

反式切割CRISPR/Cas技术在食源致病微生物检测方面的原理及应用

戴永进¹, 孙 静¹, 张莫然¹, 刘玉娟¹, 陈洪周^{2,*}, 陆颖健^{1,*}

(1.南京财经大学食品科学与工程学院, 现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏 南京 210023;

2.安徽国泰众信检测技术有限公司, 安徽 合肥 230051)

摘 要: 食源性致病微生物是食品安全的一大严重威胁, 传统的生化检测手段面临着一系列挑战。近年来, 随着成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 技术的逐步发展, 具有反式切割活性的CRISPR/Cas体系受到了越来越多的关注。本文综述了具有反式切割活性的CRISPR/Cas体系的起源与分类, 并详细介绍了具有反式切割活性的CRISPR/Cas体系的作用原理。同时, 本文对反式切割CRISPR/Cas技术在食源性致病微生物领域的多方面应用进行了综述, 并讨论了该技术的优劣和未来发展方向。

关键词: CRISPR/Cas; 反式切割; 食源性致病菌; 核酸检测

Principle and Application of *Trans*-Cleavage CRISPR/Cas Technology for the Detection of Foodborne Pathogenic Microorganisms

DAI Yongjin¹, SUN Jing¹, ZHANG Moran¹, LIU Yujuan¹, CHEN Hongzhou^{2,*}, LU Yingjian^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Modern Grain Circulation and Security Collaborative Innovation Center, Nanjing 210023, China; 2. Anhui Guotai Zhongxin Testing Technology Co. Ltd., Hefei 230051, China)

Abstract: Foodborne pathogenic microorganisms are a serious threat to food safety. Currently, traditional biochemical assays are facing a series of challenges in the detection of foodborne pathogens. In recent years, with the gradual development of CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) technology, the CRISPR/CRISPR-associated proteins (Cas) system with *trans*-cleavage activity has received much attention from researchers. In this article, the origin, classification and principles of CRISPR/Cas systems with *trans*-cleavage activity are summarized. This paper also reviews the versatile application of *trans*-cleavage CRISPR/Cas systems in the field of foodborne pathogens, and concludes with a discussion of the advantages, disadvantages and future directions of this technology.

Keywords: clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins systems; *trans*-cleavage; foodborne pathogen; nucleic acid detection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231205-029

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 22-0351-10

引文格式:

戴永进, 孙静, 张莫然, 等. 反式切割CRISPR/Cas技术在食源致病微生物检测方面的原理及应用[J]. 食品科学, 2024, 45(22): 351-360. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231205-029. <http://www.spkx.net.cn>

DAI Yongjin, SUN Jing, ZHANG Moran, et al. Principle and application of *trans*-cleavage CRISPR/Cas technology for the detection of foodborne pathogenic microorganisms[J]. Food Science, 2024, 45(22): 351-360. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20231205-029. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-12-05

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

第一作者简介: 戴永进 (1999—) (ORCID: 0009-0009-8015-5371), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 564790954@qq.com

*通信作者简介: 陈洪周 (1978—) (ORCID: 0009-0006-0505-1220), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品质量与安全。

E-mail: hz.chen@163.com

陆颖健 (1985—) (ORCID: 0000-0001-6425-2774), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品质量与安全。

E-mail: yingjianlu@nufe.edu.cn

据世界卫生组织统计,全世界每年有超过6亿人因为食用受污染的食品而患病,直接或间接导致超过42万人死亡^[1]。食源性致病微生物尤其是沙门氏菌(*Salmonella*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) (以下简称单增李斯特菌)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) ,是目前最常见的食源性致病因素,易导致严重的感染症状。微生物选择性培养和生化鉴定法是国内和国际主流的致病型微生物检测方法,但目前存在检测周期长、灵敏度不高、操作繁琐、耗费成本较高等缺点,并不适合时间紧迫条件下对爆发性食源性疾病的检测分析。近年来,比较主流的快速检测方法是分子检测技术。分子检测技术根据致病菌的特定核酸设计相关引物进行核酸链式扩增,其中包括称为聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的典型扩增技术。将核酸扩增与琼脂糖凝胶电泳、实时荧光定量PCR(quantitative realtime PCR, qPCR)等信号转导手段结合,能够根据不同的检测要求,实现定性或相对定量检测^[2]。

