7 CRISPR 检测灵敏度结果

Fig.7 CRISPR sensitivity test results

表5 CRISPR 检测灵敏度判定值结果

Table 5 CRISPR sensitivity test N value results

核酸质量浓度/ng· μ L ⁻¹	判定值 N
100	1.85
10	1.80
1	1.86
0.1	1.82
0.01	1.56

表6 CRISPR 检测纯菌液判定值结果

Table 6 Pure bacterial solution test N value results

纯菌液浓度/CFU·g ⁻¹	判定值 N
10^7	1.62
10^6	1.49
10^5	1.67
10^4	1.55
10^3	1.39
10^2	1.13

3.5 人工污染样品的检测

根据添加菌液的平板计数结果,估计人工污染样品中克罗诺杆菌属初始含量为 $<10\sim 10^4$ CFU/g。经过 12 h 的增菌,将人工污染样品中提取的 DNA 进行扩增检测。结果发现 4 个不同污染水平的奶粉样品均呈阳性扩增(图 8、表 7)。

3.6 实际样品检测

对市售的 51 份样品进行 CRISPR 检测,结果显示全部样品的判定值 $N \leq 1.20$,均为阴性,未检出克罗诺杆菌属与传统方法检测结果一致。

4 讨论与结论

婴幼儿配方乳粉中克罗诺杆菌的污染风险控制是乳粉生产质量控制中的一个重要环节,目前,食品克罗诺杆菌属检测方法主要是常规的培养法、荧光 PCR 法、环等温扩增法等检测方法。这些

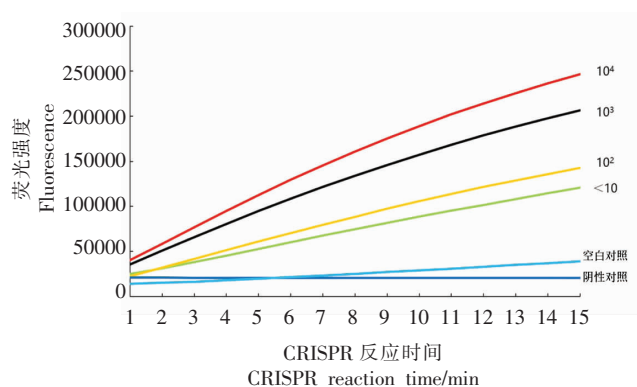


图 8 CRISPR 方法对人工污染样品的检测结果

Fig.8 Results of artificially contaminated samples

表 7 CRISPR 方法对人工污染样品的检测结果

Table 7 Results of artificially contaminated samples

起始菌 浓度/ CFU·g ⁻¹	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5
10 ⁴	+	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+	+
10 ²	+	+	+	+	+
<10	+	+	+	+	+

技术在灵敏度、特异性、简便性、速度和价格上各有优劣,但仍有容易污染、需要大型扩增设备等缺陷^[25-30]。

目前主要使用的传统检测方法如 GB 4789.40-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验》能得到食品样本中克罗诺杆菌的定性和定量测定结果,但都需经富集培养、选择性分离、形态特征观察、生理生化鉴定等过程,操作复杂、耗时费力,检测过程至少需要 4~7 d,而且灵敏度低,容易发生错检和漏检,无法对人工难以培养的致病菌进行检测。

本研究使用的 CRISPR 的检测技术被誉为“下一代的分子检测技术”,能做到“快速、灵敏、高特异、简便、低价”的特性,所建立的检测方法特异性高,方法检出限为<10 CFU/100 g,实际样品检验结果与预期结果相符。本研究也是 CRISPR 检测技术在国际食品安全领域方面的创新性技术开拓和应用探索,是国际首次将该技术在食品安全领域进行的创新性研究及应用,将对我国食品安全

检测能力提升产生深远影响,提高我国在食品安全检测领域的国际话语权,具有重要意义,因此具有良好的应用前景。在之后的研究中,可以使用该技术与其它检测技术联合应用,进一步提升其检测速度,灵敏度,提升我国在快速检测领域的能力。

参 考 文 献

- [1] JARADAT Z W, AL MOUSA W, ELBETIEHA A, et al. *Cronobacter* spp. - opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63(8): 1023-1037.
- [2] NAZAROWEC -WHITE M, FARBER J M. Enterobacter sakazakii: A review[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 34(2): 103-113.
- [3] GURTNER J B, KORNACKI J L, BEUCHAT L R. Enterobacter sakazakii: A coliform of increased concern to infant health[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 104(1): 1-34.
- [4] 徐湾, 姜华, 张选飞, 等. 我国克罗诺杆菌污染现状与预防控制措施研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(9): 848-851.
XU W, JIANG H, ZHANG X F, et al. Advances in research on *Cronobacter* spp.: Current contamination status and preventive measures in China [J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10(9): 848-851.
- [5] 陈万义, 任婧, 刘振民, 等. 婴幼儿配方粉中克罗诺杆菌属菌株检测方法研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2015, 38(2): 23-28.
CHEN W Y, REN J, LIU Z M, et al. A review of detection methods for *Cronobacter* spp. in power infant formula[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2015, 38(2): 23-28.
- [6] 梁兰英, 许娟, 林福全. 佛山市三水区销售婴幼儿配方粉中阪崎肠杆菌污染状况调查[J]. 食品安全导刊, 2015(3): 31-32.
LIANG L Y, XU J, LIN F Q. Investigation on Enterobacter Sakazakii contamination in infant formula powder sold in Sanshui district of Foshan [J]. China Food Safety Magazine, 2015(3): 31-32.
- [7] 朱凤, 李维克, 俞慕华, 等. 深圳乳制品和环境中的阪崎肠杆菌污染状况调查[J]. 现代预防医学, 2012,

