

密级：

论文编号：



中国农业科学院

# 学位论文

## 基于 CRISPR/Cas 的三种马传染病病原恒温 快速可视化检测方法研究

硕士研究生：张樱智

学 号：82101196284

指 导 教 师：王晓钧 研究员

申请学位类别：兽医硕士

领 域：兽医

培 养 单 位：哈尔滨兽医研究所  
研究生院

2022年6月

Secrecy:

No.

# **Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis**

## **Rapid and Visual Detection of Pathogens of Several Equine Infectious Diseases Pathogens Based on CRISPR/Cas under Isothermal Condition**

**Candidate: ZHANG Yingzhi**

**Student ID: 82101196284**

**Supervisor: Professor WANG Xiaojun**

**Degree Type: Master of Professional Degree in  
Veterinary Medicine**

**Major: Veterinary Medicine**

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute  
Graduate School**

**June 2022**

## 摘要

病原快速检测是疾病诊断和防控的重要手段之一。近年来基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测技术飞速发展,在现代医学中占有重要地位,已成为临床早期诊断中具有发展潜力的领域。CRISPR/Cas 系统起源于细菌和古细菌的适应性免疫系统,利用碱基互补配对原则对入侵的核酸靶向定位及剪切,根据效应机制的不同,Cas 蛋白可分为不同的类型。其中 LbCas12a (Cpf1) 属于V型 Cas 蛋白,在 crRNA 指导下被靶序列激活后,能够非特异性地、无差别地切割附近的单链 DNA 分子。这种反式切割反应与核酸扩增技术结合可达到更高的检测敏感性。

非洲马瘟 (African horse sickness, AHS) 是由非洲马瘟病毒 (African horse sickness virus, AHSV) 引起的马属动物的一种急性或亚急性非接触性虫媒介传染病。世界动物卫生组织将其列为 A 类动物疫病,我国目前尚未出现疫情。马腺疫是一种由马链球菌亚种 (*Streptococcus equi subspecies equi*, *S. equi*) 引起的最古老常见的马传染性疾病,其特征是颌下淋巴结脓肿。马流产沙门氏菌病也称为马副伤寒,是由马流产沙门氏菌 (*Salmonella abortus equi*, *S. abortus equi*) 引起的一种马属动物孕晚期流产为特征的传染性疾病。以上三种马传染病对于世界范围内马养殖业及相关产业的健康持续发展存在重大威胁,目前缺少临床上的快速病原检测方法。

本研究针对上述三种马传染病病原的快速分子检测技术开展研究,利用 CRISPR/Cas 酶系统,结合重组酶介导等温核酸扩增技术 (Recombinase Aided Amplification, RAA) 平台,建立了针对以上三种不同马属动物传染病病原的低成本、简便、快速、准确的核酸检测技术。

本研究构建了 LbCas12a 的重组原核表达载体,并利用 Strep 亲和层析与分子筛纯化技术获得高纯度的 LbCas12a 蛋白。同时以非洲马瘟病毒 VP7 蛋白基因的保守区域为靶点设计 crRNA,在荧光基团修饰的单链 DNA 报告基因存在下,我们获得的 LbCas12a 蛋白可以在 crRNA 的引导下识别靶序列,进而对报告基因进行切割,可得到肉眼及仪器可接收的信号,本研究获得了具有良好切割活性的 LbCas12a 蛋白,构建了基于 CRISPR/Cas12a 的反式切割报告系统。为提高敏感性,结合 RAA 建立了非洲马瘟恒温快速可视化检测方法,该方法对于质粒模板的检测限值为 10 copies/ $\mu\text{L}$ ,对于 RNA 模板的测限值为 100 copies/ $\mu\text{L}$ ,特异性实验结果表明其与其他马属动物传染性病原无交叉反应,检测所需时间仅为 80 min。

为了减少转移扩增产物时开盖产生的气溶胶污染问题,我们尝试将 CRISPR/Cas12a 和 RAA 体系整合在一个体系中进行,并对体系的缓冲液组分进行了优化。在保证高敏感性的基础上针对马腺疫和马流产沙门菌病两种马细菌病的病原建立了一体化检测方法。针对 *S. equi*,我们选择了毒力进化有关的 *SeM* 基因作为靶标,筛选了 crRNA 和扩增引物,对 CRISPR/Cas12a 和 RAA 体系进行一体化整合后,建立了马链球菌一体化恒温检测方法。该方法反应过程为 80 min,在质粒和菌液中的检测灵敏度分别为 1 copies/ $\mu\text{L}$  和 16.8 CFU/mL,与其他病原无交叉反应,在实际临床样本检测中表现良好。基于优化后的一体化反应体系,针对 *S. abortus equi* 的 *FljB* 基因设计并筛选了特异性良好、反应效率高的 crRNA 和 RAA 引物,构建了马流产沙门氏菌一体化检测方法,质粒和菌液的检测灵敏度分别为 1 copies/ $\mu\text{L}$  和 800 CFU/mL,特异性试验与临床样本检测中的表现良好。

综上所述,我们建立的基于 CRISPR/Cas12a 和 RAA 技术的恒温快速可视化检测平台具有应

用于现地检测的潜力。此外，该检测平台可应用于其他马传染病病原的即时检测方法建立，提高一线临床诊断的工作效率，助力于马属动物疫病的科学防控。

**关键词：**CRISPR/Cas12a，非洲马瘟病毒，马链球菌，马流产沙门氏菌，核酸检测

## Abstract

Rapid detection of pathogens is one of the important means of disease diagnosis. In recent years, nucleic acid detection technology based on CRISPR/Cas system has developed rapidly, which occupies an important position in modern medicine and has become the most promising field of early clinical diagnosis. The CRISPR/Cas system originates from the adaptive immune system of bacteria and archaea, which uses the principle of base complementary pairing to target and cleave the invading nucleic acid. Cas proteins can be divided into different enzyme types according to the effect mechanism. Activated by a target sequence guided by crRNA, LbCas12a (Cpf1) of type V can cleave nearby single-stranded DNA molecules nonspecifically and indiscriminately. This trans-cleavage reaction can be combined with nucleic acid amplification technology to achieve higher detection sensitivity.

African Horse sickness (AHS) is an acute or subacute non-contact insect-borne disease of equine caused by African Horse sickness virus (AHSV). The World Organization for Animal Health listed it as A class animal disease, China has not yet appeared the epidemic situation. Equine Strangles is the oldest common equine infectious disease caused by *Streptococcus equi subspecies equi* (*S. equi*), characterized by Submaxillary lymph node swelling and suppuration. Equine abortus salmonellosis also known as equine paratyphoid, is a contagious disease characterized by late pregnancy abortion of equine caused by *Salmonella enterica subspecies enterica serovar abortus equi* (*S. abortus equi*). The above three equine infectious diseases pose a major threat to the healthy and sustainable development of equine breeding and related industries worldwide, and there is currently a lack of rapid clinical detection methods for pathogens.

In this study, rapid molecular detection technologies for the above three equine infectious diseases were studied. Combined with CRISPR/Cas system and the Recombinase Aided Amplification (RAA), a low-cost, simple, rapid and accurate nucleic acid detection technology for the pathogens of the above three equine infectious diseases was established.

LbCas12a protein was prokaryotic expressed by recombinant vector. High purity LbCas12a protein was obtained by Step affinity chromatography and molecular sieve purification technology. CrRNA was designed targeting the conserved region of VP7 gene of AHSV. The complex of LbCas12a protein and crRNA could recognize the target sequence, and then cut the single-stranded DNA reporter modified by fluorescent to obtain signals that could be received by naked eyes or instruments. Therefore, LbCas12a protein with enzyme activity was obtained, and the CRISPR/Cas12a trans-cleavage reporting system was constructed. In order to improve sensitivity, CRISPR/Cas12a system combined with RAA established a isothermal, rapid and visual detection method for AHSV. The detection limit of plasmid was 10 copies/ $\mu\text{L}$  and RNA was 100 copies/ $\mu\text{L}$ . There was no cross-reactivity with other equine infectious pathogens. The detection time was only 80 min.

In order to avoid aerosol pollution during the transfer of amplified products, we integrated CRISPR/Cas12a and RAA systems in one tube and optimized the buffer composition of the system.

One-pot detection method for *S. equi* and *S. abortus equi* was established with high sensitivity. For *S. equi*, the *SeM* gene related to virulence evolution was selected as the target, and established an one-pot detection method for *S. equi* after screening crRNA and RAA primers. The reaction took 80 min. The detection sensitivity of plasmid and bacterial were 1 copies/ $\mu$ L and 16.8 CFU/mL. The method had no cross-reactivity with other equine infectious pathogens and had good performance in the detection of real clinical samples. Based on the optimized system, the crRNA and RAA primers with high activity and specificity were screened for *FljB* gene of *S. abortus equi*, and the one-pot detection method was constructed. The detection limit of plasmid and bacterial were 1 copies/ $\mu$ L and 800 CFU/ mL. As expected, the specificity verification and clinical sample detection performed well.

In summary, the isothermal, rapid and visual detection platform based on CRISPR/Cas12a and RAA technology established in this study has the potential to be applied to point-of-care testing. In addition, the detection platform can be used to establish on-site detection methods for other equine infectious disease pathogens, which will improve the work efficiency of front-line clinical diagnosis and contribute to the scientific prevention and control of equine animal diseases.

**Keywords:** CRISPR/Cas12a, AHSV, *S. equi*, *S. abortus equi*, Nucleic acid detection

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 基于 CRISPR-Cas12a 的快速检测方法研究概述 .....	1
1.1.1 CRISPR-Cas 系统.....	1
1.1.2 CRISPR-Cas12a 快速检测方法.....	3
1.2 等温扩增概述.....	4
1.3 非洲马瘟及其病原检测技术 .....	6
1.3.1 非洲马瘟概述.....	6
1.3.2 非洲马瘟病毒检测方法.....	7
1.4 马腺疫及其病原检测技术 .....	7
1.4.1 马腺疫概述.....	7
1.4.2 马链球菌检测方法.....	8
1.5 马流产沙门氏菌病及其病原检测技术 .....	8
1.5.1 马流产沙门氏菌病概述.....	8
1.5.2 马流产沙门氏菌检测方法.....	9
1.6 研究目的与意义.....	10
第二章 LbCas12a 蛋白表达及纯化 .....	11
2.1 材料.....	11
2.1.1 质粒和菌株.....	11
2.1.2 主要试剂.....	11
2.1.3 主要设备仪器.....	11
2.1.4 主要溶液配制.....	12
2.2 方法.....	12
2.2.1 LbCas12a 原核表达载体构建 .....	12
2.2.2 LbCas12a 蛋白的表达 .....	13
2.2.3 LbCas12a 蛋白的纯化 .....	14
2.3 结果.....	14
2.3.1 LbCas12a 原核表达载体的构建 .....	14
2.3.2 LbCas12a 蛋白的表达 .....	15
2.3.3 LbCas12a 蛋白的纯化 .....	16
2.4 讨论.....	17
第三章 非洲马瘟病毒可视化检测方法(AHSV-RT-RAA-Cas12a)建立 .....	18
3.1 材料.....	18
3.1.1 质粒、菌株和基因组.....	18

3.1.2 主要试剂.....	18
3.1.3 主要设备仪器.....	18
3.2 方法.....	19
3.2.1 VP7 蛋白基因的重组质粒构建及体外转录 .....	19
3.2.2 AHSV TaqMan 实时荧光定量 PCR.....	19
3.2.3 crRNA 设计与 Cas12a 反应体系 .....	20
3.2.4 RAA 引物设计和 RAA 反应体系.....	21
3.2.5 敏感性和特异性实验.....	21
3.2.6 模拟临床样品检测.....	21
3.3 结果.....	22
3.3.1 VP7 蛋白基因的质粒构建及体外转录 .....	22
3.3.2 反应体系优化.....	23
3.3.3 AHSV-RT-RAA-CRISPR 方法敏感性和特异性试验 .....	24
3.3.4 临床模拟样品检测.....	26
3.4 讨论.....	26
第四章 马链球菌一体化检测方法( <i>S. equi</i> -one-pot-RAA-Cas12a)建立 .....	28
4.1 材料.....	28
4.1.1 菌株和基因组.....	28
4.1.2 主要试剂.....	28
4.1.3 主要设备仪器.....	28
4.1.4 主要溶液配制.....	28
4.2 方法.....	29
4.2.1 SeM 基因的质粒构建 .....	29
4.2.2 细菌培养和基因组提取.....	29
4.2.3 <i>S. equi</i> -PCR 反应.....	29
4.2.4 一体化反应体系优化.....	30
4.2.5 一体化反应敏感性和特异性实验.....	31
4.2.6 临床样品检测.....	31
4.3 结果.....	31
4.3.1 SeM 基因的质粒构建 .....	31
4.3.2 马链球菌一体化反应体系优化.....	32
4.3.3 马链球菌一体化反应敏感性和特异性试验 .....	33
4.3.4 临床样品检测.....	35
4.4 讨论.....	36
第五章 马流产沙门氏菌一体化检测方法( <i>S. abortus equi</i> -one-pot-RAA-Cas12a)建立 .....	38
5.1 材料.....	38

5.1.1 菌株和基因组.....	38
5.1.2 主要试剂.....	38
5.1.3 主要设备仪器.....	38
5.2 方法.....	38
5.2.1 FljB 基因的质粒构建.....	38
5.2.2 马流产沙门氏菌分离鉴定、培养和基因组提取 .....	39
5.2.3 马流产沙门氏菌一体化反应体系优化 .....	39
5.2.4 马流产沙门氏菌一体化反应敏感性和特异性实验 .....	40
5.2.5 临床样品检测.....	40
5.3 结果.....	40
5.3.1 马流产沙门氏菌分离鉴定.....	40
5.3.2 FljB 基因的质粒构建.....	40
5.3.3 马流产沙门氏菌一体化反应体系优化 .....	41
5.3.4 马流产沙门氏菌一体化反应敏感性和特异性试验 .....	43
5.3.5 临床样品检测.....	44
5.4 讨论.....	45
第六章 结论.....	47
参考文献.....	48

## 主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
AHSV	African horse sickness virus	非洲马瘟病毒
Cas	CRISPR associated proteins	CRISPR 相关蛋白
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	规律间隔成簇短回文重复序列
crRNA	CRISPR RNA	向导 RNA
EAV	Equine arteritis virus	马动脉炎病毒
EHV-1	Equid herpesvirus-1	马疱疹病毒I型
EHV-4	Equid herpesvirus-4	马疱疹病毒IV型
EIAV	Equine infection anemia virus	马传染性贫血病
EIV	Equine influenza virus	马流感病毒
RAA	Recombinase Aided Amplification	重组酶介导等温核酸扩增技术
<i>S. abortus equi</i>	<i>Salmonella abortus equi</i>	马流产沙门氏菌
<i>S. equi</i>	<i>Streptococcus equi subspecies equi</i>	马链球菌马亚种

## 第一章 绪论

### 1.1 基于 CRISPR-Cas12a 的快速检测方法研究概述

#### 1.1.1 CRISPR-Cas 系统

对 CRISPR 的首次描述出现在 1987 年, Ishino 等人对大肠杆菌的 *iap* 基因进行了测序, 在该基因下游发现了一个不寻常的重复序列, 但由于缺乏同源性分析, 这些序列的生物学意义不得而知 (ISHINO et al., 1987)。直到 2002 年被命名为成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), 同年 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR associated proteins, Cas) 也被鉴别, 序列同源性分析表明许多 Cas 蛋白参与跟核酸有关的化学反应 (JANSEN et al., 2002; TANG et al., 2002)。CRISPR 阵列由前导序列、重复序列和间隔序列组成, 前导序列一般位于 CRISPR 基因座上游, 富含 A-T 碱基并能够启动下游重复序列和间隔序列的转录形成 guide RNA (gRNA) 或者 CRISPR RNA (crRNA)。CRISPR/Cas 系统的免疫应答机理分为适应、表达和干扰三个阶段, 原核生物遭到外源噬菌体或质粒的入侵, 其特异性的核酸序列会被整合至 CRISPR 基因座间隔序列中, 使宿主对其产生记忆从而获得对相应噬菌体或质粒的适应性免疫, 当同一噬菌体或质粒再次入侵时, 具有记忆的特异性 crRNA 被合成并与 Cas 蛋白酶形成复合体, 利用碱基互补配对原则对入侵的核酸进行特异性靶向剪切, 从而达到保护宿主抵抗外源入侵的作用 (图 1-1) (GARNEAU et al., 2010; MAKAROVA et al., 2011; PHILIPPE et al., 2010; MOHANRAJU et al., 2016; BONINI et al., 2021)。

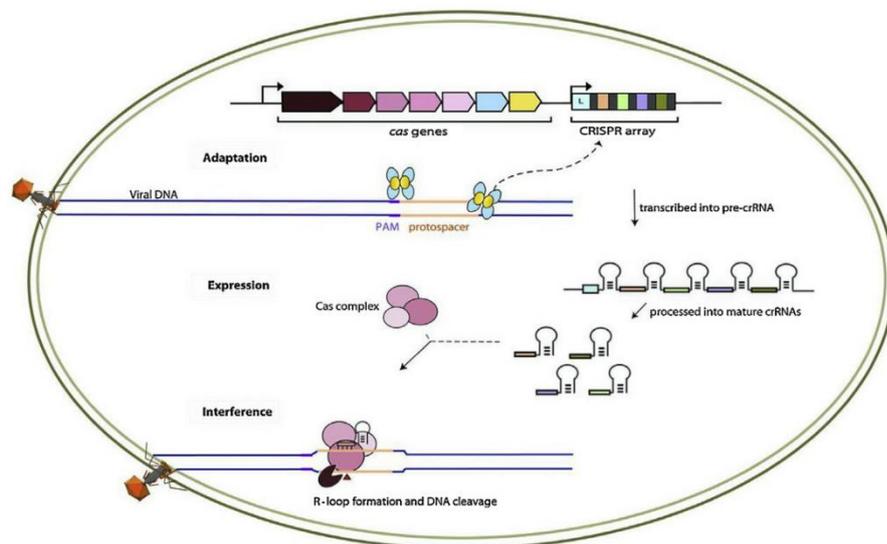


图 1-1 CRISPR 免疫应答系统 (MOHANRAJU et al., 2016)

Fig. 1-1 CRISPR immune response system (MOHANRAJU et al., 2016)

CRISPR/Cas 系统是近年来生物学领域最重大的发现之一，根据 Cas 蛋白的核心模块和效应机制可分为 2 类（图 1-2）。其中第一类约占 90%，需要多个 Cas 蛋白复合物共同发挥作用，分为 3 种类型（I 型、III 型和 IV 型）。第二类仅存在于细菌中，单个 Cas 蛋白就可发挥识别和切割效应，包括的 II 型（Cas9）、V 型（Cas12）以及 VI 型（Cas13），它们之间的进化方式各自独立，因此具有不同的酶活性，但相似之处在于经 crRNA 指导发挥其核酸内切酶活性，其中 Cas9 和 Cas12 靶向 DNA 而 Cas13 则靶向 RNA（BONINI et al., 2021）。

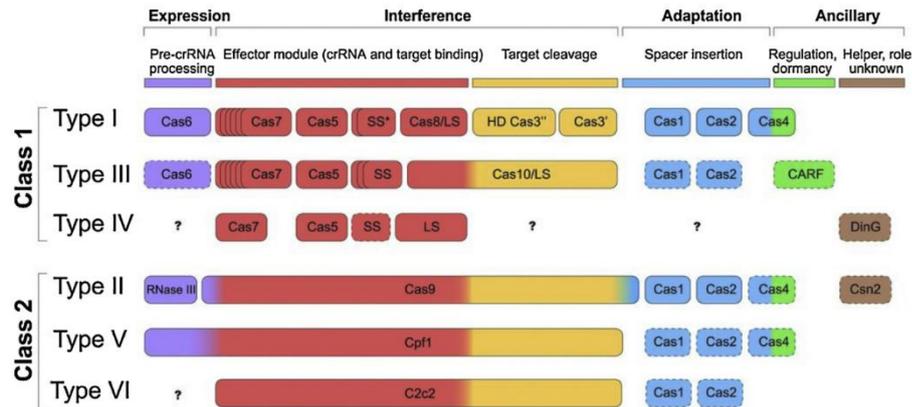


图 1-2 CRISPR 相关蛋白的分类（MOHANRAJU et al., 2016）

Fig. 1-2 Classification of CRISPR associated proteins (MOHANRAJU et al., 2016)

如图 1-3a 所示，Cas9 是由 gRNA 引导的靶向双链 DNA 的核酸内切酶，有 HNH 和 RuvC 两个不同核酸酶结合区域，HNH 结构域负责切割与间隔序列互补的 DNA 链，而 RuvC 结构域负责切割另一条 DNA 链，最终两条链形成平末端；突变其中一个结合域即可得到 Cas9n 切口酶（Cas9 nickase, Cas9n），在与 DNA 双链作用时仅产生单链切口；如果将两个结合域都进行突变则 Cas9 失去切割能力成为 dCas9（nuclease deactivated Cas9, dCas9）（GASIUNAS et al., 2012; JINEK et al., 2012; CONG et al., 2013; RAN et al., 2013）。CRISPR/Cas9 系统特异性剪切的能力在基因编辑领域做出了突出贡献，随着研究的不断深入，更多的 CRISPR/Cas 系统被发现并应用到生物医学领域。