随着对成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)的研究逐步深入,CRISPR/Cas(CRISPR associate system)技术已在新一代基因编辑技术中崭露头角。基于CRISPR/Cas反式切割活性的核酸检测技术因其方法简单、结果直观、灵敏度极高等一系列优点,在多种检测环节展现出了独特的优势。本文将从CRISPR/Cas系统的起源与基本分类、常见CRISPR系统反式切割机理、针对致病食源性微生物应用原理等多个方面,对基于反式切割的CRISPR/Cas核酸检测技术在食源性致病菌检测方面的应用进行综述,并展望反式切割CRISPR/Cas检测技术在食源性致病微生物检测领域的发展方向。

1 CRISPR反式切割的起源

1.1 CRISPR/Cas起源

CRISPR系统由CRISPR序列和Cas序列组成,CRISPR序列是一种具有高度相似性的规律成簇的间隔短回文重复序列,是引导RNA(gRNA)的转录区;Cas序列则是用于编码CRISPR的作用蛋白,即Cas效应蛋白。1987年,日本大阪大学Ishino等^[3]研究了大肠埃希菌中碱性磷酸酶的同工酶基因*iap*,发现在该基因3'端具有特殊结构,即29 bp的高度相似序列分别被32 bp序列间隔,形成了5个拷贝的串联重复序列。2000年,Mojica等^[4]在20多种微生物中都发现了类似的短序列重复结构,并将这种短序列重复结构命名为规则的短间隔重复(short regularly spaced repeats, SRSRs)。2007年,Barrangou等^[5]发现了CRISPR序列可以整合外源核酸片段,证实了

CRISPR系统在细菌获得性免疫过程中发挥重要作用。2012年,Jennifer Doudna和Emmanulle Charpentier团队合作发表了论文,证明crRNAs(CRISPR RNAs)与反式激活crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)配对结合后形成杂交双链RNA结构,可以介导Cas9蛋白定向切割DNA序列^[6]。2013年,张锋团队将化脓性链球菌的CRISPR/Cas9系统进行优化,并首次将CRISPR/Cas9基因编辑技术应用于哺乳动物细胞^[7]。目前基于CRISPR-Cas的基因编辑技术已经在病原微生物^[8]、功能性微生物^[9]、昆虫^[10]、植物^[11]、动物^[12]和人类疾病治疗^[13]等多个方面得到了广泛且成功的应用^[14]。

1.2 CRISPR/Cas系统分类

2011年,基于系统发育、基因组和结构分析的证据,Makarov等^[15]将目前已发现的大多数CRISPR/Cas系统分为I、II、III型,暂时无法分类的命名为U型。2015年,Makarov等^[16]经矩阵分型研究,增加了IV型和V型系统,并向下分类出5个型、16个亚型,形成了现在应用的分类方法。2019年Makarov等^[17]将亚型的分类数增加到了33个,并增加了以RNA为切割目标的IV型^[18]。目前已知的CRISPR/Cas系统分为2个大类6个类型,每个类型又分为多个亚型,每个亚型包含多个共同组成CRISPR系统的Cas蛋白^[19]。具体分类表如表1所示。

表1 CRISPR系统分类^[17]
Table 1 Classification of CRISPR systems^[17]

大类	类型	亚型	包含的Cas蛋白
第一大类	I	A、B、C、D、E、F1、F2、F3	Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8
	III	A、B、C、D、E、F	Cas1、Cas2、Cas5、Cas6、Cas7、Cas10、Cas11
	IV	A、B、C	Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas11
	II	A、B、C1、C2	Cas1、Cas2、Cas4、Cas9
第二大类	V	A、B1、B2、C、D、E、F1、F1(U3)、F2、F3、G、U1、U2、U4、K(U5)	Cas1、Cas2、Cas4、Cas12、Cas14
	VI	A、B1、B2、C、D	Cas1、Cas2、Cas13

