

致病菌检测

BAW MIRA Cas12a

Acoustofluidic-enhanced pathogen visualization in water environments

发表期刊 Chemical Engineering Journal

影响因子 13.2

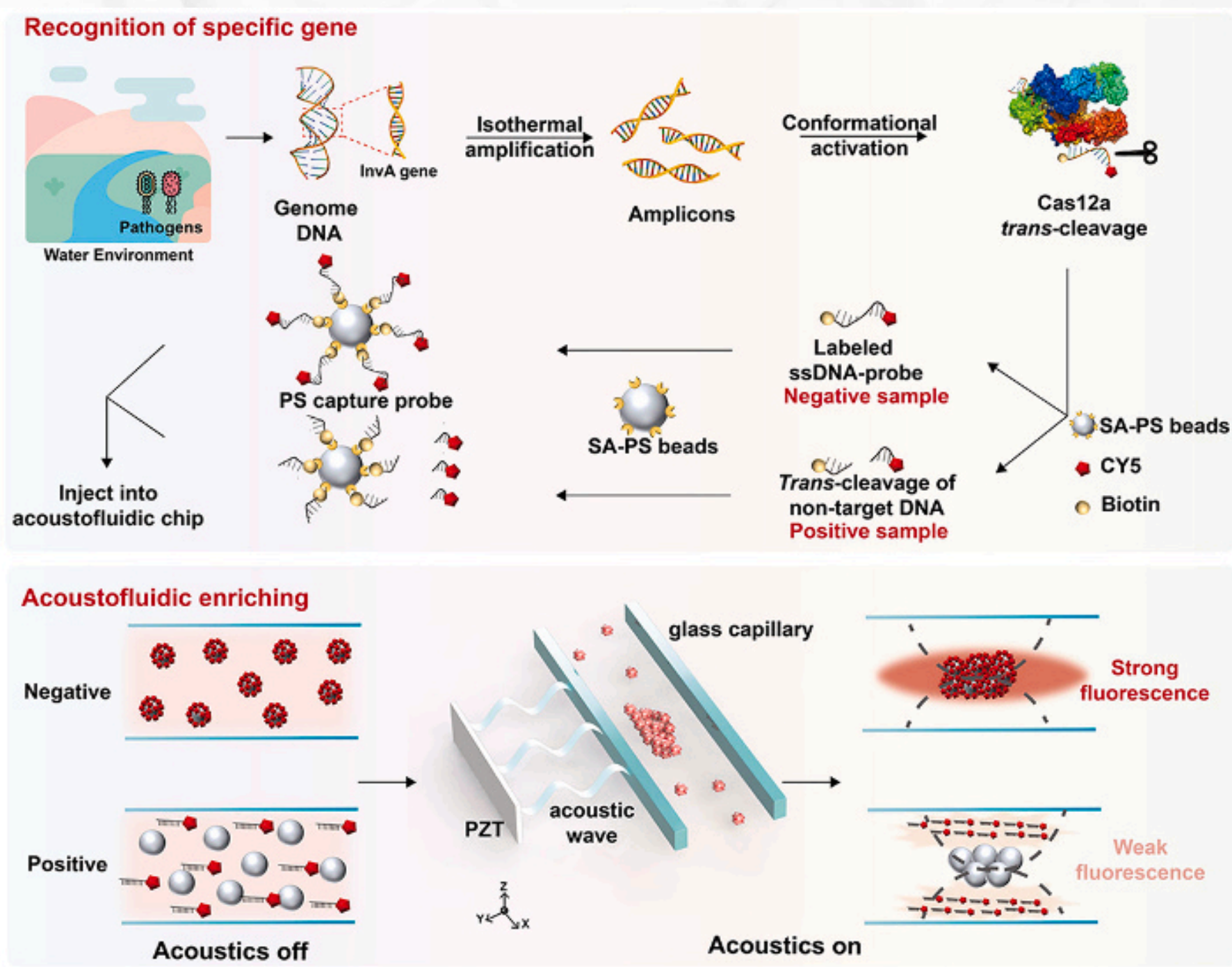
发表单位 中国科学院杭州高等研究院

阅读原文



主要内容

开发一种快速、可视化、高灵敏度的检测平台，实现复杂水环境中鼠伤寒沙门氏菌的半定量检测，兼顾现场应用可行性。该检测平台检测动态范围覆盖5个数量级（ $1\sim 10^5$ 拷贝/反应），检测限达1拷贝/反应，在实际水样检测中，灵敏度为10CFU/mL，与 qPCR相当，且整个检测时间在1小时内完成。