在 V 型中研究最多的是 Cas12a (cpf1)，它能够切割自我加工前 RNA 使其成为成熟 crRNA，在 crRNA 和 Cas12a 形成复合体时类似于 Cas9 的诱导契合机制发生构象变化，并具有 dsDNA 切割活性（FONFARA et al., 2016）。crRNA 和 Cas12a 复合物在非靶标序列中识别富含 T 的 PAM 序列（5'-TTTN-3'）；而针对靶 DNA 链时，RuvC 结构域距离 PAM 序列 8 nt 的位置进行切割，产生 5'粘性末端（ISABEL et al., 2018）。如图 1-3b 所示，除 Cas12a 的 dsDNA 顺式切割活性外，LbCas12a 还具有 ssDNA 反式活性，这种由顺式活性引发的非特异附带切割在生物传感系统领域已经引起了极大的关注（CHEN et al., 2018; LI et al., 2018）。

而 VI 型中 Cas13a 是当前的研究热点，在 crRNA 和 Cas13a 复合物形成后，其自身加工成熟的 crRNA 介导复合物靶向识别 ssRNA 的 PFS 序列，两个 HEPN 结构域被激活产生顺式和反式切割活性（图 1-3c）。PFS 的组成和位置因物种而异，并根据实验条件而变化，其中 Cas13a 所需的 PFS 位于间隔区的 3'端，由 A、U 或 C 碱基组成（ABUDAYYEH et al., 2016; MITCHELL,

2018)。

由于 CRISPR/Cas 是一个可重编程和模块化组装的系统，抗干扰能力强和操作简便的优势使其成为研究热点，特别在生物分析化学和生物传感系统领域发展迅速。由于其灵敏度高、特异性强，各种效应器包括 Cas9、Cas12a 和 Cas13a 已经被开发，基于 CRISPR 的核酸诊断应用前景十分广阔 (GARNEAU et al., 2010; GOOTENBERG et al., 2017; GOOTENBERG et al., 2018)。

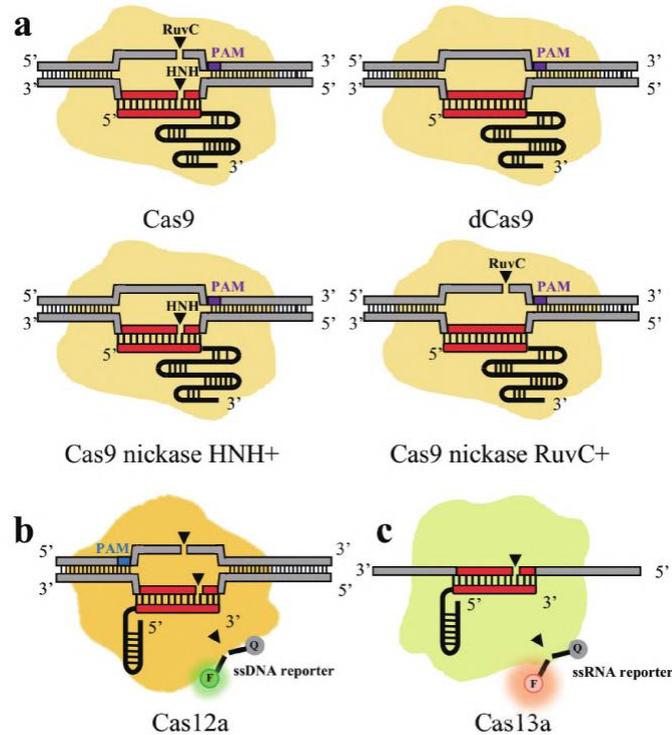


图 1-3 CRISPR-Cas 核酸酶活性概述 (李悦 et al., 2020)

Fig. 1-3 Overview of CRISPR-Cas nuclease activity

### 1.1.2 CRISPR-Cas12a 快速检测方法

Cas12a 的附带切割效应即在识别特定核酸靶标时不加选择地切割非靶标 ssDNA，产生的顺式活性是单靶点的切割，而触发的反式活性则是多个位点的剪切，附带切割效应的放大现象在生物传感系统的设计中具有非常大的应用价值。

2018 年 Doudna 课题组将 Cas12a 的反式活性与等温扩增技术相结合，建立了一种 DNA 核酸内切酶靶向的 CRISPR 反式报告方法 (DETECTR)，等温扩增的 DNA 靶标激活 Cas12a 反式活性用于切割 ssDNA 报告分子，能够快速、灵敏、特异地检测患者样本中的人乳头瘤病毒 (HPV) (图 1-4) (CHEN et al., 2018)。同年，Wang 等人将 Cas12a 附带切割活性与 PCR 和 ssDNA 荧光报告基团结合起来，建立了一小时低成本多用途高效系统 (HOLMES) (LI et al., 2018)。HOLMES 在基因型检测中进行了验证，证明能够区分人类 293T 细胞中的纯合和杂合基因型突变。并且作者还证明了反转录 PCR (RT-PCR) 和 Cas12a 的结合可以检测日本脑炎病毒 (JEV)，扩展了 Cas12a 作为生物识别系统的潜在应用。

短时间内 CRISPR 在核酸检测平台领域得到多次改进，Cas12aVDeT 在一个反应单元中结合

了 Cas12a 的反式活性和等温扩增技术, 使用 ssDNA 荧光报告系统可在蓝光下肉眼评估检测结果, 该方法检测阈值能达到单分子水平, 检测支原体污染的准确率达到 100% (WANG et al., 2019)。

基于 Cas12a 建立的核酸检测报告系统显示出高效、准确、便捷和低成本的优势, 使其在病原即时检测中发展迅速, DETECTR 被用于新型冠状病毒 (COVID19) 的侧流试纸条分析, 该方法能够在大约 40 min 内从鼻咽拭子样本中检测出 COVID19 靶基因, 相比之下, 传统技术耗时且不便携 (BROUGHTON et al., 2020)。

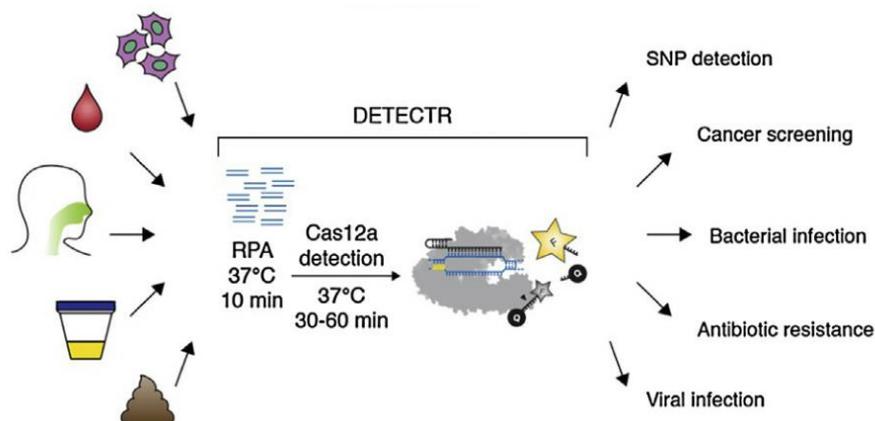


图 1-4 DETECTR 的原理图概述 (CHEN et al., 2018)

Fig. 1-4 Schematic outlining of DETECTR (CHEN et al., 2018)

## 1.2 等温扩增概述

核酸等温扩增技术是将特异性核酸片段扩增在某一特定温度下进行的一类新型分子生物技术, 扩增过程中不需要反复热变性来获得单链模板, 并且可以实时读取放大信号。此外, 建立在恒温扩增基础上的有环介导等温扩增 (LAMP)、重组酶聚合酶扩增 (RPA)、重组酶介导等温扩增 (RAA)、滚环扩增 (RCA)、基于序列的扩增 (NASBA)、指数扩增反应 (EXPAR)、链置换扩增 (SDS) 等, 与传统的 PCR 技术相比, 等温扩增技术对仪器设备的要求更低、反应时间更短, 其快速、灵敏、特异、简便、廉价的特点能够更好地满足一线核酸快速检测的需求 (LAURA et al., 2012; LU et al., 2017; MAFFERT et al., 2017)。

其中 RPA 是 2006 年由英国公司 TwistDx 研发的一种新型等温扩增技术, 主要组分包括三种酶: 能结合单链核酸的重组酶、单链 DNA 结合蛋白 (SSB) 和链置换 DNA 聚合酶, 反应的最佳温度在 37-42°C, 反应时间一般不超过 30 min (PIEPENBURG et al., 2006)。如图 1-5 所示, 重组酶与引物结合形成的复合物能够特异性识别目的序列, 与目的序列结合后会发生链交换反应同时启动 DNA 合成, 在 DNA 聚合酶作用下对目的序列进行指数式扩增, 而被替换的 DNA 链则与 SSB 结合防止其进一步替换。RPA 的引物长度通常需要达到 30-38 nt, 引物过短会降低重组率, 从而影响扩增速度和检测灵敏度。该技术无需复杂的样品处理过程, 产物可通过探针法荧光定量进行实时监测, 也可结合侧流层析试纸条、生物芯片、凝胶电泳等方法进行检测 (SHEN et al., 2011; XU et al., 2014; EL-THOLOTH et al., 2019)。RAA 和 RPA 的原理相似但重组

酶来源不同，与传统的分子生物学方法相比，RAA 作为一种新型的等温扩增技术具有快速、成本低、操作简单等优点 (SHEN et al., 2019)。

在 Fan 等人的研究中，分析了 RPA/RAA 是否可以用于非洲猪瘟病毒 (ASFV) 的现场、快速和初级筛检，并与 OIE 实时 PCR 比较验证了二者的临床性能 (FAN et al., 2020)。一组 152 例临床样本结果显示，在 39℃ 下 16 min 内 RPA 和 RAA 的分析灵敏度分别为每个反应 93.4 和 53.6 个拷贝，对 ASFV 的所有 24 种基因型具有普遍特异性，并且与其他病原体无交叉反应。对多种临床样本的检测结果表明，RPA、RAA 和 OIE 实时 PCR 的诊断结果具有良好的一致性，有希望在现场部署用于快速可靠地筛查和监测非洲猪瘟。

由严重急性呼吸综合征冠状病毒-2 (SARS-CoV-2) 引起的全球大流行及其变体的出现，对于快速即时检测方法的需求更为急迫，Li 等人提出逆转录重组酶介导等温扩增 (RT-RAA) 技术用于 SARS-CoV-2 的快速、准确检测，能够在便携式恒温荧光采集仪器中评估结果，特别是在资源有限的情况下可用于 SARS-CoV-2 的早期筛检 (LI et al., 2021)。

此外，Xiao 等人开发了一种 RAA-CRISPR/Cas12a 方法用于检测创伤弧菌，反应时长为 40 min，特异性强且敏感性高，单个反应的检测限值为 2 个拷贝，在添加的血液、粪便和虾样品中具有较高的准确性，对于人类弧菌病的早期诊断以及水产养殖和食品安全中的创伤弧菌现场检测具有很大的潜力 (XIAO et al., 2021)。

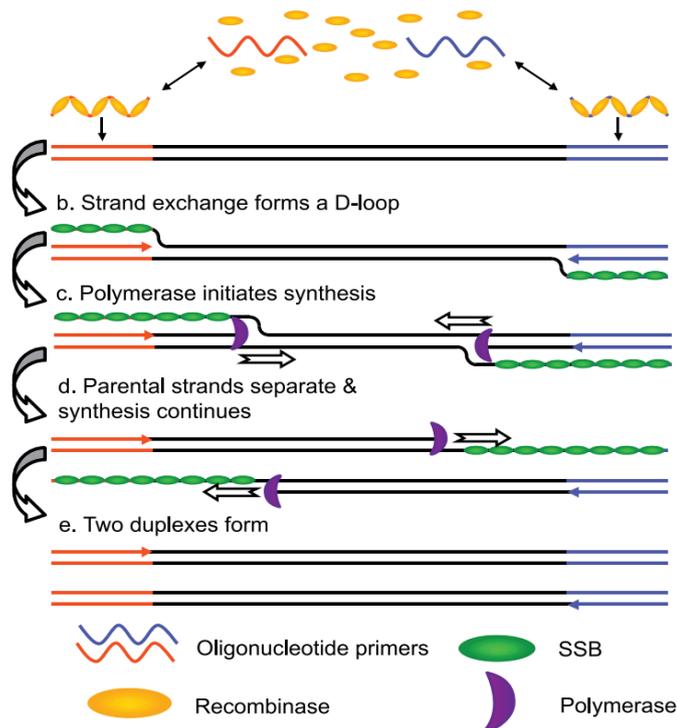


图 1-5 RPA/RAA 扩增原理图 (PIEPENBURG et al., 2006)

Fig. 1-5 Schematic diagram of RPA/RAA amplification (PIEPENBURG et al., 2006)

## 1.3 非洲马瘟及其病原检测技术

### 1.3.1 非洲马瘟概述

非洲马瘟 (African horse sickness, AHS) 是由非洲马瘟病毒 (African horse sickness virus, AHSV) 引起的马属动物的一种急性或亚急性非接触性虫媒介传染病, 通过库蠓类昆虫叮咬在易感动物间传播, 其中拟蚊库蠓是最重要的传播媒介。主要特征为发热、皮下组织水肿、肺水肿和病毒血症, 严重时伴有组织和脏器出血 (白文彬 et al., 2002)。AHSV 主要感染马属动物, 其中以幼龄马最为敏感, 其次是骡子, 驴具有耐受性, 犬也可感染 (MELLOR, 1994)。斑马是 AHSV 的天然宿主, 但其不表现感染后的临床症状 (BARNARD, 1998)。世界卫生组织将其列为 A 类动物疫病, 我国将其列为一类动物疫病。该病有明显的季节性和地域性, 常呈地方流行或暴发流行 (白文彬 et al., 2002)。

AHSV 是一种双链 RNA 病毒, 属呼肠孤病毒科环状病毒属, 基因组含 10 个片段共编码 7 种主要的结构蛋白 VP1-VP7, 和 4 种非结构蛋白 NS1-NS3、NS3A (BREMER, 1976; BREMER et al., 1990; GRUBMAN et al., 1992)。成熟病毒粒子的外壳由两种蛋白 VP2 和 VP5 组成, 内壳由两种主要蛋白 VP3 和 VP7 以及三种次要蛋白 VP1、VP4 和 VP6 组成, 其中 VP7 是重要的血清群特异性抗原, 在各型之间高度保守 (OELLERMANN et al., 1970; BREMER et al., 1990; ROY et al., 1991; ROY et al., 1994)。病毒颗粒直径约 70 nm, 病毒形态结构与蓝舌病病毒 (Blue tongue virus, BTV) 和马器质性脑病病毒 (Equine encephalosis virus, EEV) 等其他环状病毒相似。AHSV 病毒有 9 个抗原性不同的血清型, 各血清型之间的毒力强弱有所不同, 且具有交叉免疫反应 (BURROUGHS et al., 1994; ROY et al., 1994)。

AHS 潜伏期为 5-7 天, 可分为四种类型 (OELLERMANN et al., 1970)。发热型是轻度的, 通常只涉及到体温升高和眶上窝水肿, 几乎没有死亡率。它经常发生在感染弱毒株后, 或在一定程度的免疫力时, 是非洲驴和斑马唯一的临床表现 (LABORATORY et al., 2001)。心型又称亚急性型, 特点是发热且病程长达数周, 主要临床表现为皮下水肿, 尤其是头部、颈部、胸部和眶上窝, 结膜充血, 舌腹面可见瘀斑出血, 该型的特征通常是腹绞痛, 死亡率可能超过 50%。混合型是 AHS 最常见的形式, 是心型和肺型的结合, 死亡率约为 70%, 通常在发热后 3 至 6 天内死亡。肺型多呈急性, 可能发展得很快, 以至于动物在没有疾病迹象的情况下死亡。通常会表现明显的精神抑郁和发热 (39-41℃), 随后出现呼吸窘迫和严重呼吸困难。可能会出现痉挛性咳嗽和严重出汗, 或者头部和颈部伸展平卧, 最终会有大量的泡沫样液体从鼻孔排出。患有 AHS 肺型的马匹一般预后不良, 死亡率通常超过 95% (MELLOR, 1994; ROY et al., 1994)。

该病主要流行于撒哈拉沙漠南部的非洲热带和亚热带地区, 呈地方性流行, 中国目前无该病的报道, 但近年来该病已经在亚洲一些国家相继出现 (WEYER et al., 2015; KING et al., 2020)。库蠓是 AHSV 最重要的传播媒介, 而我国存在超过 300 种库蠓属昆虫, 因此我国具有暴发的潜在可能性。

### 1.3.2 非洲马瘟病毒检测方法

OIE 推荐的 AHSV 血清学检测方法包括酶联免疫吸附试验 (ELISA)、补体结合试验 (CFT) 和病毒中和试验 (VNT), 病原学检测包括普通 PCR、荧光定量 RT-PCR 和病毒分离 (张海明 et al., 2013)。

血清学诊断方法中, 病毒中和试验通常被用来评估马匹的免疫保护状态, 补体结合试验可以用来证明病毒感染和血清学调查, 但上述两种方法操作繁琐, 对实验室的要求较高, 应用范围有限。ELISA 方法可用于 AHS 抗体检测, 具有简单、快速、灵敏和特异等优势, 是目前应用最广泛的 AHS 诊断方法之一, 但由于肺型 AHS 发病快且致死率高, 还未产生抗体或者抗体水平很低时就已经死亡, 这种情况下血清学检测结果不具有准确性。

病原学诊断方法中, 病毒分离鉴定是将血液和内脏组织研磨后接种于仓鼠肾细胞 (BHK-21) 和非洲绿猴肾细胞 (AGUERO et al., 2008) 等细胞系, 一般 2-10 天可出现细胞病变, 该方法可确诊 AHS, 但对于实验条件和操作人员的要求较高, 且需要较长的时间。对于病原核酸的检测如普通 PCR 和荧光定量 RT-PCR, 具有快速、特异、检出率高等优点, 能够用于病毒感染的早期检测。荧光定量 RT-PCR 是目前广泛应用的检测技术, Quan 等人针对 VP7 和 NS2 蛋白基因建立了 AHSV 荧光定量 RT-PCR 方法, 与 BHK-21 细胞分离鉴定相比灵敏度高 10 倍 (QUAN et al., 2010)。2011 年 Monaco 等人建立的荧光定量 RT-PCR 能够同时检测 AHSV 8 型和 9 型 (MONACO et al., 2011)。2013 年 AHS 的 OIE 参考实验室使用荧光定量 RT-PCR 检测疑似感染 AHSV 的马匹血液, 经统计验证该方法的敏感性和特异性分别为 97.8% 和 99.9%, 认为该方法可推荐作为 AHSV 检测的“金标准” (GUTHRIE et al., 2013)。但是荧光定量 RT-PCR 依赖于昂贵的仪器设备, 对于资源条件缺乏的地区无法在现场进行操作, 需要将样品送至指定的实验室。为了满足可用于现场部署的诊断需求, 2017 年 Fowler 等人建立了一种快速检测 AHSV 的逆转录环介导等温扩增方法, 诊断敏感性和特异性为 100%, 为现场应用提供了快速、低成本的 AHS 诊断方法 (FOWLER et al., 2017)。

不同的诊断方法各有优缺点, 根据实际情况进行选择合适的方法才能够合理指导疫情的防控措施。

## 1.4 马腺疫及其病原检测技术

### 1.4.1 马腺疫概述

马腺疫是由马链球菌马亚种 (*Streptococcus equi subspecies equi*, *S. equi*) 感染引起的一种马属动物常见的急性接触性上呼吸道传染病。属于三类疫病, 其症状特点是体温升高, 颌下淋巴结脓肿及急性化脓性炎症, 上呼吸道咽黏膜发生卡他性化脓性炎症, 发病率高但死亡率低 (TIMONEY, 1993)。*S. equi* 属于 Lancefield C 群, 电子显微镜下呈圆形或卵圆形, 菌体表面具有各种黏附因子, 包括类 M 蛋白、纤连蛋白结合蛋白等, 其中类 M 蛋白是 *S. equi* 一种重要的表面蛋白和毒力因子, 与其进化亲本的毒力增加有关, 具有调理素功能, 且能够抵抗抗体的吞噬细胞对其的吞噬作用 (GALÁN et al., 1987; KELLY et al., 2006)。

*S. equi* 通过口鼻进入，附着在扁桃体隐窝和邻近浅表淋巴结上，感染后在局部淋巴结增殖速度快，有研究报道在实验室感染强毒株后 6-12 天内可能出现菌血症 (EVERS, 1968)。感染 *S. equi* 的马属动物首先表现的临床症状是体温升高，而后出现上呼吸道卡他性炎症，表现为粘液脓性分泌物和急性肿胀，在颌下淋巴结形成脓肿，一过性的马腺疫在加强饲养管理后即可自愈，有时患病马匹会被肿胀的淋巴结堵塞呼吸道造成窒息。疾病的严重程度因动物不同而有很大差异，成年患病马症状较轻，而幼驹可能发展为淋巴结肿胀破溃，若马匹的免疫力较弱时，病原菌可能由化脓灶转移至其他组织器官或形成全身性脓毒败血症 (刘建柱 et al., 2018)。

春秋季是马腺疫的高发期，呈散发性，健康动物与发病动物的脓汁接触造成直接传播，或者接触被污染的垫料食物间接感染。马最易感，其次为驴骡，幼驹发病率较高，曾患过该病的动物具有强的免疫力。该病在世界范围内传播的关键是它能够在恢复后健康马的体内建立持续感染，成为长期的病原携带者，将病原传播给接触过的其他马属动物 (NEWTON et al., 1997a; 1997b)。