CRISPR/Cas系统中的第一大类系统中,包含的蛋白是由多个Cas蛋白组成的效应模块,其中的部分组成crRNA结合复合物,共同发挥作用。第一大类包含I、III和IV型,包括了有整合酶作用的I型Cas1蛋白^[20],生成crRNA的III型Cas7和Cas11蛋白^[21]等。第二大类的功能蛋白是单个、多结构域的crRNA结合蛋白,这些蛋白包含了实行核酸切割需要的全部组件。第二大类包含II型、V型和VI型,包括了II型Cas9蛋白、V型Cas12a(Cpf1)蛋白和Cas14a蛋白、VI型Cas13a(c2c2)蛋白等。此类功能蛋白虽然只在CRISPR系统中占据非常小的比例,但由

于其完整的核酸切割功能特性，一直是研究和应用的热点方向。

1.3 反式切割CRISPR系统

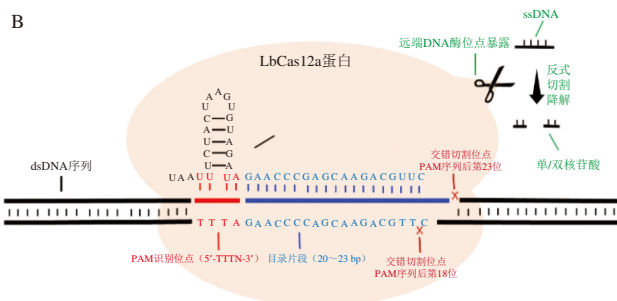
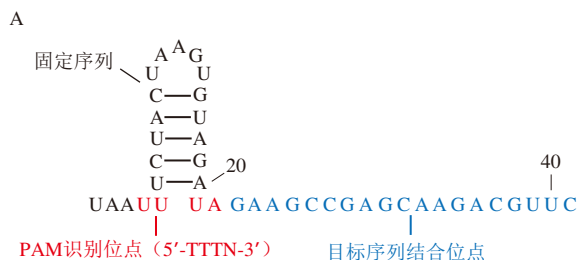
反式切割指Cas蛋白在受引导RNA (gRNA) 激活时，表现出针对所有单链核酸分子的无差别降解活性。在基因编辑领域，反式切割易破坏细胞体系中的转录与翻译部分，造成强烈的细胞毒性，因此，Cas蛋白的反式切割活性不利于基因编辑。相反的是，在核酸检测领域反式切割能够使体系产生可检测的核酸酶活性，促进指数级信号转导。与基于顺式切割的CRISPR系统相比 (Cas9)，反式切割体系对仪器的需求更为简单，更适合多种复杂环境。在已知的CRISPR/Cas系统中，Cas12、13和14系统是被广泛证实拥有反式切割能力的生物效应器。基于反式切割活性的CRISPR检测，目前已经在病原体、转基因、食物掺假、生物毒素和重金属等一系列检测方向产生多种应用^[22]。

2 常见CRISPR/Cas反式切割系统作用原理介绍

2.1 CRISPR/Cas12a (Cpf1) 系统

2015年，Zetsche等^[23]表征了FnCas12a (FnCpf1) 蛋白，并预言了其未来在基因编辑检测上的应用。Cas12a蛋白属于第二类V型V-A亚型，大小约为1 300个氨基酸，由REC叶和Nuc叶形成双叶结构，可以与crRNA形成带有核酸酶活性的复合物^[24]。Cas12a系统只需要一个RNA长链分子，即crRNA。Cas12a蛋白不仅包括了RuvC区域作为核酸酶位点，还具有一个RNA加工位点。