- 39(16): 4107–4109.
- ZHU F, LI W K, YU M H, et al. Investigation on contamination by *Enterobacter sakazakii* in dairy products and environment in Shenzhen [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2012, 39(16): 4107–4109.
- [8] 姚雪婷, 赵鹏, 蒋玉艳, 等. 2011–2016年广西壮族自治区市售婴幼儿食品食源性致病菌监测结果分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32(3): 288–293.
- YAO X T, ZHAO P, JIANG Y Y. Analysis of monitoring results of foodborne pathogens in infant food on the market of Guangxi Zhuang Autonomous Region in 2011–2016 [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2020, 32(3): 288–293.
- [9] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [10] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. 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.
- [11] JANSEN R, EMBDEN J D A V, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [12] CHERTOW, DANIEL S. Next-generation diagnostics with CRISPR [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 381–382.
- [13] BARRANGOU, RODOTPHE, FREMAUX, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [14] MOLLA K A, YANG Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: Technical Considerations and Practical Applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(10): 1121–1142.
- [15] 张爱霞, 朱庆锋, 陈沛, 等. 基于 CRISPR/Cas13 的 RNA 编辑系统及其在核酸检测中的应用 [J]. *广东农业科学*, 2020, 47(11): 273–281.
- ZHANG A X, ZHU Q F, CHEN P, et al. RNA editing system based on CRISPR/Cas13 and its application in nucleic acid detection [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(11): 273–281.
- [16] PARDEE K, GREEN A, TAKAHASHI M, et al. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255–1266.
- [17] WANG X, ZHONG M, LIU Y, et al. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER [J]. *Science Bulletin*, 2020, 65(17): 1436–1439.
- [18] 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): 6245.
- [19] HUANG W, YU L, WEN D, et al. A CRISPR-Cas12a-based specific enhancer for more sensitive detection of SARS-CoV-2 infection [J]. *EBioMedicine*, 2020, 61: 103036.
- [20] HIDALGO - CANTABRANA C, O'FLAHERTY, SARAH, et al. CRISPR-based engineering of next-generation lactic acid bacteria [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 79–87.
- [21] CHEN K, WANG Y, RUI Z, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70(1): 667–697.
- [22] SELLE K, BARRANGOU R. CRISPR - based technologies and the future of food science [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(11): 2367–2372.
- [23] LI L, LI S, WU N, et al. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2228–2237.
- [24] TENG F, GUO L, CUI T, et al. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity [J]. *Genome biology*, 2019, 20(1): 132.
- [25] 常超, 王凌, 伍金娥. 基于 ATP 再生体系快速检测乳品中微生物 [J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 320–324.
- CHANG C, WANG L, WU J E. Development of a bioluminescence method combined with ATP amplification for detection of Bacteria in dairy products [J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 320–324.
- [26] PREECHAKASEDKIT P, PINWATTANA K, DUNG-CHAI W, et al. Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of *Salmonella typhi* in

- human serum[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 31(1): 562–566.
- [27] 林碧莲, 柯振华, 陈筱婷, 等. 多重实时荧光定量 PCR 快速检测婴幼儿奶粉中沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(11): 4375–4381.
- LIN B L, KE Z H, CHEN X T, et al. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Cronobacter* in infant milk powder by multiplex quantitative real-time PCR[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(11): 4375–4381.
- [28] 李莉, 陈泽辉. 婴幼儿食品中阪崎克罗诺杆菌的快速检测[J]. *中国卫生标准管理*, 2019, 10(18): 4–7.
- LI L, CHEN Z H. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in infant food[J]. *China Health Standard Management*, 2019, 10(18): 4–7.
- [29] 陈纯阳, 张宸宁, 史爱莹, 等. 重组酶等温扩增试纸条快速检测阪崎克罗诺杆菌[J]. *食品科学*, 2019, 40(24): 306–312.
- CHEN C Y, ZHANG C N, SHI A Y, et al. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip[J]. *Food Science*, 2019, 40(24): 306–312.
- [30] ZHANG Y, YANG Q, LI C, et al. Sensitive and visual detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula by saltatory rolling circle amplification method[J]. *LWT*, 2019, 107: 41–48.

Detection of *Cronobacter* spp in Milk Powder by CRISPR/Cas12b

Zhang Yixiang¹, Zhang Qingping¹, Li Linxian², Wang Liang¹, Yang Jieli³, Liu Yang^{1*}

(¹Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research / Key Laboratory of Milk and Dairy Products Detection and Monitoring Technology for State Market Regulation, Shanghai 200233

²Tolo Biotech, Shanghai 200233

³Technical Center for Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Customs, Shanghai 200135)

Abstract Objective: The development of a method for detecting *Cronobacter* spp in milk powder based on CRISPR/Cas12b. Methods: Firstly, the amplification primers and guide RNAs were designed and synthesized based on the specific gene sequence of *Cronobacter* spp. The conditions, specificity and reaction system were optimized, and the sensitivity and reproducibility of the system were validated using artificially contaminated samples. Results: The results showed a high specificity and sensitivity of this method – the sensitivity reached 0.01 ng/μL; samples with initial bacterial counts less than 10 CFU/g could be detected; and the detection limit was <10 CFU/100 g. 51 commercial milk powder samples were later tested using our established method, and the results were consistent with those obtained by traditional national standard method. Conclusion: As such, the CRISPR/Cas12b method established in this study can be used for rapid detection of *Cronobacter* in milk powder.

Keywords CRISPR; Cas12b; *Cronobacter* spp; detection