2008 年英国发生了 700 多例散发性马腺疫疫情，最严重时有 200 多匹马感染 (IVENS et al., 2011)。马腺疫作为常见细菌性传染病，其流行范围广泛且趋势不断上升，对马属动物的健康及养殖业的经济影响较大。

#### 1.4.2 马链球菌检测方法

目前 *S. equi* 的实验室诊断方法较少，主要包括细菌分离鉴定和 PCR 检测。

细菌分离鉴定一般取患病马破溃的淋巴结脓汁，由于与外界环境直接接触，样品很容易受到非目的菌的污染，且其他  $\beta$  溶血菌也会对结果判定造成干扰，需要进一步通过生化试验来鉴定。此外，对于从上呼吸道采集的样本中 *S. equi* 数量必须比其他呼吸道菌群更具竞争力，才能在培养基中优势生长。该方法一般需要 48h 以上才能获得诊断结果，耗时较长，增加了患病马周围动物群感染的风险 (MARTHA et al., 2015)。

PCR 已成为诊断马腺疫的重要手段，尤其是对于未出现颌下淋巴结肿胀和被毛脱落的轻症感染马匹，PCR 可以直接对患病马的鼻腔灌洗液进行检测 (WEBB et al., 2012)。2010 年一种用于从临床样本中诊断马链球菌的巢式 PCR 方法被报道，该方法对鼻道和脓肿样本的诊断敏感性分别为 45% 和 80%，而分离培养鉴定诊断敏感性为 18% 和 20%，PCR 的诊断敏感性显著高于细菌培养 (GRØNBAEK et al., 2010)。虽然 PCR 反应中死亡的细菌也会被检测呈阳性，但 PCR 仍然是灵敏准确诊断需求中的关键手段。

### 1.5 马流产沙门氏菌病及其病原检测技术

#### 1.5.1 马流产沙门氏菌病概述

马流产沙门氏菌病也称为马副伤寒，是由 *S. abortus equi* 引起的一种马属动物宿主限制性传染病，可引起孕马流产、睾丸炎、新生幼驹败血症、多发性脓肿和多发性关节炎 (SMITH et al., 1981)。马流产沙门氏菌 (*S. abortus equi*) 属于沙门菌第一亚属，为革兰氏阴性菌，鞭毛是主要毒力因子，鞭毛蛋白的缺失会影响其侵袭能力 (UZZAU et al., 2000)。 *S. abortus equi* 的鞭毛蛋白

由 *FljC* 或 *FljB* 基因编码, *FljC* 基因编码I相鞭毛蛋白 FljC, 而 *FljB* 基因编码II相鞭毛蛋白 FljB (SIMON et al., 2007; 黄静玮 et al., 2011)。

各年龄段的马均易感染 *S. abortus equi*, 但其临床症状各不相同 (SMITH, 1979; RODRIGUEZ et al., 2006)。妊娠母马一般无明显症状, 但在孕晚期可能突发流产, 绝大多数为死胎, 少数存活的胎儿在出生几天内也会相继死亡; 有的母马在流产后体温升高, 精神不振, 流产后引起的子宫炎可能长期不愈而形成不孕症或习惯性流产。公马除发热外, 主要表现为睾丸炎和附睾炎, 精液中含有大量马流产沙门氏菌并且慢性病的公马精液中长期携带该菌。马驹的发病率和死亡率高于成年马, 表现为败血症和多关节炎, 关节因肿大或腱鞘炎而跛行, 有时会发生脓肿, 康复后部分马驹会成为慢性的携带者。

本病在 1893 年首次被报道, 虽然通过严格的饲养管理进行防控, 但是之后仍旧在全球范围暴发, 包括巴西 (JUFFO et al., 2017)、意大利 (MARENZONI et al., 2012; GRANDOLFO et al., 2018)、克罗地亚 (MADIĆ et al., 2010)、阿根廷 (BUIGUES et al., 2012; LLORENTE et al., 2016)、日本 (AKIBA, 2003; NIWA et al., 2016) 等国家。上世纪 80 年代我国北部地区曾陆续暴发该病, 给当地马养殖业造成了严重的经济损失 (孙殿和, 1984; 郑慎修, 1986)。2017 年新疆伊犁地区的 818 份血清样品调查显示 *S. abortus equi* 抗体阳性率为 25.31% (袁贝 et al., 2017), 此外 *S. abortus equi* 在驴流产中也被多次发现报道 (刘建国 et al., 2014; 张铁军 et al., 2016; 孙莹慧 et al., 2019)。该病全年都可发生, 但主要发生于春秋两季, 大多数表现为散发, 有时呈地方流行性。流产胎儿、羊水及阴道分泌物是本病的主要传染源, 患病公马可通过精液排菌。本病在马群中长期潜伏, 康复后的马匹体内仍有病原菌存在, 经常作为隐性携带者成为非疫区新的传染源 (NIWA et al., 2016)。

*S. abortus equi* 的感染暴发使马匹的繁殖率和马驹存活率显著下降, 对马属动物养殖及相关产业的健康持续发展造成威胁。

### 1.5.2 马流产沙门氏菌检测方法

目前 *S. abortus equi* 的实验室诊断方法主要包括细菌分离鉴定、试管凝集、微量凝集和 ELISA。传统分离培养是 *S. abortus equi* 的检测金标准, 可根据沙门氏菌显色培养基和菌落生长性状进行判定, 该方法也曾有报道在暴发马沙门氏菌病的胎儿中未分离到 *S. abortus equi* (SINGH et al., 1971)。

试管凝集是针对抗体的血清学检测方法, 参照我国农业部发布的行业标准 NY/T 570-2002 步骤进行检测, 一个样品至少需要 6 支反应管, 加样混匀在 37°C 反应 24h 后进行结果判读。该过程加样和判读的工作量大, 不适合大量样品的检测, 处于临界值的凝集现象不明显, 易出现误判 (MATSUI, 1961; GALL et al., 2006)。微量凝集是试管凝集的优化方法, 适用于大量样品的检测 (杨康 et al., 2015; 郭奎 et al., 2020)。

Gall 等人最初建立的马流产沙门氏菌 iELISA 方法是利用脂多糖 (LPS) 进行抗原包被, 但是 LPS 的成分复杂, 不同种属沙门氏菌之间具有一定的相似, 导致该方法存在不同程度的交叉反应 (GALL et al., 2006)。杨康等人利用 *S. abortus equi* 全菌进行抗原包被建立了一种 iELISA, 与 LPS 相比全菌成分更为复杂, 非特异性交叉反应也是该方法的主要问题 (杨康 et al., 2015)。

另外,目前针对沙门氏菌属其他成员已有一些基于 PCR 的检测方法报道,Rahn 等人针对鼠伤寒沙门氏菌 *invA* 基因建立了扩增沙门氏菌的一种 PCR 检测方法,对 630 株不同血清型的沙门氏菌和 142 株非沙门氏菌进行鉴定,该方法能够扩增所有沙门氏菌,但无法区分不同型的沙门氏菌(RAHN et al., 1992)。Persson 等人针对都柏林沙门氏菌 *vagC* 基因建立了荧光定量多重 PCR 技术,检测了 50 株都柏林沙门氏菌、20 株其他血清型沙门氏菌及 10 株其他非沙门氏菌,结果显示该方法敏感性和特异性为 100% (PERSSON et al., 2012)。而针对 *S. abortus equi* 的核酸诊断领域还存在较大空缺,因此,一种灵敏、特异、快速、方便的核酸检测方法对预防和治疗马流产沙门氏菌病具有重大意义。

## 1.6 研究目的与意义

随着国际贸易经济的增加,马属动物传染病疫情也在不断发生变化,我国是马和驴养殖大国,近年来随着马产业快速发展,面临的疾病防控挑战也在不断增加。

AHS 曾流行于非洲和欧洲,由于其致死率较高,给当地马产业带来严重经济损失并阻碍其健康发展,随着国际贸易增加和中国马匹养殖和马术的进一步发展,泰国暴发非洲马瘟传入中国的风险越来越大。马腺疫是马属动物最常见的细菌性传染病,传播范围广泛,且痊愈后的马匹能够长期携带病原菌,对马群的健康养殖影响较大。马流产沙门氏菌病能够导致孕马流产、新生幼驹败血症,康复马可能作为隐性携带者成为非疫区的传染源,该病近年来在我国多地暴发,严重降低了马匹的繁殖力及幼驹存活率。

上述三种马传染病对我国及其他地区的马产业健康发展都具有严重的威胁,为了能够合理地采取防控措施,分子诊断技术是必不可少的。目前已有的病原分离鉴定,对于动物疫病的防控、治疗和预后有着至关重要的作用。目前已有一些诊断方法各有优缺点,但大多依赖于实验室的大型仪器设备或者对操作人员的专业性要求较高,不利于现场部署,因此本研究的目的在于针对 AHSV、*S. equi* 和 *S. abortus equi* 建立快速简便、灵敏准确的核酸检测方法,为我国的马业防控提供技术储备。

## 第二章 LbCas12a 蛋白表达及纯化

### 2.1 材料

#### 2.1.1 质粒和菌株

质粒 pC013-Twinstrep-SUMO-huLwCas13a 和 6His-MBP-TEV-huLbCas12a 均为本实验室保存。E.coli DH5 $\alpha$  和 TSsetta (DE3) 感受态购自北京擎科生物有限公司。

#### 2.1.2 主要试剂

表 2-1 主要试剂

Table 2-1 The reagents used in this research

试剂	公司
KOD 高保真 PCR 酶	TOYOBO
FastPure Gel DNA Extraction mini Kit	诺维赞
In-fusion 连接酶	中美泰和
胰蛋白胨	OXOID Ltd
酵母提取物	OXOID Ltd
Protein Ladder	Thermo
Strep 亲和层析预装柱	iBA
Superose 6 increase 10/300 GL	GE healthcare
SUMO 蛋白酶	本实验室保存
快速染胶液	博奥龙

#### 2.1.3 主要设备仪器

表 2-2 主要使用仪器

Table 2-2 The instruments used in this research

仪器	公司
核酸电泳仪 (MP-300V)	美国 Major Science 公司
PCR 仪 (Sure Cyclor 8800)	Agilent Technologie
酶标仪 (ELx800)	Bio Tek
凝胶成像分析系统	Bio Red
超纯水仪 (GENPURE PRO)	Thermo
伯乐蛋白电泳仪 (165-8004)	Bio Red
液相色谱蛋白分析仪	AKATA

### 2.1.4 主要溶液配制

Strep 结合/洗涤缓冲液: 100 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Strep 洗脱缓冲液: 100 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Biotin

SUMO 缓冲液: 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.2% NP-40, 1 mM DTT

LbCas12a 保存缓冲液: 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 5% (v/v) glycerol, 1 mM DTT

## 2.2 方法

### 2.2.1 LbCas12a 原核表达载体构建

以 pC013-Twinstrep-SUMO-huLwCas13a 质粒为模板设计引物扩增 pET 载体 (反应体系见表 2-3, 反应程序见表 2-4), 以 6His-MBP-TEV-huLbCpf1 质粒为模板设计引物扩增 LbCas12a 片段 (反应体系见表 2-3, 反应程序见表 2-5), 引物均由长春库美公司合成。根据 FastPure Gel DNA Extraction mini Kit 说明书获得胶回收的扩增产物, 并将 LbCas12a 和 pET 载体片段根据表 2-6 的 In-fusion 技术连接, 然后将重组质粒转化至 DH5 $\alpha$  感受态, 涂布在氨苄平板培养基上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 挑取单克隆菌落扩大培养并送至长春库美公司测序。

上下游引物序列:

LbCas12a-F: 5'-TTAATGTTTCACGCTGGTCTGC-3'

LbCas12a-R: 5'-ATGAGCAAACCTGGAGAAGTTC-3'

pET-F: 5'-AGCGTGAAACATTAAGCGGCCGCACTCGAGGCCCG-3'

pET-R: 5'-CTCCAGTTTGCTCATGGATCCACCAATCTGTTCTCTGTGAG-3'

表 2-3 PCR 反应体系

Table 2-3 PCR reaction system

组分	体积 ( $\mu$ L)
2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX Neo	25
2 mM dNTPs	10
上游引物 (10 $\mu$ M each)	1
下游引物 (10 $\mu$ M each)	1
模板 (10 ng/ $\mu$ L)	1
KOD FX Neo (1 U/ $\mu$ L)	1
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50

表 2-4 LbCas12a 片段的 PCR 反应程序

Table 2-4 PCR reaction procedure of LbCas12a fragment

步骤	温度	时间	循环
预变性	94°C	2 min	1
变性	98°C	10 sec	30
退火	55°C	30 sec	30
延伸	68°C	3 min 40 sec	30
延伸	68°C	10 min	1

表 2-5 pET 载体的 PCR 反应程序

Table 2-5 PCR reaction procedure of pET vector

步骤	温度	时间	循环
预变性	94°C	2 min	1
变性	98°C	10 sec	30
退火	55°C	30 sec	30
延伸	68°C	6 min	30
延伸	68°C	10 min	1

表 2-6 In-fusion 连接体系

Table 2-6 In-fusion reaction system

组分	体积 (μL)
DNA 片段和线性化载体 (片段: 载体=3: 1)	0.5-5
2×Seamless Master Mix	5
ddH <sub>2</sub> O	Up to 10

注: In-fusion 重组反应 50°C 15 min, 然后将离心管置于冰上。

### 2.2.2 LbCas12a 蛋白的表达

(1) 将测序正确的 pET-LbCas12a 质粒转化至 Rosetta (DE) 感受态, 菌液涂布在氨苄平板培养基上 37°C 过夜培养, 挑取单克隆菌落扩大培养;

(2) 取 1% 新鲜菌液接种至含 Amp 抗性的 LB 培养基中, 37°C 摇菌培养;

(3) 当 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6-0.8 时加 300 μM 的 IPTG, 分别在 37°C、30°C 和 16°C 诱导表达 4 h、8 h 和 14 h;

(4) 将诱导表达后的菌液 6000 rpm 离心 10 min, PBS 重悬菌液;

(5) 重悬菌液超声裂解, 超声 5 sec 暂停 5 sec, 超声时间 10 min, 重悬液变澄清;

(6) 将超声处理后的菌液 13000 rpm 离心 10 min, 分离上清液;

(7) 取上清和沉淀重悬液各 50 μL 用 loading buffer 处理, 样品进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色。

## 2.2.3 LbCas12a 蛋白的纯化

### 2.2.3.1 使用 Strep 亲和层析纯化 LbCas12a 蛋白

- (1) 用 2 倍柱体积的结合/洗涤缓冲液平衡 Strep 亲和层析柱；
- (2) 将超声裂解后的菌液上清加入层析柱中，缓慢流穿使 LbCas12a 充分结合至柱上；
- (3) 上清液滤净后加入 5 倍柱体积的结合/洗涤缓冲液，将未结合的杂蛋白洗净；
- (4) 加入 1 倍柱体积 SUMO 酶切体系（SUMO 缓冲液，200  $\mu$ L SUMO 蛋白酶/mL 体系），30 $^{\circ}$ C 孵育 3 h；
- (5) 加入 3 倍柱体积 SUMO 缓冲液，将 SUMO 酶切后的 LbCas12a 蛋白从层析柱上收集至离心管；
- (6) 加入 3 倍柱体积的洗脱缓冲液，将 SUMO 酶切后残留在柱上的 Strep 标签洗脱，层析柱可回收重复使用；
- (7) 使用微量分光光度计测量收集到的 LbCas12a 蛋白浓度。

### 2.2.3.2 使用分子筛纯化 LbCas12a 蛋白

- (1) 将亲和纯化的 LbCas12a 缓冲液使用默克超滤离心管置换成 PBS，并浓缩蛋白，在 4 $^{\circ}$ C 下离心；
- (2) 用 PBS 冲洗 pump A 和整个系统；
- (3) 用 PBS 平衡两个柱体积；
- (4) 将收集盘和收集管准备好，用 PBS 冲洗 Loop 环，根据层析柱型号设置相应的程序；
- (5) 将准备好的 LbCas12a 蛋白样品上样，运行程序；
- (6) 根据分子筛图谱结果收取收集管中的样品，进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色；
- (7) 根据分子筛图谱和 SDS-PAGE 电泳结果，将含有 LbCas12a 的样品混合收集，使用默克超滤离心管将分子筛纯化收集的 LbCas12a 蛋白置换和浓缩至 LbCas12a 保存缓冲液中；
- (8) 使用微量分光光度计测量 LbCas12a 的浓度，分装保存至 -80 $^{\circ}$ C 待使用。

## 2.3 结果

### 2.3.1 LbCas12a 原核表达载体的构建

为了获得纯化的 LbCas12a 蛋白，将 LbCas12a 构建至带有 Strep-Tag II、6 $\times$ His 和 SUMO 蛋白酶切割位点的 pET 原核载体上，分别利用 PCR 扩增 LbCas12a 和 pET 载体片段获得预期大小条带，凝胶电泳结果如图 2-1，并通过 In-fusion 连接技术获得 pET-LbCas12a 原核表达质粒（图 2-2）。

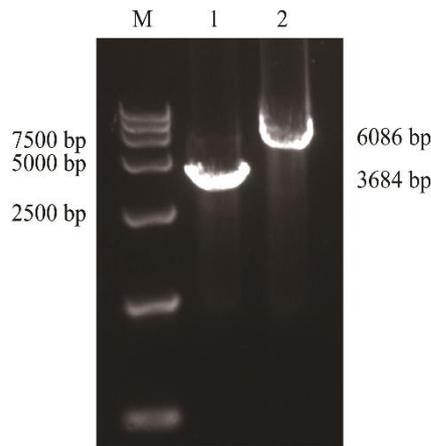


图 2-1 LbCas12a 和 pET 载体 PCR 扩增结果

Fig. 2-1 PCR product of LbCas12a and pET vector

M: DNA 分子质量标准, 1: LbCas12a; 2: pET 载体

M: DL15000 DNA Marker, 1: LbCas12a; 2: pET Vector

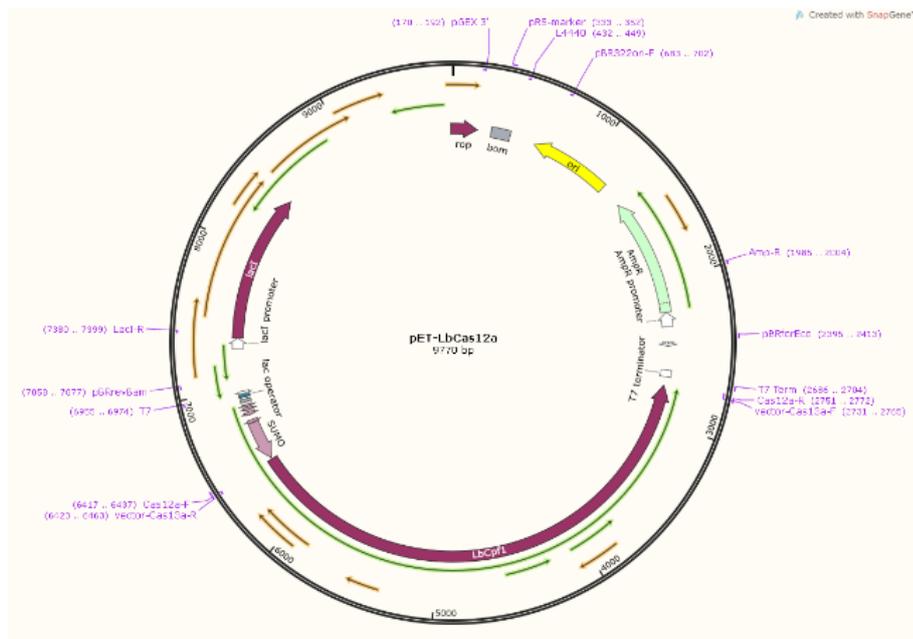


图 2-2 pET-LbCas12a 质粒图谱

Fig. 2-2 Plasmid profiles of pET-LbCas12a

### 2.3.2 LbCas12a 蛋白的表达

为达到 LbCas12a 蛋白的最佳表达效果, 在不同诱导温度条件下对目的蛋白表达情况进行比较。将正确构建的 pET-LbCas12a 质粒转化至 Rosseta (DE3) 感受态细胞, 进行少量预表达, 将超声裂解后的上清和沉淀产物分为 12 组样品, 具体表达条件见表 2-7, SDS-PAGE 结果如图 2-3 显示, 分别在 37℃、30℃和 16℃下诱导表达, 随着诱导温度降低, 目的蛋白在上清中的表达增多, 诱导温度为 16℃时, LbCas12a 蛋白在上清中表达量最多, 因此将最佳诱导温度确定为

16℃。不同诱导温度下的 IPTG 浓度分别为 0 μmol/L 和 300 μmol/L，IPTG 浓度为 0 μmol/L 时 LbCas12a 蛋白表达量较少，IPTG 浓度为 300 μmol/L 时 LbCas12a 蛋白表达量明显增多。因此 IPTG 浓度 300 μmol/L，诱导温度 16℃ 作为最终的诱导表达条件。

表 2-7 LbCas12a 原核表达条件优化

Table 2-7 Optimization of LbCas12a prokaryotic expression

编号	组分	诱导温度 (°C)	IPTG 诱导浓度 (μmol/L)	诱导时间 (h)
1	上清	37	0	4
2	沉淀	37	0	4
3	上清	37	300	4
4	沉淀	37	300	4
5	上清	30	0	8
6	沉淀	30	0	8
7	上清	30	300	8
8	沉淀	30	300	8
9	上清	16	0	14
10	沉淀	16	0	14
11	上清	16	300	14
12	沉淀	16	300	14