Cas12a系统中的crRNA分为固定序列和间隔序列两个部分。固定序列包括用于结合Cas12a蛋白的特殊空间结构，来源于不同生物的Cas12a系统中，固定序列具有相对应的碱基顺序，其中来自毛螺菌科细菌的LbCas12a具体结构如图1所示。固定序列后为长度20~25个核苷酸的间隔序列，为靶标DNA结合位点。Cas12a对单链DNA (ssDNA) 和双链DNA (dsDNA) 靶标均能产生识别切割活性，但靶标双链DNA需含有前间隔序列邻近基序 (prespacer sequence adjacent motif, PAM) 以引导解链。Cas12a的PAM识别位点为富含T的PAM序列后的间隔序列 (LbCas12a和AsCas12a的PAM序列为5'-TTTN-3'，FnCas12a的PAM序列为5'-TTN-3'，N代表A/G/C)。crRNA序列的总长一般为42~44个核苷酸^[23]。



A. crRNA结构; B. LbCas12a切割效应。

图1 LbCas12a效应图^[25]

Fig. 1 Function of LbCas12a^[25]

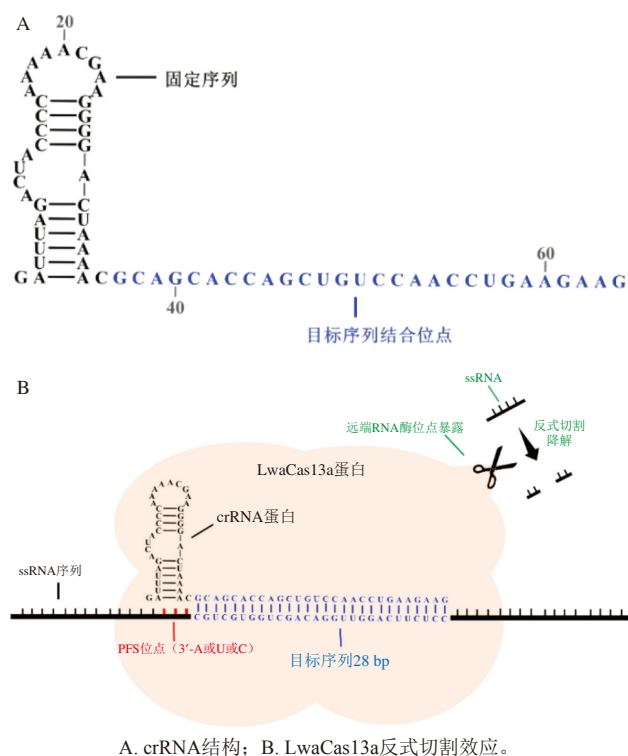
Cas12a在crRNA引导下与互补的单链DNA结合时，双叶结构的构象改变。原本封闭在蛋白中的DNA酶催化基团，向外源单链DNA暴露。与Cas9系统相同的是，Cas12a-crRNA复合物可以对crRNA靶向的DNA双链进行顺式切割，切割位点分别是crRNA靶向链PAM序列后的第23位和非靶向链PAM序列后的第18位，此类切割过程又称交错切割。交错切割产生的同时，Cas12a-crRNA对任意单链DNA产生非定向的反式切割。此时，反应体系中产生单链DNA酶活性，单链DNA降解为单/双核苷酸^[26]。

2.2 CRISPR/Cas13a (c2c2) 系统

2015年，Eugene Koonin团队和张锋团队合作，使用计算生物学方法在微生物宏基因组数据库中发现了Cas13a (c2c2) 系统^[27]。2017年，Knott^[28]与Liu Liang^[29-30]等通过分别解析Cas13a单蛋白、Cas13a-crRNA二元复合物、Cas13a-crRNA及靶RNA三元复合物的晶体结构，指出Cas13a是一种RNA介导的具有RNA酶活性的Cas效应蛋白。Cas13a属于第二类VI型VI-A亚型，具有2个保守的HEPN结构域，但不具有RuvC结构域^[31]。

在CRISPR-Cas13a反应体系中，Cas13a蛋白首先识别并结合pre-crRNA，对pre-crRNA加工使其成熟，形成Cas13a-crRNA二元复合物。接下来反应体系中游离的目标单链RNA与crRNA互补结合，引起构象协同变化，使2个HEPN结构域的空间位置相互靠近^[29-30,32]，形成HEPN核酸酶位点并暴露在蛋白质外侧。此时复合物产生非特异性的单链RNA反式切割活性，体系中单链RNA受到降解，转变为单/双核苷酸^[31]。