AECD技术整合了声流体富集策略、多酶恒温快速核酸扩增（MIRA）和CRISPR/Cas12a系统，实现三重协同增效。

- 声流体富集：基于体声波（BAW）原理，将荧光强度提升202.4%，同时通过冷却风扇控制温度稳定在30℃左右，避免生物分子失活。
- 分子识别与信号激活：以鼠伤寒沙门氏菌的invA基因为靶点，经MIRA扩增后激活CRISPR/Cas12a的反式切割活性，切割Cy5-生物素标记的单链DNA探针；阳性样本中探针被切割导致微球荧光减弱，阴性样本中荧光保留，实现信号区分。
- 可视化与定量分析：结合CIELab色彩空间分析和荧光光谱检测，通过裸眼观察或荧光成像实现半定量，同时支持supernatant荧光强度检测，进一步验证结果。

微生物检测

试纸条

Super-Fast Detection of *Bacillus cereus* by Combining Cellulose Filter Paper-Based DNA Extraction, Multienzyme Isothermal Rapid Amplification, and Lateral Flow Dipstick (MIRA-LFD)

发表期刊

Foods

影响因子

5.1

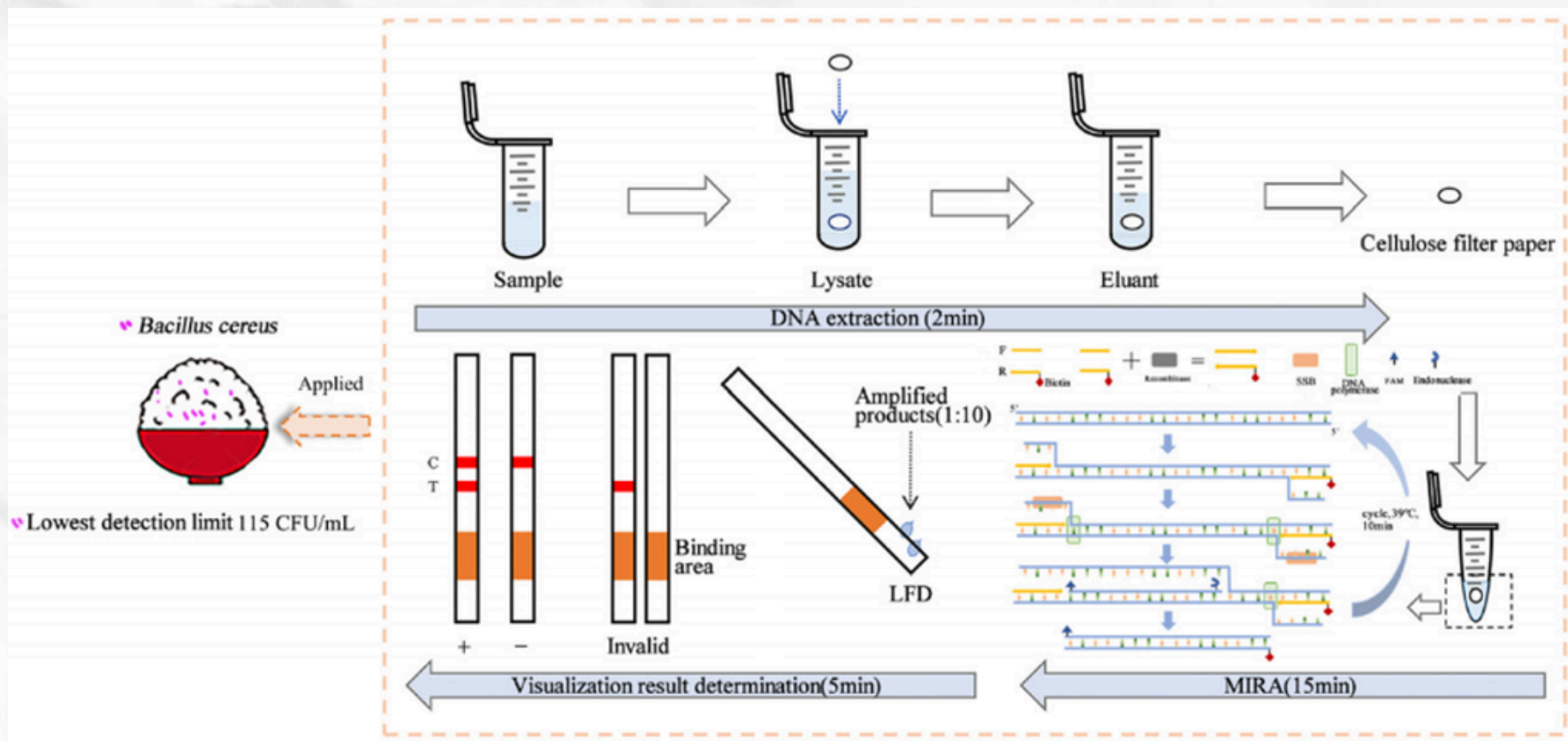
发表单位

昆明理工大学食品科学与工程学院

阅读原文

主要内容