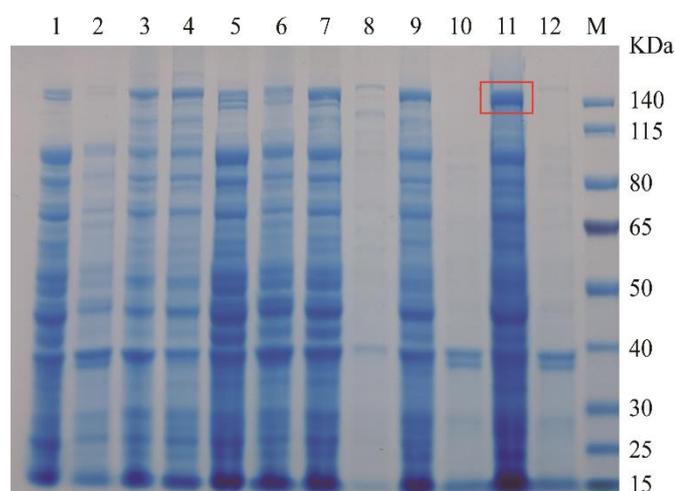


图 2-3 LbCas12a 蛋白在不同条件下的表达结果

Fig. 2-3 Expression of LbCas12a protein under different conditions

### 2.3.3 LbCas12a 蛋白的纯化

使用 300 μM IPTG 在 16℃ 下诱导 LbCas12a 蛋白表达 14 h，将收获的细胞重悬、超声处理和离心。上清中带有 Strep-Tag II 的 LbCas12a 蛋白结合至 Strep-Tactin 琼脂糖凝胶层析柱上，被 SUMO 蛋白酶消化洗脱，去除 C 末端的标签。为了进一步获得更加纯净的 LbCas12a 蛋白，通过

AKTA Pure 使用分子筛层析柱纯化, SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色结果如图 2-4。经 Strep 亲和层析和分子筛纯化获得高纯度的 LbCas12a 蛋白。

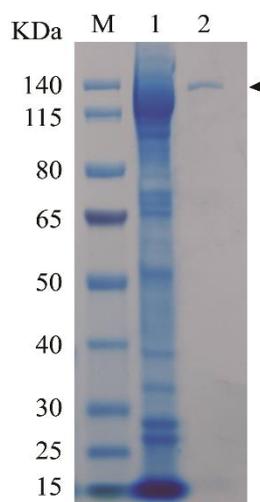


图 2-4 LbCas12a 蛋白纯化结果

Fig. 2-4 Purification of LbCas12a protein

M: 蛋白分子质量标准, 1: 结合 Strep 亲和柱后 SUMO 酶切纯化, 2: 分子筛层析

M: Protein Ladder, 1: Purified by SUMO enzyme digestion after binding Streptavidin Agarose Column

2: Gel filtration chromatography

## 2.4 讨论

在本章节中成功构建了 LbCas12a 的原核表达载体, 优化得到最佳表达条件, 并通过亲和层析与分子筛层析获得高纯度的 LbCas12a 蛋白。实验方法参考已有的文献报道 (CHEN et al., 2018), 并在此基础上做出改进。

原核表达系统与真核表达系统相比, 成本低廉并且获得的目的蛋白量更多。本实验保存的 pET 原核载体中含有 Strep-Tag II、6×His 和 SUMO 蛋白酶切割位点, 多标签载体使得 LbCas12a 的纯化方式具有可选择性。前期实验发现, 与镍柱相比使用 Strep-Tactin 琼脂糖凝胶层析柱纯化效果更好。由于多标签的蛋白分子量较大, 可能对 LbCas12a 具有生物活性影响, 在层析柱上对 LbCas12a 进行 SUMO 蛋白酶孵育, 能够确保收集到的 LbCas12a 都充分去除了标签蛋白。进一步分子筛层析去除 SUMO 蛋白酶和其他少量杂蛋白, 使得到的 LbCas12a 纯度更高。

为了防止反复冻融降低 LbCas12a 的酶活性, 在常取用的分装管中加入 50% 的甘油后避免了 LbCas12a 的冻融。

## 第三章 非洲马瘟病毒可视化检测方法（AHSV-RT-RAA-Cas12a）建立

### 3.1 材料

#### 3.1.1 质粒、菌株和基因组

参考非洲马瘟病毒 7 型 KT030566.1 毒株 VP7 蛋白基因序列，由北京擎科生物有限公司合成质粒 pMV-VP7；E.coli DH5 $\alpha$  和 TSsetta（DE3）感受态细胞购买自北京擎科生物有限公司；马传染性贫血病病毒（EIAV）、马动脉炎病毒（EAV）、马疱疹病毒（EHV-1/4）、马流感病毒（EIV）、马链球菌马亚种（*S. equi*）、马流产沙门氏菌（*S. abortus equi*）均由本实验室保存。

#### 3.1.2 主要试剂

表 3-1 主要试剂

Table 3-1 The reagents used in this research

试剂	公司
KOD 高保真 PCR 酶	TOYOBO
FastPure Gel DNA Extraction mini Kit	诺维赞
pMD18-T	TaKaRa
胰蛋白胨	OXOID Ltd
酵母提取物	OXOID Ltd
HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit	NEB
RNA Clean & Concentrator™	Zymo Research
RAA 核酸扩增试剂盒	奇天基因生物科技有限公司
FastFire qPCR PreMix(Probe)(FP208)	天根
NEB buffer 2.1	NEB

#### 3.1.3 主要设备仪器

表 3-2 主要使用仪器

Table 3-2 The instruments used in this research

仪器	公司
核酸电泳仪（MP-300V）	美国 Major Science 公司
PCR 仪（Sure Cycler 8800）	Agilent Technologie
金属浴加热器	天根生化科技有限公司
凝胶成像分析系统	Bio Red
QuantStudio 5	美国 ABI

## 3.2 方法

### 3.2.1 VP7 蛋白基因的重组质粒构建及体外转录

#### 3.2.1.1 pMD18-T-T7-VP7 重组质粒构建

以 pMV-VP7 质粒为模板设计引物扩增带有 T7 启动子的 VP7 蛋白基因全长序列 (表 3-3), 引物由长春库美公司合成。PCR 反应体系和胶回收方法同 2.2.1, 将获得的的目的片段连接至 pMD18-T, 转化至 DH5 $\alpha$  感受态, 在氨苄平板培养基上 37°C 过夜培养, 挑取单克隆菌落扩大培养并送至长春库美公司测序。

上下游引物序列:

T7-AHSV-VP7-F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTAAAATTCGGTTAGGATGGAC-3'

T7-AHSV-VP7-R: 5'-GTAAGTGTATTCGGTATTGACGT-3'

表 3-3 VP7 蛋白基因的 PCR 反应程序

Table 3-3 PCR reaction procedure of VP7 gene

步骤	温度	时间	循环
预变性	94°C	2 min	1
变性	98°C	10 sec	30
退火	55°C	30 sec	30
延伸	68°C	1 min 15 sec	30
延伸	68°C	10 min	1

#### 3.2.1.2 VP7 蛋白基因体外转录

以 PCR 获得的 T7-VP7 全长为模板进行体外转录, 根据 HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit 说明书, 反应体系包括 17  $\mu$ L Nuclease-free water, 10  $\mu$ L NTP Buffer Mix, 1  $\mu$ L 模板 DNA, 2  $\mu$ L T7 RNA Polymerase Mix, 经过涡旋混匀后置于 37°C 孵育 4 h。反应结束后加入 20  $\mu$ L Nuclease-free water 和 2  $\mu$ L DNase I (RNase-free), 涡旋混匀后 37°C 孵育 15 min, 该步骤目的在于消化残留的 DNA。

### 3.2.2 AHSV TaqMan 实时荧光定量 PCR

根据表 3-4 的荧光定量 PCR 反应程序, 使用 FastFire qPCR PreMix 试剂盒, 以非洲马瘟病毒 7 型 KT030566.1 毒株 VP7 蛋白基因为模板序列, 参考 OIE 手册设计荧光定量 PCR 引物和探针 (GUTHRIE et al., 2013), 用于 AHSV TaqMan 实时荧光定量 PCR, 引物均由长春库美公司合成。

AHSV 荧光定量 PCR 上下游引物和探针:

AHSV-VP7-2013-F: 5'-AGAGCTCTTGTGCTAGCAGCCT-3'

AHSV-VP7-2013-R: 5'-GAACCGACGCGACACTAATGA-3'

Probe: 5'-FAM-TGCACGGTCACCGCT-MGB-3'

表 3-4 AHSV-VP7 荧光定量 PCR

Table 3-4 Real-time fluorescence quantitative PCR reaction procedure of AHSV-VP7

步骤	温度	时间	循环
反转录	50℃	30 min	1
预变性	95℃	3 min	1
变性	95℃	15 sec	40
延伸	60℃	30 sec	40

### 3.2.3 crRNA 设计与 Cas12a 反应体系

#### 3.2.3.1 crRNA 设计与合成

在 NCBI 数据库中获取 18 株非洲马瘟 VP7 蛋白基因序列, 利用 MegAlign 软件进行比对分析, 针对保守区域设计十条 crRNA (表 3-5)。crRNA 引物包括 T7 启动子、LbCas12a 重复序列 (不同种类和来源的 Cas 蛋白结合序列不同) 和间隔序列 (识别靶序列), 所有引物由长春库美公司合成。将合成的上下游两条引物等量混合, 在 95℃ 下反应 5 min 然后室温退火形成双链 DNA。根据方法 3.2.1.2, 双链 DNA 在 37℃ 下过夜孵育转录为 crRNA。根据 RNA Clean & Concentrator 试剂盒说明书对转录后的 crRNA 进行纯化, 分装保存在 -80℃。

表 3-5 针对 AHSV-VP7 蛋白基因的 crRNA

Table 3-5 crRNA targeting the AHSV-VP7 gene

名称	序列 (5'-3')
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA1	uaauuucuacuaaguguagauGCUAGCAGCCUACCACUAGU
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA2	uaauuucuacuaaguguagauUGCUGAUAAGUACGCAUAA
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA3	uaauuucuacuaaguguagauGUAUACGUCAAUACCGAAU
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA4	uaauuucuacuaaguguagauGCGGCAUUGAACGUCCAAU
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA5	uaauuucuacuaaguguagauCUUGGUCCGAAUGUCUGCAU
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA6	uaauuucuacuaaguguagauCACCGACUGAAAGGAAUGAA
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA7	uaauuucuacuaaguguagauAGACCAGAUUUCAGAAUGAA
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA8	uaauuucuacuaaguguagauUGCACGGUCACCGCUUUCAU
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA9	uaauuucuacuaaguguagauAUUAGUGUCGCGUCGGUUCU
AHSV-VP7-LbCas12a-crRNA10	uaauuucuacuaaguguagauUCAGCAUAAGAACCGACGCG

#### 3.2.3.2 Cas12a 反应体系

整个 25  $\mu$ L 反应体系包括 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ NEB buffer 2.1, 1.2  $\mu$ M crRNA, 0.4  $\mu$ M 纯化的 LbCas12a, 0.4  $\mu$ M ssDNA 荧光报告分子 (5'-6-FAM-TTATT-BHQ-3', 上海生工生物工程技术公司合成) 和 1  $\mu$ L DNA 模板或者 RAA 产物。在 485nm 激发波长和 520nm 发射波长下, 使用荧光定量仪 37℃ 孵育 50 分钟, 每 30 秒取一次荧光值, 进行荧光动力学分析。运行程序结束后的反应管可以在紫外下进行肉眼观察荧光。

### 3.2.4 RAA 引物设计和 RAA 反应体系

RAA 反应对于 100-200 bp 的片段扩增效率最佳, 引物长度一般为 30-38 nt, 引物过短会降低重组率, 从而影响扩增速度和检测灵敏度。根据 AHSV-VP7 基因筛选的最佳 crRNA 靶序列, 在其上下游设计 RAA 扩增引物, 对于一些单碱基突变位点使用简并碱基。根据 RAA 核酸扩增试剂盒说明书进行 RAA 反应, 首先在反应管中添加 25  $\mu\text{L}$  缓冲液 V, 2  $\mu\text{L}$  F/R 和 16.5  $\mu\text{L}$  纯化水, 手弹混匀反应管中的冻干粉, 短暂离心将液体都收集到管底, 然后在每个管盖内测添加 2.5  $\mu\text{L}$  乙酸镁, 向管内液面下加入 2  $\mu\text{L}$  模板 DNA, 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 30 分钟。

AHSV-RAA 上下游引物:

AHSV-VP7-RAA-F1: 5'-GAGCTCTTGTGCTAGCAGCCTACCACTAGTGGC-3'

AHSV-VP7-RAA-R1: 5'-GACGTATTACTTATGCGTACTTTATCAGCAT-3'

AHSV-VP7-RAA-F2: 5'-CCAGTAGGCCAGATCAACAGAGCTCTTGTGC-3'

AHSV-VP7-RAA-R2: 5'-GTGTATTTCGGTATTGACGTATTACTTATGCG-3'

AHSV-VP7-RAA-F3: 5'-GTARGTGTATTTCGGTATTGACGTATTACTTATGCG-3'

AHSV-VP7-RAA-R3: 5'-GCWGAYGTGTATGCGGCTTTRAGRCCAGAYTTCAG-3'

### 3.2.5 敏感性和特异性实验

#### 3.2.5.1 敏感性实验

将 pMD18-T-VP7 进行十倍梯度稀释制备  $10^7$ - $10^0$  copies/ $\mu\text{L}$  的质粒标准品, 并将体外转录制备的 VP7-RNA 十倍梯度稀释制备  $10^8$ - $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  的 RNA 标准品。根据表 3-8 体系进行 AHSV-RT-RAA-Cas12a 方法, 验证两种模板的检测限值, 同时按照 3.3.2 进行 OIE 荧光定量方法检测 RNA 标准品, 比较本研究建立的 AHSV-RT-RAA-Cas12a 方法与 OIE 荧光定量方法的敏感性。

#### 3.2.5.2 特异性实验

利用 AHSV-RT-RAA-Cas12a 方法和 OIE 荧光定量 PCR 方法, 对马传染性贫血病毒 (EIAV)、马疱疹病毒 1/4 (EHV-1/4)、马流感病毒 (EIV)、马动脉炎病毒 (EAV)、马链球菌马亚种 (*S. equi*)、马流产沙门氏菌 (*S. abortus equi*) 提取的基因组 DNA 或者 RNA 与体外转录制备的 VP7-RNA 进行检测, 判断该方法与马属动物其他传染病病原是否具有交叉反应。

### 3.2.6 模拟临床样品检测

为评价建立的 AHSV-RT-RAA-CRISPR 方法在真实样品中是否具有检测性能, 将 VP7 蛋白基因体外转录的 RNA 添加至全血和脏器组织提取的基因组 RNA, 共制备 20 份临床模拟样品 (包括 S1-10 全血模拟样品和 S11-20 组织模拟样品), 对这 20 份临床模拟样本采用非洲马瘟 RT-RAA-CRISPR 方法和 OIE 实时荧光定量 PCR 进行检测。

## 3.3 结果

### 3.3.1 VP7 蛋白基因的质粒构建及体外转录

#### 3.3.1.1 VP7 蛋白基因质粒构建

以 pMV-VP7 为模板通过 PCR 扩增带有 T7 启动子的 VP7 全长，琼脂糖凝胶电泳获得与预期大小相符的特异性条带（图 3-1），将回收后的目的片段连接至 pMD18-T 载体上，构建 pMD18-T-VP7 重组质粒，测序正确后用于检测体系的验证。

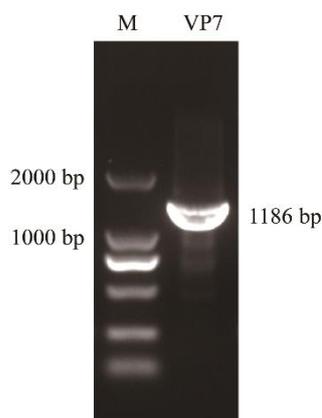


图 3-1 VP7 蛋白基因 PCR 扩增结果

Fig. 3-1 PCR product of VP7 gene

#### 3.3.1.2 VP7 蛋白基因体外转录

由于 AHSV 是 RNA 病毒，为了模拟真实病毒 RNA 模板，根据 3.2.1.1 方法，将 T7-VP7 片段作为模板转录成 RNA，琼脂糖凝胶电泳结果如图 3-2，由于 RNA 易降解呈拖带现象，明亮处大小与预期相符，获得的 RNA 保存于-80℃。

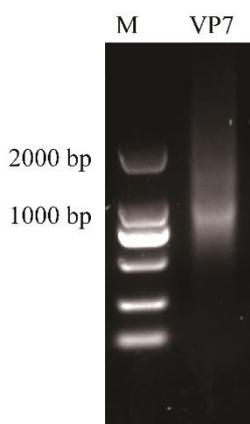


图 3-2 VP7 蛋白基因体外转录结果

Fig. 3-2 Product of *in vitro* transcription of VP7 gene

### 3.3.2 反应体系优化

#### 3.3.2.1 针对非洲马瘟病毒 7 型 KT030566.1 毒株 VP7 蛋白基因最佳 crRNA 的筛选

特异性 crRNA 的设计和筛选是建立 CRISPR/Cas12a 检测的关键过程。为了获得最佳的反应灵敏度和准确度，我们针对非洲马瘟病毒 7 型 KT030566.1 毒株 VP7 蛋白基因的保守区域设计了十条 crRNAs。以  $10^9$  copies/ $\mu$ L 浓度的 pMD18-T-VP7 质粒作为模板，按照材料方法 3.2.4 进行 CRISPR/Cas12a 体系反应，根据荧光信号强度判断，除 crRNA8 外，其余 crRNAs 在本反应体系中都显示具有不同程度的活性，其中 crRNA10 反应效率最高，其次是 crRNA1（图 3-3a）。紫外下肉眼观察的结果与荧光信号值呈一致性（图 3-3b）。因此 crRNA10 最终被确定为非洲马瘟 CRISPR/Cas12a 检测平台的最佳选择。

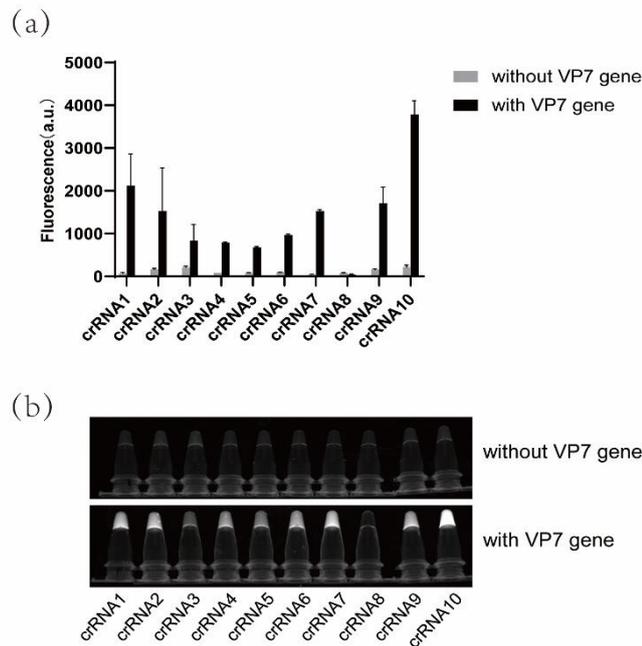


图 3-3 crRNA 序列优化

Fig. 3-3 Optimization results of crRNA sequence

(a): 荧光信号强度; (b): 紫外下肉眼读取结果

(a): Fluorescence signal intensity; (b): Readed by naked eye under UV

#### 3.3.2.2 针对非洲马瘟病毒 7 型 KT030566.1 株 VP7 蛋白基因最佳 RAA 引物筛选

以 crRNA 的优化筛选结果为基础，在 crRNA10 靶点的上下游设计 9 组特异性 RAA 引物用于等温扩增反应，并将 RAA 扩增后的产物作为 CRISPR/Cas12a 体系检测底物。RAA 模板浓度为  $10^9$  copies/ $\mu$ L 时，VP7-F1/R2、VP7-F2/R1 和 VP7-F3/R3 四组引物的扩增效率较高且无明显差异，其次是 VP7-F1/R3、VP7-F2/R2、VP7-F2/R3 和 VP7-F3/R2，扩增效率最低的是 VP7-F1/R1 和 VP7-F3/R1（图 3-4a），在紫外下肉眼观察时 VP7-F1/R1 的荧光强度最低，VP7-F3/R3 效率最高，其余的组别差异不大（图 3-4b），综上结果证明引物 F3/R3 具有良好扩增效率，因此选择该引物进行后续检测方法的建立。