目前被广泛应用的LwaCas13a蛋白 (源于韦德纤毛菌) 由张锋团队在2017年首次发现^[33]。由于其crRNA结构简单，仅更倾向于3'间隔区侧翼位点 (3'-A或U或C)，且活性较高，已被成功用于建立多种致病微生物检测体系。LwaCas13a的crRNA序列结构也分为固定序列和间隔序列两个部分，具体结构如图2所示。固定序列长度为36个碱基，起引导作用。间隔序列长度为28个碱基左右，负责与目标单链RNA互补配对^[18,34]。



A. crRNA结构; B. LwaCas13a反式切割效应。

图2 LwaCas13a效应图^[35]Fig. 2 Function of LwaCas13a^[35]

Cas13a的检测体系针对RNA, 因此针对DNA目标物Cas13a反应体系需添加T7 RNA聚合酶和T7启动子, 用于转录扩增DNA为单链RNA。

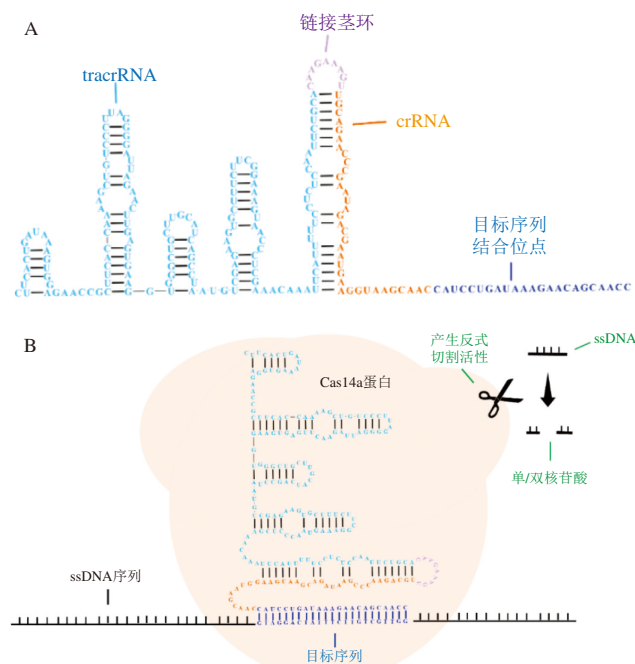
2.3 CRISPR/Cas14a系统

2018年, Harrington等^[36]通过宏基因组分析, 从古细菌中发现了Cas14a蛋白, 并解析了其由RNA引导的反式切割活性。Cas14a蛋白属于第二大类V型V-F1亚型, 分子质量极小, 仅有约400~700个氨基酸。目前针对Cas14a的结构解析还不是很清楚, 但Harrington等^[36]认为Cas14a结构中也含有RuvC核酸酶结构域。在Cas14a复合物中, gRNA计算质量约占总质量的48%, 远大于Cas12和Cas13, 因此Cas14a的gRNA更长更复杂。

Cas14a能够识别单链DNA, 同时不受PAM序列限制。Cas14a的gRNA可分为crRNA和tracrRNA两个部分, 仅有Cas14a-crRNA-tracrRNA 3个组分组成复合物才能激发其反式切割活性, 并对目标基因碱基错配极为敏感。在crRNA设计中, 有学者尝试通过设计茎环结构将crRNA和tracrRNA相连接, 以达到简化gRNA设计的难度, 结构如图3所示^[37]。

基于Cas14a的检测体系, 需添加T7外切酶将双链DNA转化为单链DNA, 同时要对靶DNA进行硫代磷酸酯修饰以防降解, 且gRNA结构复杂, 不当设计易造成脱靶效应, 实施难度较大。虽然目前针对Cas14a检测