课题组将纤维滤纸DNA提取、多酶恒温快速核酸扩增（MIRA）和侧流试纸（LFD）技术相结合，建立了一种简便、快速的蜡样芽孢杆菌检测方法。建立并优化了MIRA-LFD的等温扩增方法，以评价其检测的特异性和敏感性。最后，将该方法应用于米饭样品中蜡状芽孢杆菌的检测。结果表明，在39℃的温度下，整个扩增过程仅需15min，整个超快速检测体系从提取到结果解释在不到20min内即可完成，检出限为12fg/μL，相当于实际样品中约115cfu/mL的浓度。



核酸提取：纤维滤纸DNA提取，3min

核酸扩增：将提取好的DNA核酸加入至MIRA体系中，15min

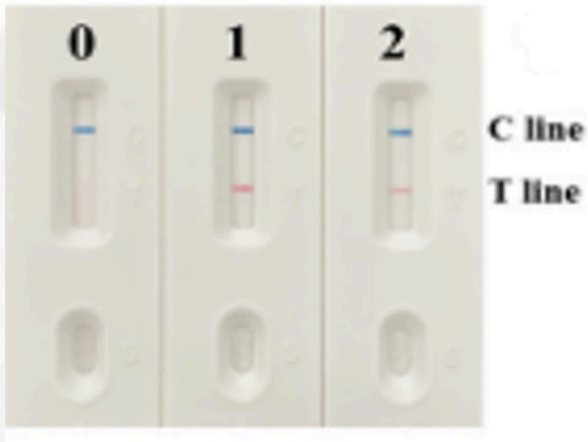
试纸条显色：将核酸扩增产物1:10稀释后滴加至试纸条上，5min读取结果

全流程从核酸提取至结果判读25min以内获得结果

0: 空白对照

1: 米饭中添加人工蜡状芽孢杆菌

2: 米饭中添加蜡状芽孢杆菌和混合细菌



通过在2.5g米饭的一部分中人工添加蜡状芽孢杆菌，在另一部分2.5g米饭中添加背景干扰细菌来模拟实际的样品污染。以不添加任何细菌的米饭作为空白对照。结果如图所示，添加蜡样芽孢杆菌和混合细菌的样品在T线上呈显色，测试结果为阳性。空白对照试验结果为阴性。

微生物检测 试纸条

Hybrid paper/PDMS microfluidic device integrated with RNA extraction and recombinase polymerase amplification for detection of norovirus in foods