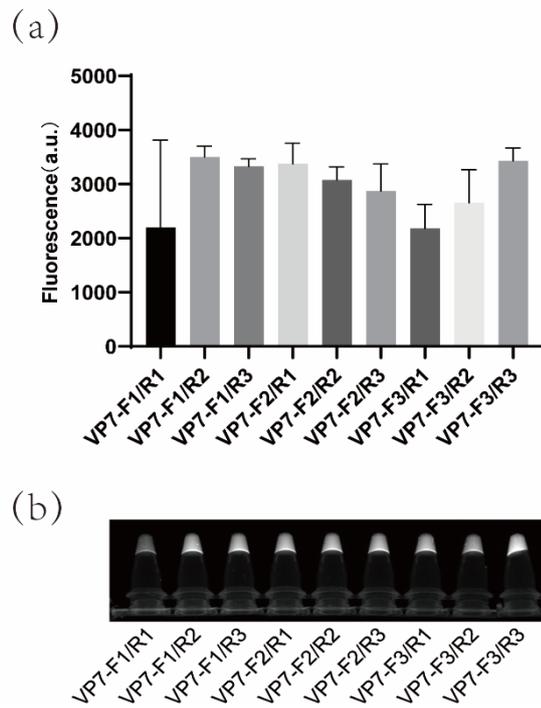


图 3-4 RAA 引物优化

Fig. 3-4 Optimization results of RAA primer

(a): 荧光信号强度; (b): 紫外下肉眼读取结果

(a): Fluorescence signal intensity; (b): Readed by naked eye under UV

### 3.3.3 AHSV-RT-RAA-CRISPR 方法敏感性和特异性试验

#### 3.3.3.1 AHSV-RT-RAA-CRISPR 反应敏感性试验

根据 3.2.5 将 pMD18-T-VP7 质粒十倍梯度稀释作为模板时, AHSV-RAA-CRISPR 方法最低检测限值为 10 copies/ $\mu\text{L}$  (图 3-5a), 紫外下肉眼观察结果与荧光信号强度结果一致 (图 3-5b)。由于 AHSV 是 RNA 病毒, 将 VP7 蛋白基因体外转录 RNA 十倍梯度稀释作为模板, OIE 推荐的荧光定量 PCR 敏感性达到 10 copies/ $\mu\text{L}$  (图 3-5e), AHSV-RT-RAA-CRISPR 方法的紫外下肉眼观察结果与荧光信号强度的最低检测限值都达到 100 copies/ $\mu\text{L}$  (图 3-5c, d)。与荧光定量 PCR 结果相比较, 表明 AHSV-RT-RAA-CRISPR 检测方法具有良好的敏感性。

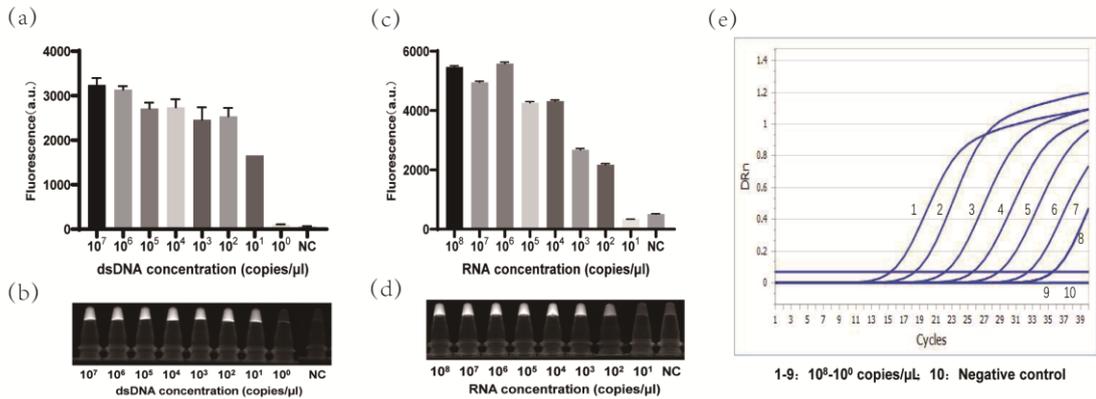


图 3-5 非洲马瘟 RT-RAA-Cas12a 反应敏感性试验

Fig. 3-5 Validation of sensitivity to AHSV-RT-RAA-Cas12a

(a): 质粒敏感性荧光信号强度; (b): 质粒敏感性紫外下肉眼读取结果; (c): RNA 敏感性荧光信号强度;

(d): RNA 敏感性紫外下肉眼读取结果; (e): 荧光定量 PCR 敏感性

(a): Plasmid sensitivity to fluorescence signal intensity; (b): Plasmid sensitivity was obtained by naked eyes under UV; (c): RNA sensitivity to fluorescence signal intensity; (d): RNA was Readed by naked eyes under UV; (e): Sensitivity of RT-qPCR

### 3.3.3.2 AHSV-RT-RAA-CRISPR 反应特异性试验

使用不同马属动物传染病病原的基因组 DNA 或者 RNA 作为模板, 如图 3-6a, b 所示, 靶标 RNA 采集到较强的荧光信号值, 与 EIAV、EHV-1/4、EIV、EAV、*S. equi*、*S. abortus equi* 和阴性对照 (Negative Control, NC) 相比具有显著差异, 并且紫外下肉眼观察能够明确分辨阴性和阳性结果, 与荧光定量 PCR 的特异性结果一致 (图 3-6c), 表明该方法具有良好的特异性。

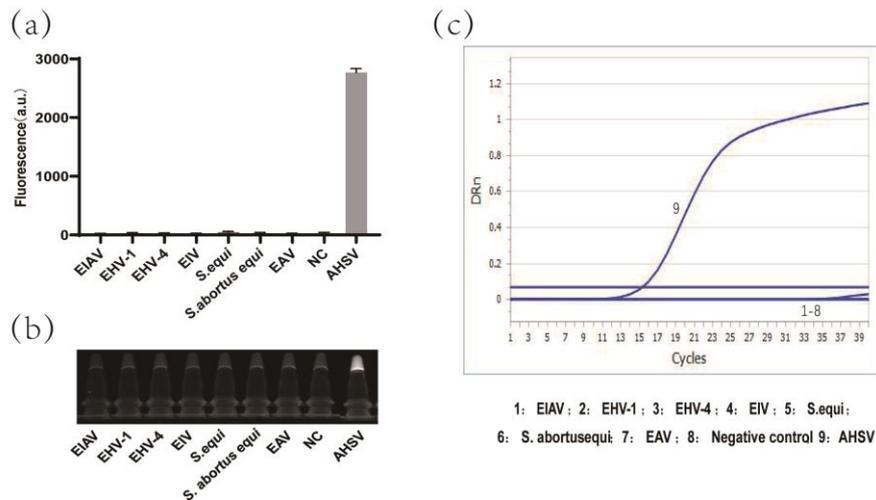


图 3-6 AHSV-RT-RAA-Cas12a 特异性试验

Fig. 3-6 Validation of specificity to AHSV-RT-RAA-Cas12a

(a): 特异性试验的荧光信号强度; (b): 特异性试验在紫外下肉眼读取结果; (c): 荧光定量 PCR 特异性

(a): Specificity to fluorescence signal intensity; (b): Specificity was obtained by naked eyes under UV; (c): Specificity of RT-qPCR

### 3.3.4 临床模拟样品检测

制备 20 份临床模拟样本全部采用 AHSV-RT-RAA-Cas12a 方法和 OIE 实时 PCR 进行检测。图 3-7a 结果显示, S6-10 全血模拟样品和 S16-20 组织模拟样品的 OIE 实时 PCR 检测结果为阳性, AHSV-RT-RAA-Cas12a 检测平台的荧光信号强度分析与 OIE 实时 PCR 结果一致(图 3-7b), 并且在紫外下通过肉眼观察可直接判定结果(图 3-7c)。综上所述, AHSV-RT-RAA-Cas12a 方法能够在复杂背景下有效检出阳性模拟样品, 可作为非洲马瘟早期现场即时检测的储备技术。

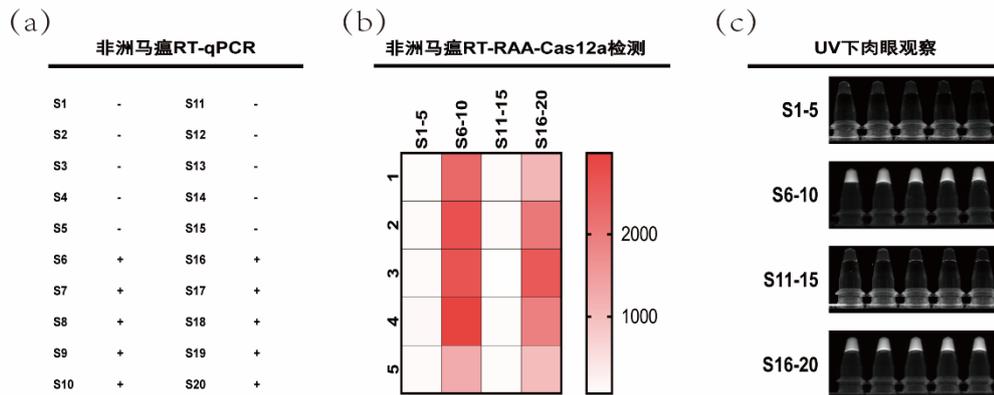


图 3-7 非洲马瘟病毒 RT-RAA-Cas12a 模拟临床样品检测

Fig. 3-7 Detection of simulated real samples by AHSV-RT-RAA-Cas12a

(a): 荧光定量 PCR 结果; (b): 荧光信号强度; (c): 紫外下肉眼读取结果

(a): Results of RT-qPCR ; (b): Fluorescence signal intensity; (c): Readed by naked eye under UV

## 3.4 讨论

CRISPR/Cas 系统不仅是基因编辑和调控的有力工具, 也是核酸快速检测发展过程中浓墨重彩的一笔, 与恒温扩增技术的结合使其优势得到更大的发挥 (GOOTENBERG et al., 2017; CHEN et al., 2018)。江苏奇天基因生物科技有限公司的 RAA 和英国 TwistDx 公司的 RPA 具有相似的扩增原理, 二者的特异性和敏感性具有一致性 (FAN et al., 2020)。与 RPA 相比 RAA 成本更低, 因此 RAA 结合 Cas12a 介导的核酸检测平台具有广阔的应用前景。

AHS 对马属动物具有高致病性, 我国已将其列为一类动物疫病。中国目前暂无 AHS 的病例报道, 但是随着经济发展, 世界各国的贸易往来与进出口马匹增加, 并且与我国邻近的泰国在 2020 年已出现 AHS 疫情, AHS 传入我国的风险不断增大, AHS 的入境防控对于我国的马产业稳定持续发展起到关键作用, 因此准确、快速、经济有效的诊断对于 AHS 疫情防控、马属动物的进出口检测和监测至关重要。实时荧光定量 RT-PCR 的开发改善了 AHS 的分子诊断水平, 在实验室中已经成为 AHS 诊断的常规手段 (AGUERO et al., 2008; GUTHRIE et al., 2013), 然而荧光定量 PCR 需要将样品送往专门的实验室使用昂贵的仪器进行检测, 并且样品运输过程耗时较

长。近年来有报道基于 RT-LAMP 技术建立的 AHSV 检测方法，该方法与传统 RT-PCR 相比灵敏度高达 1000 倍，但是假阳性结果频繁发生 (FOWLER et al., 2017)。

本研究中所述的 AHSV-RT-RAA-Cas12a 方法与荧光定量 PCR 相比，检测灵敏度相近，特异性强，缩短了操作和反应时间，并且不受限于实验室场景和昂贵仪器设备，能够在现地进行操作快速得到判定结果。在模拟样品的检测中，阳性样品全部检出且未出现假阳性结果，说明该方法具有复杂背景下的实际检测能力，能够指导受 AHS 影响的地区更快地实施措施，这对于 AHS 的防控至关重要。

## 第四章 马链球菌一体化检测方法 (*S. equi*-one-pot-RAA-Cas12a) 建立

### 4.1 材料

#### 4.1.1 菌株和基因组

马链球菌马亚种 HLJ2018 株由本实验室保存；其余同材料 3.1.1。

#### 4.1.2 主要试剂

表 4-1 主要试剂

Table 4-1 The reagents used in this research

试剂	公司
THB 培养基	青岛海博生物技术有限公司
哥伦比亚血平板	贝瑞特生物技术有限责任公司
细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (DP302)	天根
KOD 高保真 PCR 酶	TOYOBO
2×Taq PCR Star Mix	GenStar
FastPure Gel DNA Extraction mini Kit	诺维赞
pMD18-T	TaKaRa
胰蛋白胨	OXOID Ltd
酵母提取物	OXOID Ltd
HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit	NEB
RNA Clean & Concentrator™	Zymo Research
RAA 核酸扩增试剂盒	奇天基因生物科技有限公司
NEB buffer 2.1	NEB

#### 4.1.3 主要设备仪器

本章节主要设备仪器见 3.1.3。

#### 4.1.4 主要溶液配制

THB 肉汤培养基：取 36.2 g THB 培养基加入 800 mL 蒸馏水中，搅拌充分溶解后定容至 1 L，高压灭菌后置于 4℃ 避光保存。

## 4.2 方法

### 4.2.1 *SeM* 基因的质粒构建

以马链球菌马亚种 HLJ2018 株基因组 DNA 为模板，由长春库美公司合成引物，根据表 4-2 进行 PCR 程序扩增其 *SeM* 基因全长，PCR 反应体系和胶回收方法同 2.2.1，将获得的目的片段连接至 pMD18-T，转化至 DH5 $\alpha$  感受态，在氨苄平板培养基上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养，挑取单克隆菌落扩大培养长春库美公司测序。

上下游引物序列：

*S. equi*-M-F: 5'-ATAAAGATACCAGGCGTTT-3'

*S. equi*-M-R: 5'-CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTG-3'

表 4-2 *SeM* 基因的 PCR 反应程序

Table 4-2 PCR reaction procedure of *SeM* gene

步骤	温度	时间	循环
预变性	94 $^{\circ}$ C	2 min	1
变性	98 $^{\circ}$ C	10 sec	30
退火	55 $^{\circ}$ C	30 sec	30
延伸	68 $^{\circ}$ C	1 min 30 sec	30
延伸	68 $^{\circ}$ C	10 min	1

### 4.2.2 细菌培养和基因组提取

将保存在-80 $^{\circ}$ C的甘油菌接种在 THB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 下振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.8，然后将菌液连续 10 倍梯度稀释后采用传统平板计数法测定细菌浓度。

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书，取 1 mL 纯培养菌液提取细菌基因组 DNA，保存在-20 $^{\circ}$ C 待使用。

### 4.2.3 *S. equi*-PCR 反应

以提取的 *S. equi* HLJ2018 株基因组 DNA 为模板，设计针对 *SeM* 基因的鉴定引物并由长春库美公司合成。反应体系共 20  $\mu$ L: 10  $\mu$ L 2 $\times$ Taq Master Mix; 0.5  $\mu$ L F/R; 7  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O; 2  $\mu$ L 模板。根据表 4-3 进行 Taq-PCR 反应，扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳分析。

ICESe2GE2F: 5'- TTACCTCCATTACTTGACAATCCAT -3'

ICESe2GE2R: 5'- GATTTGCAACATGAAACATTTACAG -3'

表 4-3 *SeM* 基因的 Taq-PCR 反应程序Table 4-3 Taq-PCR reaction procedure of *SeM* gene

步骤	温度	时间	循环
预变性	98°C	3 min	1
变性	95°C	15 sec	35
退火	58°C	1 min	35
延伸	72°C	30 sec	35
延伸	72°C	5 min	1

#### 4.2.4 一体化反应体系优化

##### 4.2.4.1 crRNA 设计与合成

针对 *S. equi* HLJ2018 株 *SeM* 基因序列的保守区域设计五条 crRNA (表 4-4), crRNA 转录纯化及保存同 3.2.3.1。

表 4-4 针对 *SeM* 基因的 crRNATable 4-4 crRNA targeting the *SeM* gene

名称	序列 (5'-3')
<i>S. equi</i> -M-LbCas12a-crRNA1	uaauuucuacuaguguagauAGUGAAACUCCUCAAGUAUU
<i>S. equi</i> -M-LbCas12a-crRNA2	uaauuucuacuaguguagauAUGUUGCAAUUCUCAAUCA
<i>S. equi</i> -M-LbCas12a-crRNA3	uaauuucuacuaguguagauACAAGUGCAUUAGGAAUAAA
<i>S. equi</i> -M-LbCas12a-crRNA4	uaauuucuacuaguguagauCAGGAGUGGAAGUUACUCGU
<i>S. equi</i> -M-LbCas12a-crRNA5	uaauuucuacuaguguagauCUAACUUCACGAGUAACUUC

##### 4.2.4.2 RAA 引物设计

根据 *SeM* 基因筛选的最佳 crRNA 靶序列, 在其上下游设计 RAA 扩增引物共 1 对。RAA 反应体系和程序参考 3.2.4。

*S. equi*-*SeM*-RAA 上下游引物:

*S. equi*-*SeM*-RAA-F1: 5'-TTACCTCCATTACTTGACAATCCATTAATAC-3'

*S. equi*-*SeM*-RAA-R1: 5'-CACATACAACAGCAAATGATTGAAGATTTGCAAC-3'

##### 4.2.4.3 *S. equi*-one-pot-RAA-Cas12a 反应

将 RAA 反应与 *cas12a* 介导的反式活性优化为一体化反应体系。先在反应管底部加入含有 25  $\mu$ L 缓冲液 V, 0.42  $\mu$ M F/R, 20 mM 乙酸镁, 0.4  $\mu$ M ssDNA 荧光报告分子的预混液, 然后将 1.2  $\mu$ M crRNA 和 0.4  $\mu$ M LbCas12a 复合物置于管盖内壁, 最后将 2  $\mu$ L 模板加入管底液面下, 扣上反应管盖。在金属浴上 37°C 扩增反应 30 min 后, 将 crRNA 和 LbCas12a 复合物离心至管底部, 涡旋混匀。将一体化混合液置于荧光定量仪 37°C 孵育 50 min, 在 485 nm 激发波长和 520 nm 发射波长下每 30 秒收集一次荧光, 反应结束后在紫外下肉眼观察结果。

## 4.2.5 一体化反应敏感性和特异性实验

### 4.2.5.1 敏感性实验

将 pMD18-T-M 进行十倍梯度稀释制备  $10^9$ - $10^1$  copies/ $\mu$ L 的质粒标准品, 并将 1 mL 纯培养 *S. equi* 菌液提取的基因组 DNA 以十倍梯度稀释制备  $10^6$ - $10^1$  copies/ $\mu$ L 基因组 DNA 标准品。根据 4.2.3.3 进行 *S. equi*-one-pot-RAA-Cas12a 反应, 同时按照 4.2.3 进行 *S. equi*-PCR 反应, 验证两种标准品在不同方法中的检测限值, 比较其敏感性差异。

### 4.2.5.2 特异性实验

利用 *S. equi*-one-pot-RAA-Cas12a 方法和 *S. equi*-PCR 方法, 对 EIAV、EHV-1/4、EIV、EAV、*S. equi*、*S. abortus equi* 提取的基因组 DNA 或者 RNA 进行检测, 判断该方法与马属动物其他传染病病原是否具有交叉反应。

## 4.2.6 临床样品检测

为评估建立的马链球菌一体化方法是否具有检测实际临床样品的应用价值, 收集了来自山东和内蒙古的鼻拭子样品共 32 份, 按照 4.2.2 提取细菌基因组 DNA, 并根据 4.2.4 的 *S. equi*-one-pot-RAA-Cas12a 方法和 4.2.3 的 *S. equi*-PCR 方法进行检测。

## 4.3 结果

### 4.3.1 *SeM* 基因的质粒构建

以马链球菌马亚种 HLJ2018 株基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增其 *SeM* 基因, PCR 产物经凝胶电泳鉴定大小与预期相符 (图 4-1)。将回收后的目的片段连接至 pMD18-T 载体上, 构建 pMD18-T-M 重组质粒, 测序正确后用于检测体系的验证。

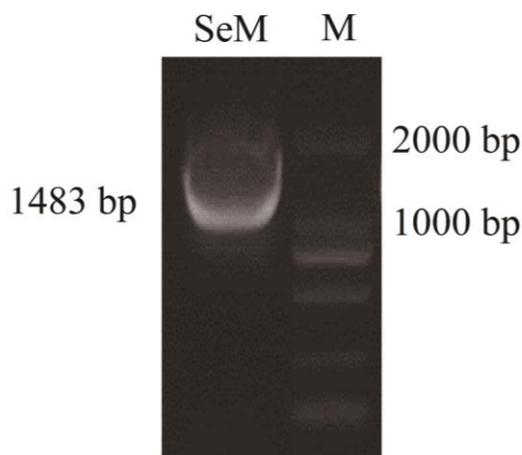


图 4-1 *SeM* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 4-1 PCR product of *SeM* gene

### 4.3.2 马链球菌一体化反应体系优化

#### 4.3.2.1 最佳 crRNA 筛选

为了获得最佳的反应灵敏度和准确度，我们针对马链球菌马亚种 HLJ2018 株 *SeM* 基因的保守区域设计了五条 crRNAs。按照方法 3.2.3.2 进行 Cas12a 体系反应，根据荧光信号强度判断，crRNA4 显示的反应活性最强，其次是 crRNA1 和 crRNA3，效率最低的是 crRNA2（图 4-2a）。紫外下肉眼观察的结果与荧光信号强度一致（图 4-2b）。因此 crRNA4 最终被确定为马链球菌 CRISPR/ Cas12a 检测平台的最佳选择。

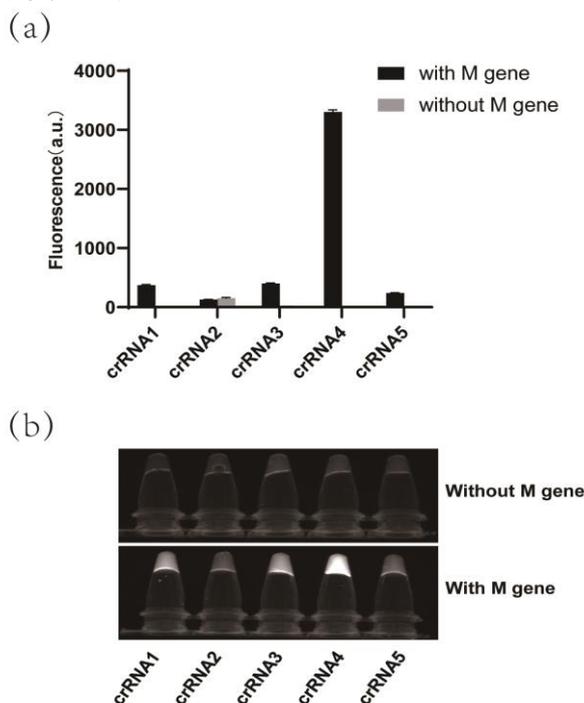


图 4-2 crRNA 优化

Fig. 4-2 Optimization results of crRNA

(a): 荧光信号强度; (b): 紫外下肉眼读取结果

(a): Fluorescence signal intensity; (b): Readed by naked eye under UV

#### 4.3.2.2 体系中缓冲液成分的优化

为了减少操作过程中产生的气溶胶和 RAA 产物转移的交叉污染，将 RAA 扩增反应和 Cas12a 反式切割体系结合至同一个反应管中。由于两个反应体系的缓冲液不同，对一体化体系中的缓冲液组分进行了优化，缓冲液 V 中含有 RAA 扩增的必要成分，因此比较了缓冲液 V 和 NEB buffer 2.1 混合与单独缓冲液 V 作为一体化缓冲液的差异。根据图 4-3a 和 b 结果显示，缓冲液 V 和 NEB buffer 2.1 混合时反应效率不佳，去除 NEB buffer 2.1 单独使用缓冲液 V 作为一体化的缓冲液时反应效率更高，紫外下肉眼观察二者差异明显，因此最终将缓冲液 V 作为马链球菌一体化反应体系的缓冲液。

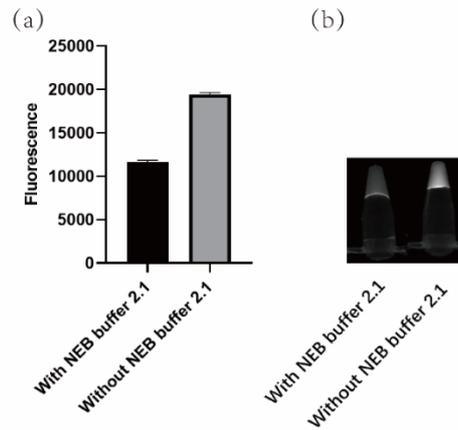


图 4-3 缓冲液优化

Fig. 4-3 Optimization results of buffer

(a): 荧光信号强度; (b): 紫外下肉眼读取结果

(a): Fluorescence signal intensity; (b): Readed by naked eye under UV

### 4.3.3 马链球菌一体化反应敏感性和特异性试验

#### 4.3.3.1 一体化反应敏感性试验

根据 4.2.3 采用质粒和基因组 DNA 两种模板评价马链球菌一体化反应检测的灵敏度。以 1 mL 准确计数的纯培养菌液提取基因组 DNA, 十倍梯度稀释作为模板, 进行马链球菌一体化检测和 OIE 的 PCR 反应, 一体化检测在紫外下肉眼观察结果与荧光信号强度分析的检测限值均达到  $1.68 \times 10^1$  CFU/mL (图 4-4a, b), 而 OIE 的 PCR 产物核酸电泳结果最低只能检测到  $1.68 \times 10^3$  CFU/mL (图 4-4c)。当十倍梯度稀释 pMD18-T-M 质粒作为模板时, 一体化检测限值能够达到 1 copies/ $\mu$ L (图 4-4d), 紫外下肉眼观察结果与荧光信号强度分析结果一致 (图 4-4e), 而 OIE 的 PCR 检测限值为  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L (图 4-4f)。质粒和基因组 DNA 二者作为模板时, 马链球菌一体化反应与 OIE 的 PCR 相比检测限值都要低两个梯度, 说明该一体化检测方法具有良好的敏感性。

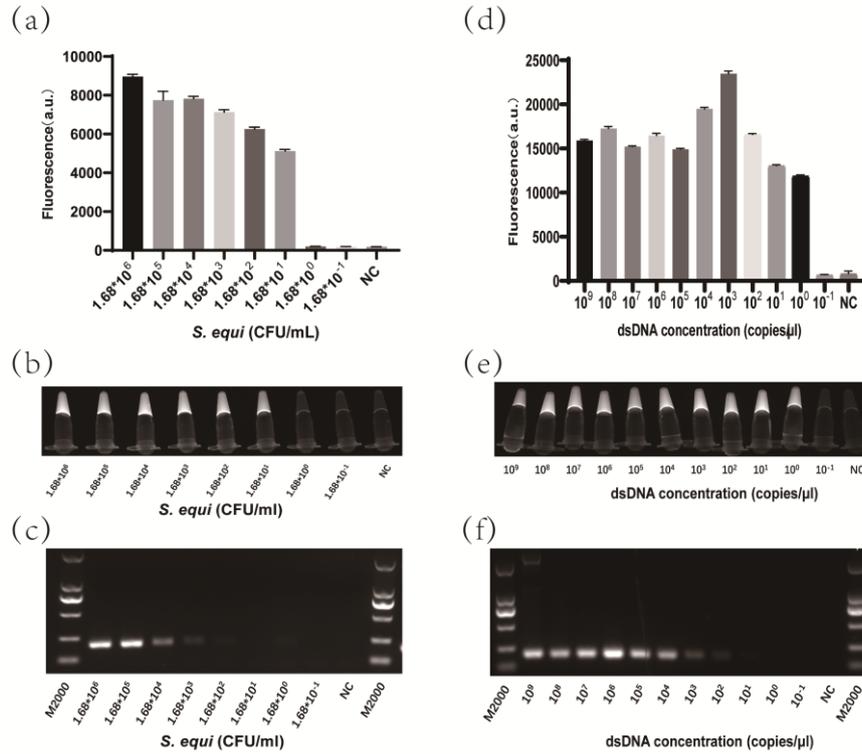


图 4-4 一体化反应敏感性试验

Fig. 4-4 Validation of sensitivity to one-pot detection

- (a): 基因组敏感性试验的荧光信号强度; (b): 基因组敏感性试验在紫外下肉眼读取结果; (c): PCR 扩增梯度浓度基因组; (d): 质粒敏感性试验的荧光信号强度; (e): 质粒敏感性试验在紫外下肉眼读取结果; (f): PCR 扩增梯度浓度质粒;
- (a): The genome sensitivity to fluorescence signal intensity; (b): The genome sensitivity was obtained by naked eye under UV;
- (c): The gradient concentration genome was amplified by PCR; (d): Plasmid was read by naked eye under UV;
- (e): Plasmid sensitivity to fluorescence signal intensity; (f): The gradient concentration plasmid was amplified by PCR

#### 4.3.3.2 一体化反应特异性试验

为了评估马链球菌一体化方法是否对 *S. equi* 具有较好的检测特异性, 根据 4.2.3 对马属动物的相关病原进行了检测。如图 4-5a 所示, 靶标病原菌采集到较强的荧光信号值, 而马传染性贫血病毒 (EIAV)、马疱疹病毒 1/4 (EHV-1/4)、马流感病毒 (EIV)、马动脉炎病毒 (EAV)、马流产沙门氏菌 (*S. abortus equi*) 和空白组 (NC) 几乎没有荧光, 并且在紫外下通过肉眼观察能够明确分辨阴性和阳性结果 (图 4-5b), 表明该一体化检测方法具有良好的特异性。

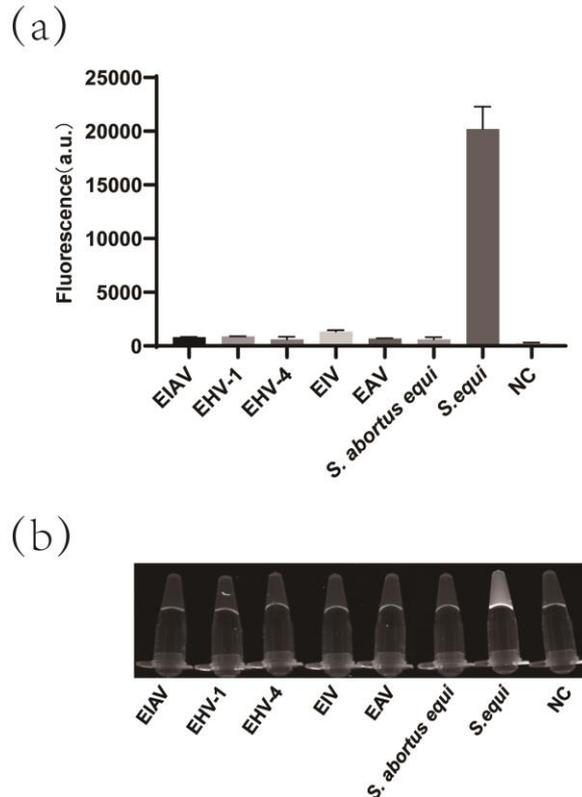


图 4-5 一体化反应特异性试验

Fig. 4-5 Validation of specificity to one-pot detection

(a): 特异性试验的荧光信号强度; (b): 特异性试验在紫外下肉眼读取结果

(a): Specificity to fluorescence signal intensity; (b): Specificity was obtained by naked eye under UV

#### 4.3.4 临床样品检测

对 32 份鼻拭子样本采用一体化方法和 *S. equi*-PCR 进行比较评估。一体化方法检测到 S28-30 这 3 份样品呈阳性, 收集到的荧光信号与紫外下肉眼观察结果一致, 其中 S29 荧光反应较弱 (图 4-6a, b)。在 *S. equi*-PCR 的凝胶电泳结果中显示, 只有 S28 和 S30 两份样品鉴定到单一特异性扩增条带 (图 4-6c), 检出率高于 *S. equi*-PCR 方法, 通过产物测序分析, 可能是由于 S29 样品中的菌量较少, 低于 *S. equi*-PCR 方法的检出阈值, 马链球菌一体化方法能够检测到真实临床样品中的 *S. equi*, 具有 *S. equi* 即时检测的潜在应用价值。

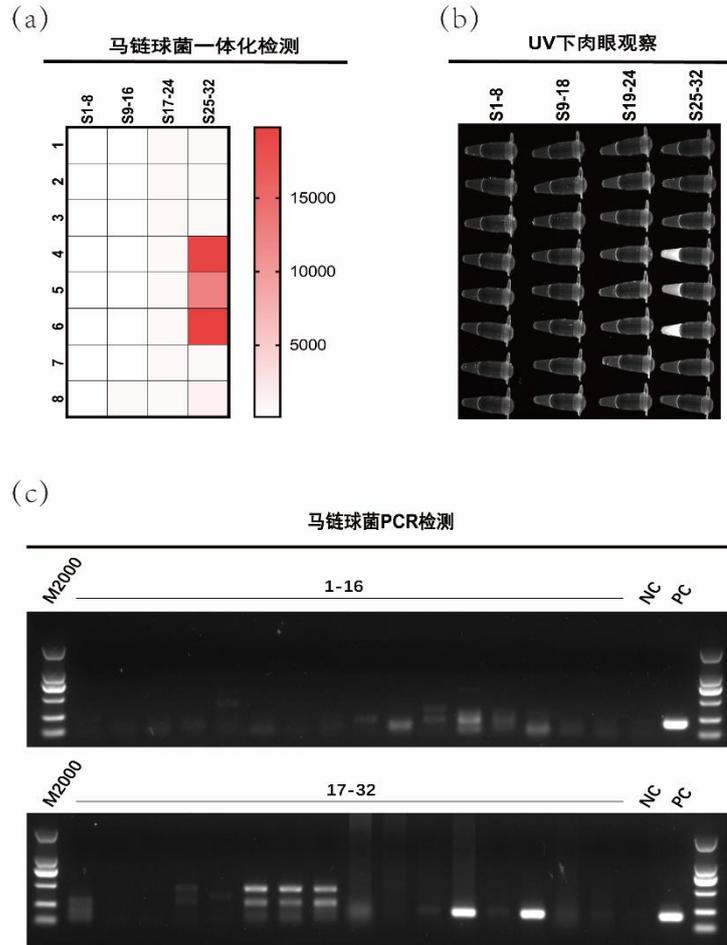


图 4-6 临床鼻拭子样品检测

Fig. 4-6 Clinical nose swab sample testing

(a): 荧光信号强度; (b): 紫外下肉眼读取结果; (c): PCR 凝胶电泳结果

(a): Fluorescence signal intensity; (b): Readed by naked eye under UV; (c): Results of GEL electrophoresis by PCR

## 4.4 讨论

由马链球菌马亚种引起的马腺疫是具有高度传染性的上呼吸道疾病，由于发病率高，分布范围广，严重影响世界范围的马产业发展。目前已有的分子诊断方法包括 PCR 和实时荧光定量 PCR，二者灵敏度都高于分离培养，反应时间一般在 2 h 内，但是通常只能在实验室中进行操作，在资源有限的环境中不利于开展检测，而且样品的运输过程增加了耗时 (TIMONEY et al., 1997; NEWTON et al., 2010)。建立方便、快速和准确的检测方法对马腺疫进行低成本即时诊断，可以对 *S. equi* 进行早期筛查来减少该病的传播，此外还能够用于潜伏期或者康复期的检测，为快速实施生物安全措施提供参考。为此本研究基于 CRISPR/Cas12a 和 RAA 技术建立了马链球菌一体化检测方法，以满足在现场快速准确的即时诊断。

目前，基于 CRISPR/Cas12a 的方法已被应用于多种病原体的检测，如 SARS-CoV-2 (LONG et al., )、副溶血性弧菌 (XIAO et al., 2021) 和单核增生李斯特菌 (LI et al., 2021)，但大多是将 RPA 或 RAA 产物转移到 CRISPR/Cas12a 检测反应中，在开盖过程中可能存在气溶胶和交叉污染

的风险, 在本研究中, 对反应体系进行了一体优化, 从而降低了污染的风险。另外高温会削弱 LbCas12a 的活性, 降低其切割效率, 而 RAA 的最佳反应温度与 LbCas12a 一致, 为建立马链球菌一体化检测平台提供了必要条件 (Gootenberg et al., 2017)。检测结果可以使用荧光收集器读取, 或者直接使用小型恒温加热器孵育, 反应结束后置于紫外或蓝光下肉眼观察结果, 整个孵育时间不超过 80 min, 反应温度于 37°C 恒定, 无需依赖昂贵的变温仪器。经计算本研究中每个反应的成本约为 28 元, 批量生产可大幅降低成本。

综上所述本研究建立了一种价格低廉、方便快捷、灵敏准确的马链球菌检测方法, 该方法与 OIE 所推荐的 PCR 检测相比, 特异性强且敏感性高 100 倍, 判定界限明显, 对临床样品有很好的检出能力, 对于在资源匮乏的地区开展即时检测具有良好的应用前景。

## 第五章 马流产沙门氏菌一体化检测方法 (*S. abortus equi*-one-pot-RAA-Cas12a) 建立

### 5.1 材料

#### 5.1.1 菌株和基因组

马流产沙门氏菌驴源分离株 20180422.D.DE.X、都柏林沙门氏菌 (*S. Dublin*)、肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 由本实验室保存, 其余基因组同 3.1.1。

#### 5.1.2 主要试剂

表 5-1 主要试剂

Table 5-1 The reagents used in this research

试剂	公司
沙门氏菌显色培养基	上海欣中生物工程有限公司
沙门氏增菌液	青岛海博生物技术有限公司
细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)	天根
KOD 高保真 PCR 酶	TOYOBO
FastPure Gel DNA Extraction mini Kit	诺维赞
pMD18-T	TaKaRa
胰蛋白胨	OXOID Ltd
酵母提取物	OXOID Ltd
HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit	NEB
RNA Clean & Concentrator™	Zymo Research
RAA 核酸扩增试剂盒	奇天基因生物科技有限公司
NEB buffer 2.1	NEB

#### 5.1.3 主要设备仪器

本章节主要设备仪器见 3.1.3。

### 5.2 方法

#### 5.2.1 *FljB* 基因的质粒构建

参考 4.2.1 方法, 以马流产沙门氏菌驴源分离株 20180422.D.DE.X 基因组 DNA 为模板, 构建 pMD18-T-*FljB* 重组质粒。

上下游引物序列:

Sae-FljB-F: 5'- ATGGCACAAGTAATCAACAC -3'

Sae-FljB-R: 5'- TTAACGTAACAGAGACAGCACATTC -3'

## 5.2.2 马流产沙门氏菌分离鉴定、培养和基因组提取

利用一次性接种环蘸取脏器组织浸出液，划线接种于沙门氏菌显色培养基上，在 37°C 下培养 18-24 h 后观察菌落颜色。革兰氏阳性菌被抑制生长，大肠杆菌显示蓝色，沙门氏菌呈淡紫色。

将保存在-80°C的甘油菌接种至沙门氏菌选择培养基，在 37°C下振荡培养 12-16 h，然后将菌液连续 10 倍梯度稀释后采用平板计数法测定细菌浓度。

按照 4.2.2 提取细菌基因组 DNA。

## 5.2.3 马流产沙门氏菌一体化反应体系优化

### 5.2.3.1 crRNA 设计与合成

针对马流产沙门氏菌驴源分离株 20180422.D.DE.X 的 *FljB* 基因序列的保守区域设计十条 crRNA (表 5-2)，crRNA 转录纯化及保存同 3.2.3.1。

表 5-2 针对 *FljB* 基因的 crRNA

Table 5-2 crRNA targeting the *FljB* gene

名称	序列 (5'-3')
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA1	uaauuucuacuaaguguagauGUUGGGUAGCACCCGAAUGA
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA2	uaauuucuacuaaguguagauGUAGUGCCGUCAGCAGCAGU
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA3	uaauuucuacuaaguguagauGCAGUAUCCCCGCAUCGGU
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA4	uaauuucuacuaaguguagauAGCGCAUAACCGCCUCAAU
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA5	uaauuucuacuaaguguagauGUGGCAGCAUCUGCUGCUAC
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA6	uaauuucuacuaaguguagauAUUGCUCUGUCGCUUCAUC
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA7	uaauuucuacuaaguguagauCCGUCUACACCACCCAGUUG
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA8	uaauuucuacuaaguguagauUGCGACAGACGUUAUCAGCU
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA9	uaauuucuacuaaguguagauAGGAUGGUAAAUAUUAUGCC
Sae-FljB-LbCas12a-crRNA10	uaauuucuacuaaguguagauACCAAUGUCGCGGCACUUGC

### 5.2.3.2 RAA 引物设计

根据 *S. abortus equi* 的 *FljB* 基因筛选的最佳 crRNA 靶序列，在其上下游设计 RAA 扩增引物共 6 对。RAA 反应体系和程序参考 3.2.4。

Sae-FljB-RAA 上下游引物:

Sae-FljB -RAA-F1: 5'-TAAGTGGTTATACCGATGCGGGGATACTGCC-3'

Sae-FljB -RAA-F2: 5'-TACTGCCAAAATGGTAAATATGAAGTTACCGTTG-3'

Sae-FljB -RAA-F3: 5'-GCCTTACAAGATGGGGGCGTTTCATCTGCGGATGC-3'

Sae-FljB -RAA-R1: 5'-ACCGTCTACACCACCCAGTTGGTTAGCCGCTG-3'

Sae-FljB -RAA-R2: 5'-GGTAGTGCCGTCAGCAGCAGTATAACTTGTGG-3'

#### 5.2.3.3 *S. abortus equi*-one-pot-RAA-Cas12a 反应

反应体系和程序参考 4.2.3.3。

#### 5.2.4 马流产沙门氏菌一体化反应敏感性和特异性实验

参考方法 4.2.5 使用 *S. abortus equi*-one-pot-RAA-Cas12a 体系进行反应。

#### 5.2.5 临床样品检测

为评估建立的马流产沙门氏菌一体化方法是否具有检测实际临床样品的应用价值，收集了来自山东和内蒙古不同养殖场的 45 份阴道拭子和 29 份组织样本，按照 4.2.2 提取细菌基因组 DNA，同时进行沙门氏菌显色培养基分离鉴定和 *S. abortus equi*-one-pot-RAA-Cas12a 检测。

### 5.3 结果

#### 5.3.1 马流产沙门氏菌分离鉴定

使用接菌环蘸取脏器浸出液进行划线接种，恒温培养后在沙门氏菌显色培养基上观察到大量紫色菌落，初步证明该脏器组织中含有沙门氏菌（图 5-1）。

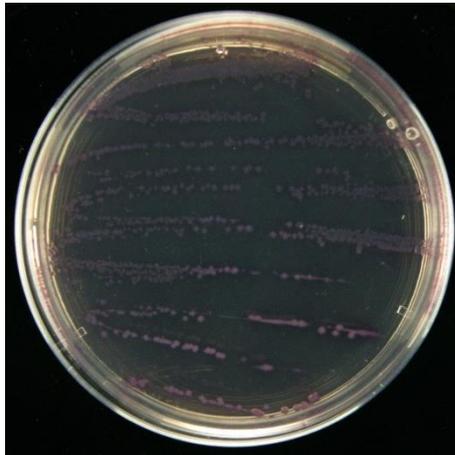


图 5-1 沙门氏菌的分离鉴定

Fig. 5-1 Isolation and identification of *Salmonella*

#### 5.3.2 *FljB* 基因的质粒构建

以马流产沙门氏菌驴源分离株 20180422.D.DE.X 为模板，通过 PCR 扩增其 *FljB* 基因，PCR 产物经凝胶电泳鉴定大小与预期相符（图 5-2）。将回收后的目的片段连接至 pMD18-T 载体上，构建 pMD18-T-*FljB* 重组质粒，测序正确后用于检测体系的验证。