发表期刊 Applied and Environmental Microbiology

发表单位 麦吉尔大学

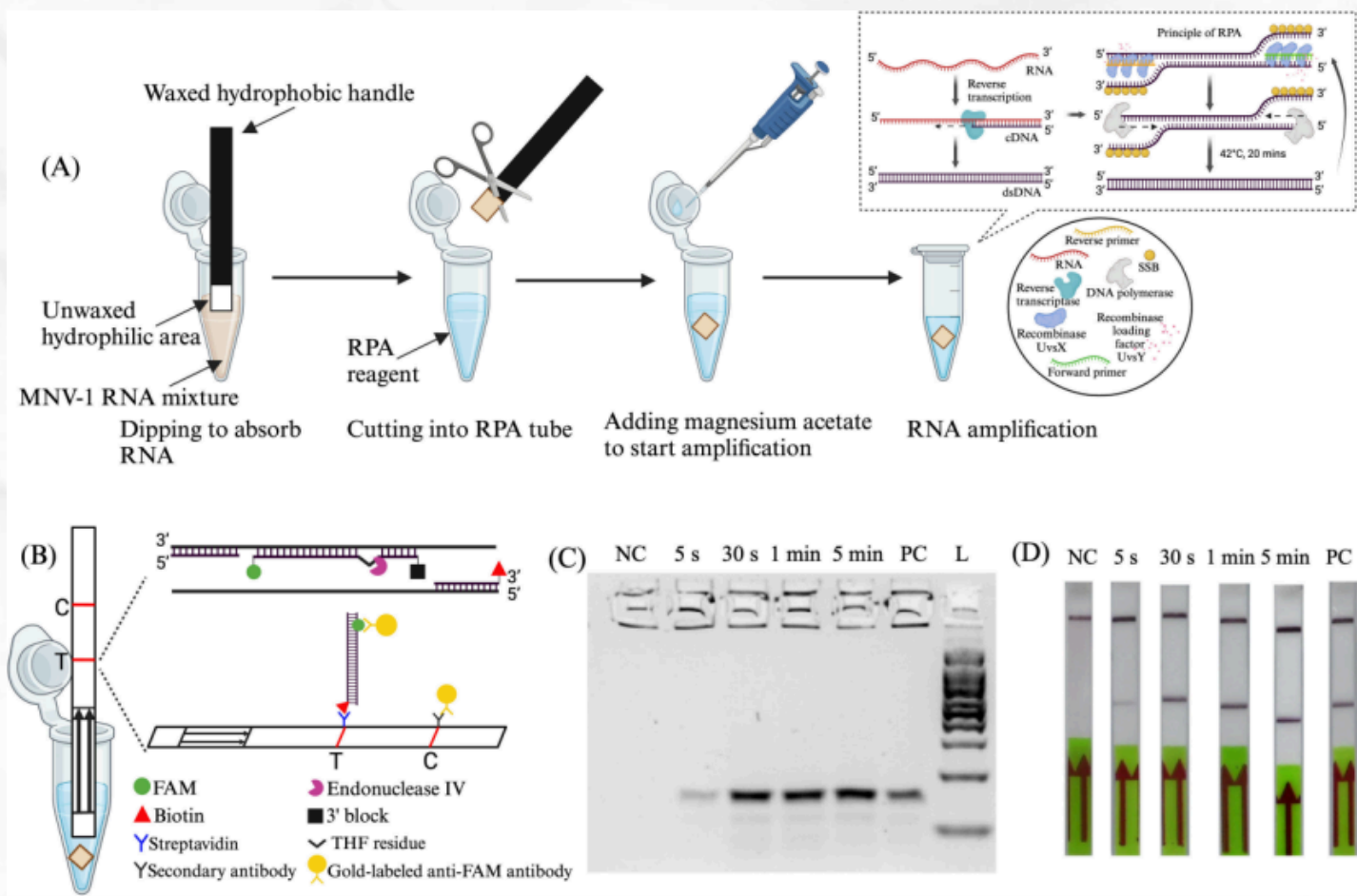
主要内容

影响因子 3.7

阅读原文

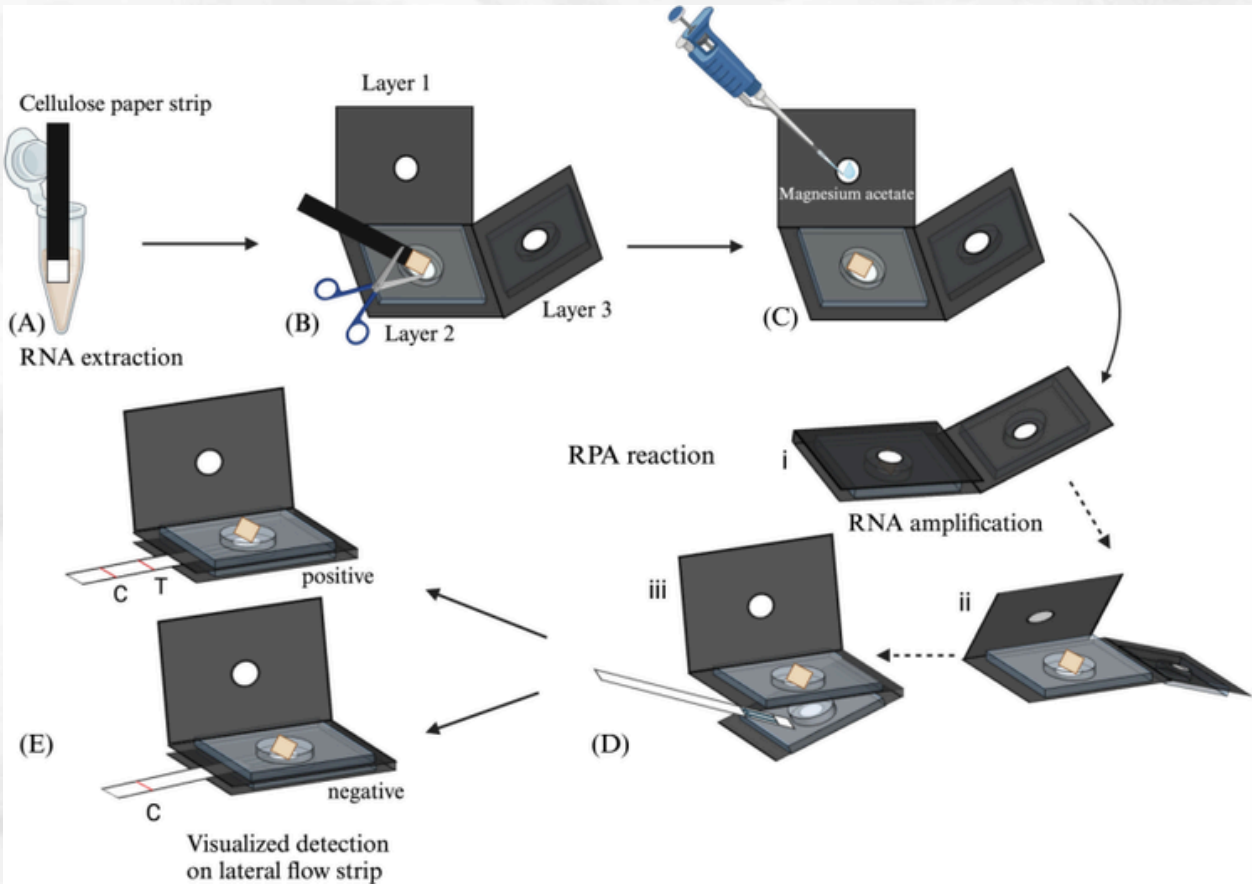


课题组开发了一种折纸微流控装置，使用小鼠诺如病毒1（MNV-1）作为诺如病毒的替代品。该折纸微流控装置通过试纸条吸收RNA，使用MIRA多酶恒温快速核酸扩增技术进行RNA扩增，以及试纸条横向流动分析。整个检测过程和结果可视化，检测在35 min内完成，且特异性100%、检测限为200 PFU/mL。该装置在偏远和资源环境中检测农业食品中的食源性病毒方面具有巨大的潜力。



纤维素纸条吸收了MNV-1 RNA，随后将其释放到MIRA试剂中，RNA首先被逆转录成互补DNA（cDNA），然后扩增成双链DNA（dsDNA），接着探针与目标序列进行了特异性的结合，碱性四氢呋喃（THF）残基被内切酶IV裂解，使链被聚合酶延伸。扩增子被捕获，在T线上产生视觉信号。

课题组开发了一种折叠的纸/PDMS微流控装置，该装置结合了核酸提取、等温核酸扩增、可视化检测多种功能，可以无缝集成从样品制备到MNV-1的终点检测。该微流控装置在35 min范围内完成检测，检测限均为200 PFU/mL。并且每个微流控设备的成本计算为6.76美元。



微生物检测

MIRA-Cas12a

定量检测

Tuning the dynamic reaction balance of CRISPR/Cas12a and RPA in one-pot: A key to switch nucleic acid quantification