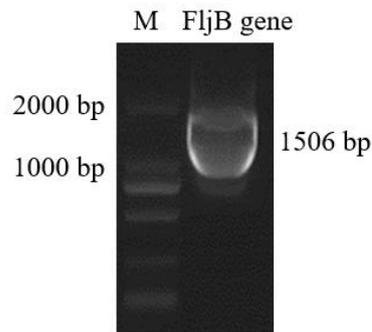


图 5-2 *FljB* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 5-2 PCR product of *FljB* gene

### 5.3.3 马流产沙门氏菌一体化反应体系优化

#### 5.3.3.1 针对马流产沙门氏菌驴源 20180422.D.DE.X 株 *FljB* 基因最佳 crRNA 的筛选

特异性 crRNA 的设计和筛选是建立 CRISPR/Cas12a 检测的关键过程。为了获得最佳的反应灵敏度和准确度，我们针对马流产沙门氏菌驴源 20180422.D.DE.X 株 *FljB* 基因的保守区域设计了十条 crRNAs。按照材料方法 5.2.3 进行 CRISPR/Cas12a 体系反应，根据荧光信号强度判断，crRNA3 具有较强的非特异性反应，crRNA6-9 在本反应体系显示活性较低，crRNA1-5 和 crRNA10 具有较好的活性，其中 crRNA4 的反应效率最高，crRNA10 次之（图 5-2a）。紫外下肉眼观察的结果与荧光信号值呈一致性（图 5-2b）。因此 crRNA4 最终被确定为马流产沙门氏菌 CRISPR/Cas12a 检测平台的最佳选择。

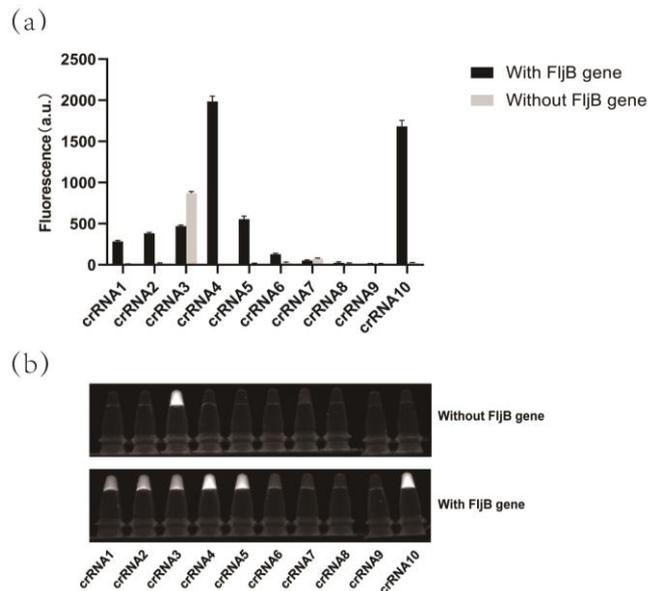


图 5-3 crRNA 优化

Fig. 5-3 Optimization results of crRNA

(a): 荧光信号强度; (b): 紫外下肉眼读取结果

(a): Fluorescence signal intensity; (b): Readed by naked eye under UV

### 5.3.3.2 马流产沙门氏菌 Cas12a 反应体系可行性分析

在 crRNA 设计筛选结果中显示 crRNA3 具有较强的非特异性反应，体系中未加入靶序列时收集到高强度的荧光信号，目前未查阅到相关的文献报道分析。为确保所筛选的最佳 crRNA 在马流产沙门氏菌 Cas12a 反应体系中的可行性，针对 crRNA4 进行了进一步的验证分析。在有无靶序列的前提下分别缺失 Cas12a 体系中各组分，按照材料方法 5.2.3 分为 10 个组别进行 Cas12a 反应，结果显示只有靶序列、Cas12 蛋白酶、crRNA、缓冲液和 ssDNA 报告分子同时存在的组别 5 能够发生有效切割，且该体系不出现非特异反应（图 5-3a），紫外下肉眼观察与收集的荧光信号结果一致（图 5-3b）。

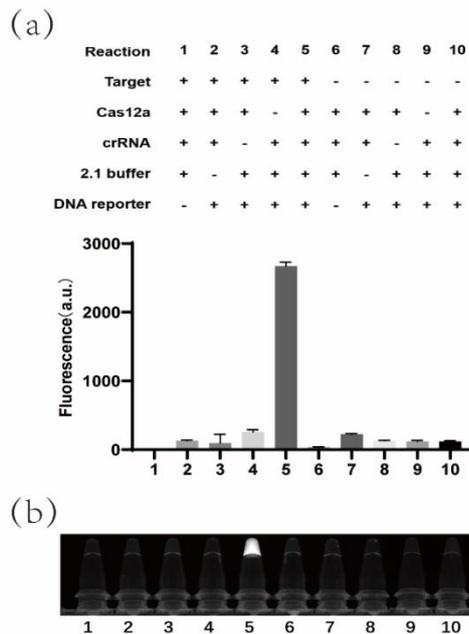


图 5-3 马流产沙门氏菌 Cas12a 反应体系可行性分析

Fig. 5-3 Feasibility analysis of *S. abortus equi*-Cas12a system

(a): 荧光信号强度; (b): 紫外下肉眼读取结果

(a): Fluorescence signal intensity; (b): Readed by naked eye under UV

### 5.3.3.3 最佳 RAA 引物筛选

设计 RAA 特异性引物是建立 RAA 等温扩增体系必不可少的一环。6 组不同的引物被用于 RAA 扩增反应，并将 RAA 扩增后的产物作为 CRISPR/Cas12a 体系检测底物。前期进行条件摸索时发现高浓度质粒作为 RAA 模板时，不同引物的扩增效率差异不大，因此采用梯度低浓度法比较反应效率。如图 5-5 结果所示，根据荧光信号强度，RAA 模板浓度为  $10^5$  copies/ $\mu$ L 时 6 组引物都能够有效扩增，模板浓度为  $10^{3-4}$  copies/ $\mu$ L 时 FljB-F1/R1 和 FljB-F2/R1 两组引物无法扩增，模板浓度为  $10^{1-2}$  copies/ $\mu$ L 时只有 F3/R2 能够有效扩增，NC 显示 6 组引物都未产生非特异反应，综上结果证明引物 F3/R2 具有良好扩增效率，因此选择该引物进行后续检测方法的建立。

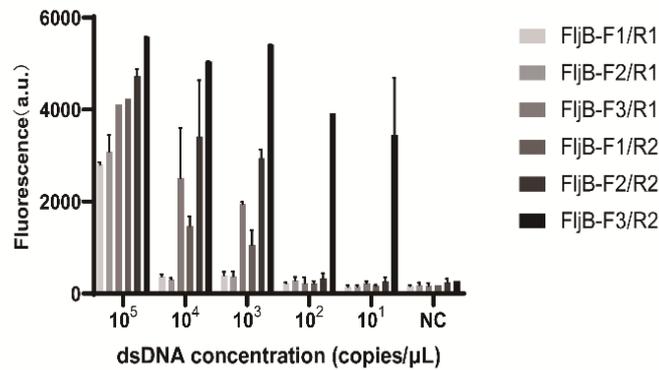


图 5-4 RAA 引物优化

Fig. 5-5 Optimization results of RAA primer

### 5.3.4 马流产沙门氏菌一体化反应敏感性和特异性试验

#### 5.3.4.1 一体化反应敏感性试验

根据 5.2.3 采用质粒和基因组 DNA 两种模板评价马流产沙门氏菌一体化反应检测的灵敏度。十倍梯度稀释 pMD18-T-FijB 质粒作为模板时，一体化检测敏感度能够达到 1 copies/μL (图 5-6a)，紫外下肉眼观察结果与荧光信号强度分析结果一致 (图 5-6b)。而在实际样品中是检测提取的基因组 DNA，因此取 1 mL 准确计数的纯培养菌液提取基因组 DNA，十倍梯度稀释作为模板，以一体化体系进行反应，紫外下肉眼观察与荧光信号强度分析的检测限值均达到  $8 \times 10^2$  CFU/mL (图 5-6c, d)。说明该一体化检测方法具有良好的敏感性。

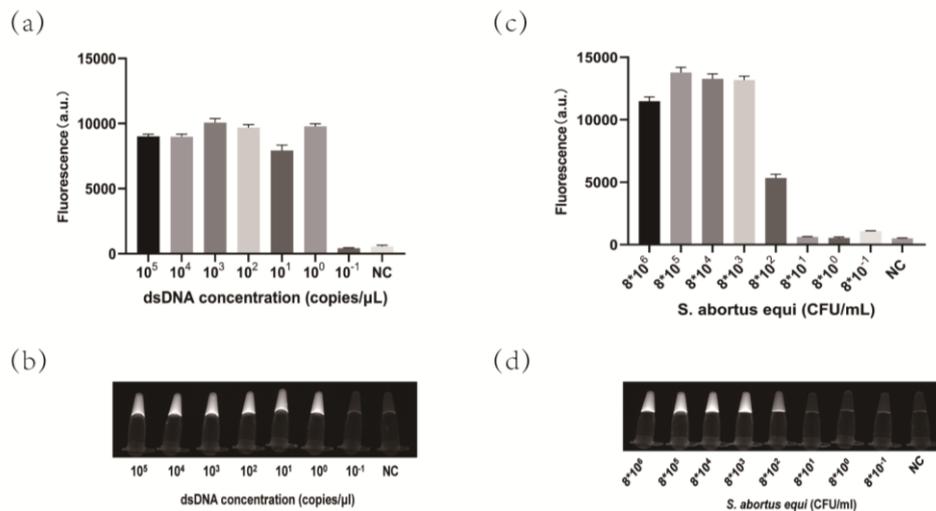


图 5-6 一体化反应敏感性试验

Fig. 5-6 Validation of sensitivity to integrated reactions

(a): 质粒敏感性试验的荧光信号强度; (b): 质粒敏感性试验在紫外下肉眼读取结果;

(c): 基因组 DNA 敏感性试验的荧光信号强度; (d): 基因组 DNA 敏感性试验在紫外下肉眼读取结果

(a): Plasmid sensitivity to fluorescence signal intensity; (b): Plasmid sensitivity was obtained by naked eye under UV;

(c): The genome sensitivity to fluorescence signal intensity; (d): The genome was read by naked eye under UV

## 5.3.4.2 一体化反应特异性试验

引起马匹流产的疾病有很多，在实际临床诊断中也可能是多种病原的混合感染，因此准确鉴别马流产沙门氏菌与其他病原菌十分重要。如图 5-7a 所示，靶标病原菌采集到较强的荧光信号值，而 EIAV、EHV-1/4、EIV、EAV、*S. equi*、*S. Dublin*、*S. enteritidis*、*S. typhimurium* 和 NC 几乎没有荧光，并且紫外下肉眼观察能够明确分辨阴性和阳性结果（图 5-7b），表明该方法具有良好的特异性。

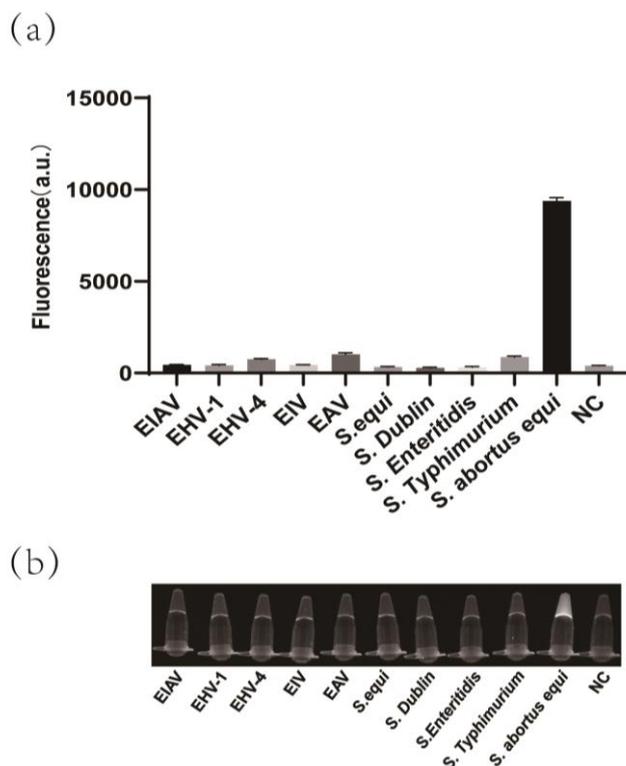


图 5-7 一体化反应特异性试验

Fig. 5-7 Validation of specificity to integrated reactions

(a): 特异性试验的荧光信号强度; (b): 特异性试验在紫外下肉眼读取结果

(a): Specificity to fluorescence signal intensity; (b): Specificity was obtained by naked eye under UV

## 5.3.5 临床样品检测

对 74 份临床样本（包括 45 份阴道拭子和 24 份不同脏器组织）采用一体化方法检测和显色培养基分离鉴定。最终结果显示，24 份组织中有 12 份传统平板划线法呈阳性（图 5-8a），一体化平台的荧光信号强度分析结果与传统平板划线法结果一致（图 5-8b），并且在紫外下通过肉眼观察能够直接判定结果（图 5-8c）。45 份阴道拭子中传统平板划线法有 6 份样品呈阳性（图 5-9a），而一体化方法有 8 个样品呈阳性，通过产物测序分析，可能是由于在样品运输过程中病原菌死亡，在培养平板上失去增殖活性，但是其中的基因组仍旧能够被检测到（图 5-9b, c）。综上所述，马流产沙门氏菌一体化方法对于阴道拭子和组织样品都具有良好的抗干扰能力，敏感性高且特异性强，具有临床样品即时检测的潜在价值。

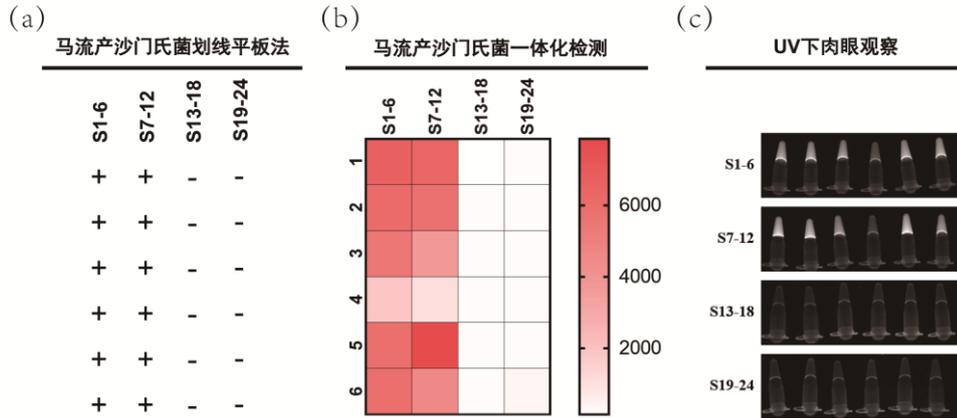


图 5-8 临床组织样品检测

Fig. 5-8 Clinical tissue sample testing

(a): 平板划线法结果; (b): 荧光信号强度; (c): 紫外下肉眼读取结果

(a): Results of the conventional culture method; (b): Fluorescence signal intensity; (c): Readed by naked eye under UV

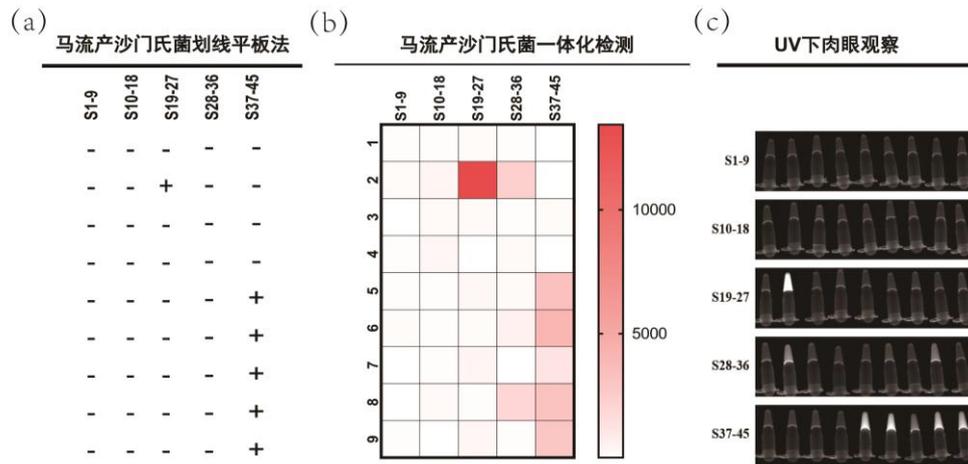


图 5-9 临床阴道拭子样品检测

Fig. 5-9 Clinical vaginal swab sample testing

(a): 平板划线法结果; (b): 荧光信号强度; (c): 紫外下肉眼读取结果

(a): Results of the conventional culture method; (b): Fluorescence signal intensity; (c): Readed by naked eye under UV

## 5.4 讨论

自 1893 年美国首次报道 *S. abortus equi* 以来, 在日本、意大利、阿根廷和克罗地亚等地也曾出现散发流行 (SMITH, 1979; AKIBA, 2003; MADIĆ et al., 2010; MARENZONI et al., 2012; BUSTOS et al., 2016)。感染 *S. abortus equi* 的马匹可以成为长期携带者, 并可能成为非流行地区的潜在传染源 (SINGH et al., 1971)。*S. abortus equi* 当前的核酸检测研究较为缺乏, 大多使用传统分离培养和血清学检测, 现有的检测方法在反应灵敏度、操作复杂性、所需时长等方面具有不同程度的缺陷, 限制了检测手段的应用范围以及对感染马匹的早期检测。因此, 准确、快速的核酸诊断对于监测和及时控制 *S. abortus equi* 传播至关重要。

LbCas12a 反式切割的敏感性和准确性高度依赖于 crRNA, 因此 crRNA 的设计至关重要

(MARRAFFINI, 2015; SHEN et al., 2019)。在本文结果中, 含 crRNA3 而不含模板的体系产生了高强度的非特异性荧光, 这一现象未发现相关的研究报道, 原因可能需要进一步调查。在临床检测中发现, 组织样品的基因组 DNA 反应效率低于阴道拭子样品, 分析可能是由于组织样品提取的基因组 DNA 背景复杂干扰性强, 通过对基因组 DNA 稀释后能够显著增强一体化方法的反应效率。

SARS-CoV-2 暴发使核酸快速检测需求进入高峰期, 已有报道建立了大量基于 CRISPR/Cas 的 SARS-CoV-2 检测方法 (YANG et al., 2016; BROUGHTON et al., 2020; NGUYEN et al., 2020)。其便携性和低成本的优势有助于在资源匮乏地区及时快速筛查到病原菌早期感染。同样基于 CRISPR/Cas 技术, 本研究建立了一种现场可部署、成本低、灵敏度高、特异性强的马流产沙门氏菌一体化检测方法, 该方法敏感性高于传统的分离培养, 减少了复杂的人员操作, 并且大大缩短了检测时长, 能够真实有效地检测出临床样品中的 *S. abortus equi*, 有助于填补 *S. abortus equi* 在核酸分子诊断中的空缺。

## 第六章 结论

1. 成功制备了具有反式切割活性的高纯度 LbCas12a 蛋白，并以此建立了基于 CRISPR/Cas12a 的恒温快速可视化荧光报告系统；

2. 建立了非洲马瘟病毒可视化检测方法 (AHSV-RT-RAA-Cas12a)，该方法敏感性高、特异性强，RNA 最低检测限值为 100 copies/ $\mu\text{L}$ ，模拟真实样品的检测结果与荧光定量符合率高；

3. 建立了马链球菌一体化检测方法 (*S. equi*-one-pot-RAA-Cas12a)，该方法纯培养菌液最低检测限值为 16.8 CFU/mL，比 PCR 凝胶电泳方法更敏感，能够检测到临床拭子样品中的微量 *S. equi*；

4. 建立了马流产沙门氏菌一体化检测方法 (*S. abortus equi*-one-pot-RAA-Cas12a)，该方法纯培养菌液最低检测限值为 800 CFU/mL，在组织和拭子样品中都具有良好的检出能力。

## 参考文献

- 白文彬, 于康震, 2002. 动物传染病诊断学. 中国农业出版社:737-738.
- 郭奎, 王宁, 王金慧, 初晓雨, 赵语婷, 郭巍, 刘荻荻, 胡哲, 王晓钧, 2020. 马流产沙门氏菌的分离鉴定及其微量凝集抗体检测方法的建立与应用. 中国农业科学. 53(10): 10.
- 黄静玮, 汪铭书, 程安春, 2011. 沙门氏菌分子生物学研究进展. 中国人兽共患病学报. 27(7): 4.
- 李悦, 李景虹, 2020. 基于CRISPR的生物分析化学技术. 化学进展. 32(1): 9.
- 刘建国, 陈亮, 李仁阁, 2014. 驴沙门氏菌病的诊断与治疗. 畜牧兽医杂志. (03): 88-89.
- 刘建柱, 谢宁, 刘永夏, 2018. 马腺疫的研究进展. 兽医导刊. (5): 2.
- 孙殿和, 1984. 对爆发性马副伤寒流产的防治报告. 青海畜牧兽医杂志. (3).
- 孙莹慧, 刘康军, 陶璐瑶, 孟霞, 崔璐莹, 姜桂苗, 赵付伟, 李建基, 王亨, 2019. 驴源马流产沙门菌的耐药表型及毒力基因检测. 中国兽医学报. 39(10): 4.
- 杨康, 苏艳, 李阳, 张宝江, 2015. ELISA和微量凝集法检测马流产沙门菌血清抗体的比较. 畜牧与兽医. (6): 3.
- 袁贝, 李海, 马陈, 赵亚南, 马玉辉, 朱义忠, 苏艳, 2017. 新疆伊犁地区马鼻肺炎、马腺疫、马流产沙门菌病的血清学调查. 中国预防兽医学报. 39(07): 540-543.
- 张海明, 段晓冬, 相文华, 沈丹, 薛红, 梁卓粤, 彭南秀, 彭聪, 2013. 非洲马瘟诊断技术研究概况. 动物医学进展. 34(006): 175-178.
- 张铁军, 孙传良, 2016. 幼犊,驹沙门氏菌病的诊断,鉴别和防治措施. 现代畜牧科技. (12): 99-99.
- 郑慎修, 1986. 马流产沙门氏菌病诊断报告. 中国兽医科技. (11).
- ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, JOUNG J, SLAYMAKER I M, COX D, SHMAKOV S, MAKAROVA K S, SEMENOVA E, MINAKHIN L, 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science. 353(aaf5573): aaf5573. DOI: 10.1126/science.aaf5573.
- AGUERO M, GOMEZ-TEJEDOR C, CUBILLO A M, RUBIO C, ROMERO E, JIMENEZ-CLAVERO M A, 2008. Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. J Vet Diagn Invest. 20(3): 325. DOI: :10.1177/104063870802000310.
- AKIBA M, 2003. Comparison of Salmonella enterica serovar Abortusequi isolates of equine origin by pulsed-field gel electrophoresis and fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting. Vet Microbiol. 92(4): 379-388. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00422-4.
- BARNARD B J, 1998. Epidemiology of African horse sickness and the role of the zebra in South Africa. Arch Virol Suppl. 14: 13-9. DOI: 10.1007/978-3-7091-6823-3\_2.
- BONINI A, POMA N, VIVALDI F, KIRCHHAIN A, SALVO P, BOTTAI D, TAVANTI A, DI FRANCESCO F, 2021. Advances in biosensing: The CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 192113645. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113645.
- BREMER C W, 1976. A gel electrophoretic study of the protein and nucleic acid components of African

- horsesickness virus. *Onderstepoort J Vet Res.* 43(4): 193-199.
- BREMER C W, HUISMANS H, VAN DIJK A A, 1990. Characterization and cloning of the African horsesickness virus genome. *Journal of General Virology.* 71(4): 793-799. DOI: 10.1099/0022-1317-71-4-793.
- BROUGHTON J, DENG X, YU G, FASCHING C, SERVELLITA V, SINGH J, MIAO X, STREITHORST J, GRANADOS A, SOTOMAYOR-GONZALEZ A, ZORN K, GOPEZ A, HSU E, GU W, MILLER S, PAN C, GUEVARA H, WADFORD D, CHEN J, CHIU C, 2020. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology.* 38(7): 870-874. DOI: 10.1038/s41587-020-0513-4.
- BUIGUES S, IVANISSEVICH A, VISSANI M A, VIGLIERCHIO V, MINATEL L, CRESPO F, HERRERA M, TIMONEY P, BARRANDEGUY M E, 2012. Outbreak of *Salmonella abortus equi* abortion in embryo recipient polo mares. *Journal of Equine Veterinary Science.* 32(10): S69-S70. DOI: 10.1016/j.jevs.2012.08.150.
- BURROUGHS J N, O'HARA R S, SMALE C J, HAMBLIN C, WALTON A, ARMSTRONG R, MERTENS P P C, 1994. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, cores and VP7 crystals of African horsesickness virus serotype 9. *Journal of General Virology.* 75(8): 1849-1857. DOI: 10.1099/0022-1317-75-8-1849
- BUSTOS C P, GALLARDO J, RETAMAR G, LANZA N S, FALZONI E, CAFFER M I, PICOS J, MUÑOZ A J, PREZ A, MORAS E V, 2016. *Salmonella enterica* serovar *Abortusequi* as an emergent pathogen causing equine abortion in Argentina. *Journal of Equine Veterinary Science.* Elsevier Inc.
- CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, COSTA M, TIAN X, PALEFSKY J M, DOUDNA J A, 2018. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science.* 360(6387), 436-439. DOI: 10.1126/science.aar6245
- CONG L, RAN F A, COX D, LIN S L, Barretto R, HABIB N, HSU P D, WU X B, JIANG W Y, MARRAFFINI L A, ZHANG F, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339(6121), 819-23. DOI: 10.1126/science.1231143.
- EL-THOLOTH M, BRANAVAN M, NAVEENATHAYALAN A, BALACHANDRAN W, 2019. Recombinase polymerase amplification–nucleic acid lateral flow immunoassays for Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus detection. *Mol Biol Rep.* 46(6): 6391-6397. DOI: 10.1007/s11033-019-05085-y
- EVERS W D, 1968. Effect of furaltadone on strangles in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 152(9): 1394-1398.
- FAN X, LI L, ZHAO Y, LIU Y, LIU C, WANG Q, DONG Y, WANG S, CHI T, SONG F, SUN C, WANG Y, HA D, ZHAO Y, BAO J, WU X, WANG Z, 2020. Clinical Validation of Two Recombinase-Based Isothermal Amplification Assays (RPA/RAA) for the Rapid Detection of African Swine Fever Virus. *Front Microbiol.* 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01696.
- SHEN F, DAVYDOVA E K, DU W, KREUTZ J E, PIEPENBURG O, ISMAGILOV R F, 2011. Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase

- Polymerase Amplification Reactions on SlipChip. *Analytical Chemistry*. 83(9): 3533-3540. DOI: 10.1021/ac200247e.
- FONFARA I, RICHTER H, BRATOVIČ M, LE RHUN A, CHARPENTIER E, 2016. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*. 532(7600): 517-521. DOI: 10.1038/nature17945.
- FOWLER V, HOWSON E, FLANNERY J, ROMITO M, LUBISI A, AG ERO M, MERTENS P, BATTEN C, WARREN H, CASTILLO-OLIVARES J, 2017. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Rapid Detection of African Horse Sickness Virus. *Transboundary and Emerging Diseases*. 64(5): 1579-1588. DOI: 10.1111/tbed.12549.
- GALÁN J E, TIMONEY J F, 1987. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 55(12): 3181-3187. DOI: 10.1007/BF02013087.
- GALL D, NIELSEN K, BERMUDEZ R M, REAL M C M O D, HALBERT G, GROULX R, MORENO F, CHOW E Y, CHECKLEY S L, 2006. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting equine serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Salmonella abortusequi*. *Res Vet Sci*. 81(2): 215-217. DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.11.004.
- GARNEAU J E, DUPUIS M È, VILLION M, ROMERO D A, BARRANGOU R, BOYAVAL P, FREMAUX C, HORVATH P, MAGADÁN A H, MOINEAU S, 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 468(7320), 67-71. DOI: 10.1038/nature09523.
- GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, SIKSNYS V, 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(39), E2579-86. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.
- GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, JOUNG J, COLLINS J J, ZHANG F, 2018. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 360(6387), 439-444. DOI: 10.1126/science.aag0179.
- GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, ESSLETZBICHLER P, DY A J, JOUNG J, VERDINE V, DONGHIA N, DARINGER N M, FREIJE C A, 2017. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 356(6336), 438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321.
- GRØNBAEK L M, ANGEN O, VIGRE H, OLSEN S N, 2010. Evaluation of a nested PCR test and bacterial culture of swabs from the nasal passages and from abscesses in relation to diagnosis of *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine Vet J*. 38(1), 59-63. DOI: 10.2746/042516406775374324.
- GRANDOLFO E, PARISI A, RICCI A, LORUSSO E, DE SIENA R, TROTTA A, BUONAVOGLIA D, MARTELLA V, CORRENTE M, 2018. High mortality in foals associated with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* *Abortusequi* infection in Italy. *J Vet Diagn Invest*. 30(3): 483-485. DOI:

- 10.1177/1040638717753965.
- GRUBMAN M J, LEWIS S A, 1992. Identification and characterization of the structural and nonstructural proteins of African horsesickness virus and determination of the genome coding assignments. *Virology*. 186(2), 444-51. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90009-e.
- GUTHRIE, A. J, MACLACHLAN, N. J, JOONE, C, LOURENS, C. W, WEYER, C. T, 2013. Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus. *J Virol Methods*. 189(1), 30-35. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.12.014.
- ISABEL S, SAIFUDDIN F A, RYBARSKI J R, FINKELSTEIN I J, RICK R, 2018. Kinetic basis for DNA target specificity of CRISPR-Cas12a. *Molecular Cell*. 71(5), 816-824.e3. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.06.043.
- ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A, 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 169(12), 5429-33. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- IVENS P, MATTHEWS D, WEBB K, NEWTON J R, STEWARD K, WALLER A S, ROBINSON C, SLATER J D, 2011. Molecular characterisation of 'strangles' outbreaks in the UK: the use of M-protein typing of *Streptococcus equi* ssp. *equi*. *Equine Vet J*. 43(3): 359-364. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00177.x.
- JANSEN R, EMBDEN J, GAASTRA W, SCHOULS L, 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*. 43(6): 1565-1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA J A, CHARPENTIER E, 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 337(6096): 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- JUFFO G D, BASSUINO D M, GOMES D C, WURSTER F, PISSETTI C, PAVARINI S P, DRIEMEIER D, 2017. Equine salmonellosis in southern Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 49(3): 475-482. DOI: 10.1007/s11250-016-1216-1.
- KELLY C, BUGG M, ROBINSON C, MITCHELL Z, DAVIS-POYNTER N, NEWTON J R, JOLLEY K A, MAIDEN M, WALLER A S, 2006. Sequence Variation of the *SeM* Gene of *Streptococcus equi* Allows Discrimination of the Source of Strangles Outbreaks. *J Clin Microbiol*. 44(2): 480-486. DOI: 10.1128/JCM.44.2.480-486.2006.
- KING S, RAJKO ENOW P, ASHBY M, FROST L, BATTEN C, 2020. Outbreak of African Horse Sickness in Thailand, 2020. *Transboundary and Emerging Diseases*. DOI: 10.1111/tbed.13701.
- LABORATORY V, SERVICES D O V, ENG O, 2001. *Emerging Diseases of Animals*, American Society of Microbiology.
- LAURA, ZANOLI, GIUSEPPE, SPOTO, 2012. Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices. *Biosensors*. 3(1): 18-18. DOI: 10.3390/bios3010018.
- LI F, HE P, XIONG D, LOU Y, PU Q, ZHANG H, ZHANG H, YU J, 2021. A Reverse Transcription

- Recombinase-Aided Amplification Method for Rapid and Point-of-Care Detection of SARS-CoV-2, including Variants. *Viruses*. 13(9). DOI: 10.3390/v13091875.
- LI F, YE Q, CHEN M, XIANG X, WU Q, 2021. Cas12aFDet: A CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c. *Anal Chim Acta*. 1151:338248. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338248.
- LI S Y, CHENG Q X, LIU J K, NIE X Q, ZHAO G P, WANG J, 2018. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Research*. DOI: 10.1038/s41422-018-0022-x.
- LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, LI X Y, ZHANG Z L, GAO S, CAO R B, ZHAO G P, WANG J, 2018. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discovery*. 4(1): 20. DOI: 10.1038/s41421-018-0028-z.
- LLORENTE L, IVANISSEVICH A, CAMI A S, MARCO L, VISSANI A, PERGLIONE C O, HERRERA M, BARRANDEGUY M, 2016. Occurrence of multiple abortions due to *Salmonella enterica* serovar abortus equi infection. *Journal of Equine Veterinary Science*. 39S58. DOI: 10.1016/j.jevs.2016.02.126.
- LONG T N, SMITH B M, JAIN P, Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection. *Nature Communications*. DOI: 10.1038/s41467-020-18615-1.
- LU Z, DING B, CHEN Q, QIANG F, SUN J, 2017. Point-of-care-testing of nucleic acids by microfluidics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 94. DOI: 10.1016/j.trac.2017.07.013.
- MADIĆ J, HAJSIG D, SOSTARIĆ B, CURIĆ S, CVETNIĆ Z, 2010. An outbreak of abortion in mares associated with *Salmonella abortusequi* infection. *Equine Vet J*. 29(3): 230-233. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1997.tb01674.x.
- MAFFERT P, REVERCHON S, NASSER W, ROZAND C, ABAIBOU H, 2017. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. DOI: 10.1007/s10096-017-3013-9.
- MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, BROUNS S J, CHARPENTIER E, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA F J, WOLF Y I, YAKUNIN A F, VAN DER OOST J, KOONIN E V, 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 9(6):467-77. DOI: 10.1038/nrmicro2577.
- MARENZONI M L, 2012. Causes of equine abortion, stillbirth and neonatal death in central Italy. *Veterinary Record Journal of the British Veterinary Association*. DOI: 10.1136/vr.100551.
- MARRAFFINI L A, 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 526: 55-61. DOI: 10.1038/nature15386.
- MARTHA, MALLICOTE, 2015. Update on *Streptococcus equi* subsp *equi* Infections. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice*. DOI: 10.1016/j.cveq.2014.11.003.
- MATSUI K, 1961. Studies on the Agglutination of *Salmonella abortus-equi*. *Nippon Saikingaku Zasshi*. 16(9): 777-780.
- MELLOR P S, 1994. Epizootiology and vectors of African horse sickness virus. *Comparative*

- Immunology Microbiology and Infectious Diseases. 17(3-4): 287-296. DOI: 10.1016/0147-9571(94)90048-5.
- MITCHELL O, 2018. Molecular Mechanisms of RNA-Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems. *J Mol Biol.* 2019 Jan 4;431(1):66-87. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.029.
- MOHANRAJU P, MAKAROVA K S, ZETSCHKE B, ZHANG F, KOONIN E V, OOST J V D, 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science.* 353(6299):aad5147. DOI: 10.1126/science.aad5147.
- MONACO F, POLCI A, LELLI R, PINONI C, SAVINI G, 2011. A new duplex real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of African horse sickness virus. *Mol Cell Probes.* 25(2-3): 87-93. DOI: 10.1016/j.mcp.2011.01.006.
- NEWTON J R, VERHEYEN K, TALBOT N C, TIMONEY J F, WOOD J, LAKHANI K H, CHANTER N, 2010. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. *Equine Vet J.* 32(6):515-26. DOI: 10.2746/042516400777584721.
- NEWTON J R, WOOD J, CHANTER N, 1997a. Strangles: Long term carriage of *Streptococcus equi* in horses. *Equine Veterinary Education.* 9(2): 98-102. DOI: 10.1111/j.2042-3292.1997.tb01285.x.
- NEWTON J R, WOOD J, DUNN K A, DEBRAUWERE M N, CHANTER N, 1997b. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *Veterinary Record.* 140(4): 84-90. DOI: 10.1136/vr.140.4.84. PMID: 9032908.
- NGUYEN L, SMITH B, JAIN P, 2020. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection. *Nature Communications.* 11(1): 4906. DOI: 10.1038/s41467-020-18615-1.
- NIWA H, HOBOS S, KINOSHITA Y, MURANAKA M, OCHI A, UENO T, OKU K, HARIU K, KATAYAMA Y, 2016. Aneurysm of the cranial mesenteric artery as a site of carriage of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abortusequi in the horse. *J Vet Diagn Invest.* 28(4): 440-444. DOI: 10.1177/1040638716649640.
- OELLERMANN R A, ELS H J, ERASMUS B J, 1970. Characterization of African horsesickness virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung.* 29(2): 163-174. DOI: 10.1007/BF01249302.
- PERSSON S, JACOBSEN T, OLSEN JE, OLSEN KE, HANSEN F, 2012. A new real-time PCR method for the identification of *Salmonella* Dublin. *J Appl Microbiol.* 113(3):615-21. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05378.x.
- PHILIPPE H, RODOLPHE B, 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 327(5962):167-70. DOI: 10.1126/science.1179555.
- PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, ARMES N A, 2006. DNA Detection Using Recombination Proteins. *Plos Biology.* 4(7): 1115-1121. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204.
- QUAN M, LOURENS C W, MACLACHLAN N J, GARDNER I A, GUTHRIE A J, 2010. Development and optimisation of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus. *J Virol Methods.* 167(1): 45-52. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.03.009.

- RAHN K, GRANDIS S D, CLARKE R C, MCEWEN S A, GALÁN J E, GINOCCHIO C, CURTISS R, GYLES C L, 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes*. 6(4): 271-279. DOI: 10.1016/0890-8508(92)90002-f.
- RAN F, HSU P, LIN C, GOOTENBERG J, KONERMANN S, TREVINO A, SCOTT D, INOUE A, MATOBA S, ZHANG Y, ZHANG F, 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 154(6): 1380-1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
- RODRIGUEZ A, PANGLOLI P, RICHARDS H A, MOUNT J R, DRAUGHON F A, 2006. Prevalence of *Salmonella* in Diverse Environmental Farm Samples. *Journal of Food Protection*. 69(11): 2576-80. DOI: 10.4315/0362-028x-69.11.2576.
- ROY P, HIRASAWA T, FERNANDEZ M, BLINOV V M, RODRIQUE S V J M, 1991. The complete sequence of the group-specific antigen, VP7, of African horsesickness disease virus serotype 4 reveals a close relationship to bluetongue virus. *Journal of General Virology*. 72 ( Pt 6)(6): 1237-1241. DOI: 10.1099/0022-1317-72-6-1237.
- ROY P, MERTENS P, CASAL I, 1994. African horse sickness virus structure. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 17(3-4): 243-273. DOI: 10.1016/0147-9571(94)90046-9.
- SHEN X X, QIU F Z, SHEN L P, YAN T F, ZHAO M C, QI J J, CHEN C, ZHAO L, WANG L, FENG Z S, 2019. A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay to detect hepatitis B virus without DNA extraction. *BMC Infect Dis*. 19(1):229. DOI: 10.1186/s12879-019-3814-9.
- SIMON R, SAMUEL C E, 2007. Activation of NF-kappaB-dependent gene expression by *Salmonella* flagellins FliC and FljB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 355(1):280-5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.01.148.
- SINGH I P, SHARMA V K, KAURA Y K, 1971. Some Aspects of the Epidemiology of *Salmonella Abortus-Equi* Infection in Equines. *British Veterinary Journal*. 127(8):378-83. DOI: 10.1016/s0007-1935(17)37443-2.
- SMITH B P, 1979. Atypical salmonellosis in horses: Fever and depression without diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 175(1): 69-71.
- SMITH B P, 1981. Equine salmonellosis: A contemporary view. *Equine Vet J*. 13(3): 147-51. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1981.tb03471.
- TANG T H, BACHELLERIE J P, ROZHDESTVENSKY T, BORTOLIN M L, HUBER H, DRUNGOWSKI M, ELGE T, BROSIUS J, HUTTENHOFER A, 2002. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(11):7536-41. DOI: 10.1073/pnas.112047299.
- TIMONEY J F, 1993. Strangles. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice*. 9(2):365-74. DOI: 10.1016/s0749-0739(17)30403-0.
- TIMONEY J F, ARTIUSHIN S C, 1997. Detection of *Streptococcus equi* in equine nasal swabs and washes by DNA amplification. *Vet Rec*. 141(17): 446-447. DOI: 10.1136/vr.141.17.446.

- UZZAU S, BROWN D J, WALLIS T, RUBINO S, LEORI G, BERNARD S, CASADESUS J, PLATT D J, OLSEN J E, 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect.* 125(2): 229-255. DOI: 10.1017/s0950268899004379.
- WANG B, WANG R, WANG D, WU J, WANG Y, 2019. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection. *Analytical Chemistry.* 91(19):12156-12161. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01526.
- WEBB K, BARKER C, HARRISON T, HEATHER Z, STEWARD K F, ROBINSON C, NEWTON J R, WALLER A S, 2012. Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. *The Veterinary Journal.* 195(3):300-4. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.07.007.
- WEYER C T, ZIENTARA S, LECOLLINET, 2015. African horse sickness. *Revue Scientifique et Technique.* 34(2): 315-327. DOI: 10.20506/rst.34.2.2359.
- XIAO X, LIN Z, HUANG X, LU J, ZHOU Y, ZHENG L, LOU Y, 2021. Rapid and Sensitive Detection of *Vibrio vulnificus* Using CRISPR/Cas12a Combined With a Recombinase-Aided Amplification Assay. *Front Microbiol.* 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.767315.
- XU C, LI L, JIN W, WAN Y, 2014. Recombinase Polymerase Amplification (RPA) of CaMV-35S Promoter and nos Terminator for Rapid Detection of Genetically Modified Crops. *International Journal of Molecular Sciences.* 15(10):18197-205. DOI: 10.3390/ijms151018197.
- YANG H, GAO P, RAJASHANKAR K, PATEL D, 2016. PAM-Dependent Target DNA Recognition and Cleavage by C2c1 CRISPR-Cas Endonuclease. *Cell.* 167(7): 1814-1828.e1812. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.053.