发表期刊

ACS Sensors

影响因子

8.9

发表单位

江南大学

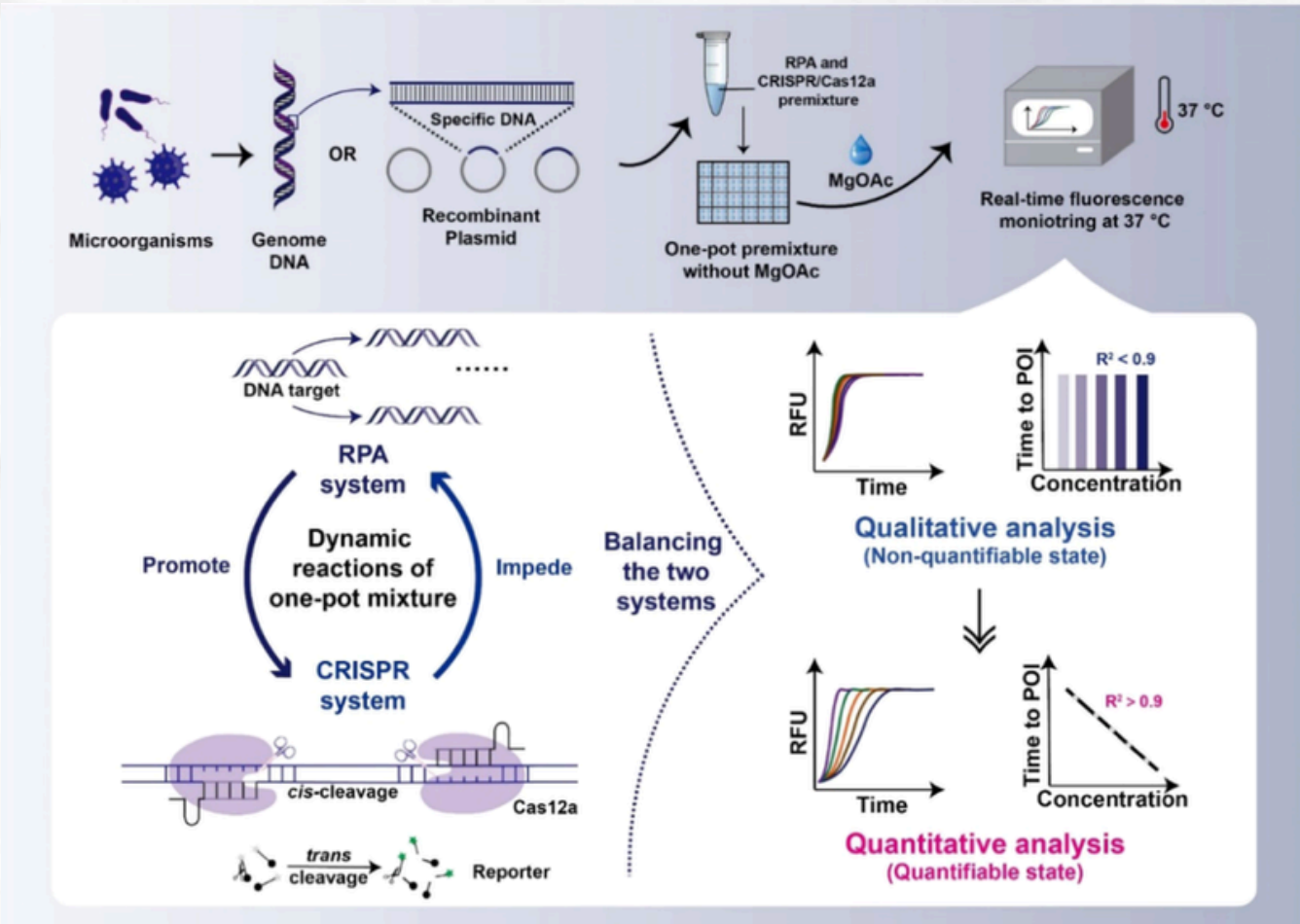
阅读原文



主要内容

课题组利用一管法CRISPR/Cas12a-MIRA系统对微生物进行精准定量的策略，基于MIRA多酶恒温快速核酸扩增与CRISPR/Cas12a切割的多系统动态反应平衡控制，建立了一种新型的微生物定量检测技术，命名为OICRQ。

该技术操作简便，仅需37℃恒温环境，效率高，检测时间小于1小时、灵敏度高，最低10copies/反应、分辨率高实现种水平的定量、准确性高， $P>0.05$ 、普适性强，可用于细菌、真菌、病毒等各种微生物的定量。



该系统将CRISPR与MIRA试剂在25μL反应体系中混合，包含50-400nM LbCas12a与crRNA（双crRNA时各浓度为Cas12a的一半）、500nM ssDNA-FQ报告探针、冻干MIRA颗粒混合物、100-1000nM MIRA正反向引物、特定DNA靶标及14mM MgOAc。添加MgOAc后在37℃下启动反应，通过Light Cycler 96仪器监测荧光强度。

(B) OICRQ对酱油中耐乙酸乳杆菌的检测结果。

(C) OICRQ与qPCR结果对比。

(D) OICRQ对样品中提取的SARS-CoV-2RNA 的检测结果。

(E) OICRQ与qPCR结果对比。统计方法采用配对t检验，当 $P>0.05$ 时，两组检测结果无显著差异。所有数据均以平均值 ± 标准差（mean ± SD）表示（n=3，n 代表实验重复次数）。