体系的研究较少, 但相关研究显示, 在针对单链DNA目标的检测体系中, Cas14a反式切割活性较Cas12a体系有明显提高^[38]。



A. gRNA结构; B. Cas14a反式切割效应。

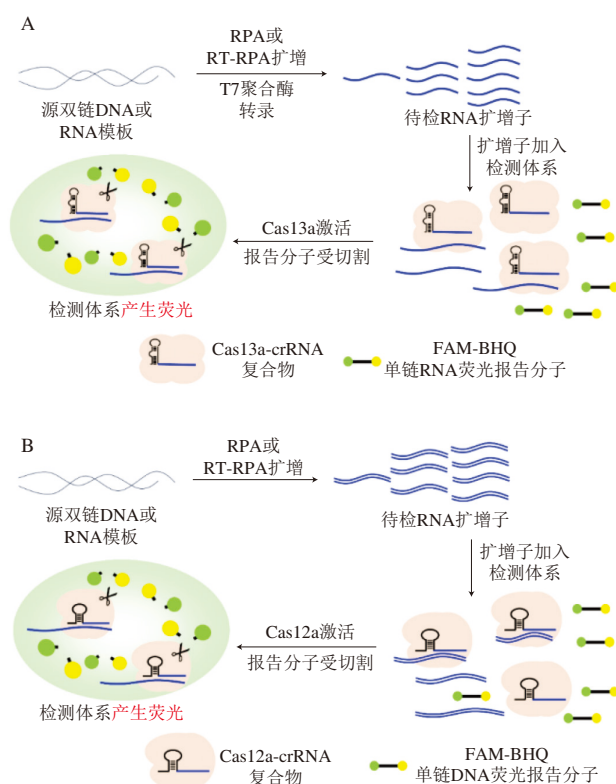
图3 Cas14a效应图^[37]Fig. 3 Function of Cas14a^[37]

2.4 DETECTOR和SHERLOCK

2017年, 张锋团队利用CRISPR-Cas13a (c2c2) 的非特异性切割活性建立了被称为SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking) 的检测方法, 对寨卡病毒、登革热病毒和人类DNA基因突变进行了成功检测 (图4A)^[34]。SHERLOCK的检测流程可大致区分为扩增、识别和反应3个部分。扩增部分即使用各种核酸扩增手段, 增加体系内目标核酸浓度。识别部分即将扩增完成的核酸链添加至检测体系, 对Cas蛋白进行激活。反应部分为被激活的Cas蛋白产生反式切割活性, 此时检测体系中的信号分子受切割产生信号转导。在SHERLOCK检测中, 识别和反应部分可通过荧光报告分子进行结合。研究者使用LwCas13a作为检测效应Cas酶, 识别与检测体系包括LwCas13a、crRNA、单链RNA荧光报告分子、外源RNA酶抑制剂、人源背景RNA、目标RNA和核酸酶缓冲液。单链荧光RNA报告分子是由简单单链RNA连接的6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein, 6-FAM) 和黑洞淬灭剂1 (black hole quencher 1, BHQ1), 在无RNA酶体系中, 6-FAM的荧光效应受RNA连接的BHQ1淬灭, 体系无荧光效应; 当目标体系产生RNA酶活性时, RNA链断裂导致6-FAM和BHQ1分离, 淬灭效应消失, 6-FAM产生可被读取的荧光。对于DNA样品的检测,

SHERLOCK检测体系需额外添加T7 RNA聚合酶和核糖核苷酸底物用于RNA转录。SHERLOCK核酸检测平台实现了和qPCR与微滴式数字PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 相同的灵敏度, 同时成功鉴别出了寨卡病毒单个碱基错配。

2018年Jennifer Doudna团队将重组酶聚合酶扩增与CRISPR-Cas12a相结合, 开发了被称为DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter) 的DNA检测系统(图4B)^[39]。DETECTR和SHERLOCK一样, 也可分为扩增和识别反应步骤。由于Cas12a可直接被DNA双链激活, 因此在DETECTR识别体系中, RNA转录阶段相关的酶和底物可以直接省略。研究者选用LbCas12a作为效应Cas酶, 检测反应体系成分包括LbCas12a、crRNA、扩增产物、缓冲液和单链荧光DNA报告分子。在粗提取的DNA样品中, Jennifer Doudna团队实现了对HPV16和HPV18病毒的成功检验。



A. SHERLOCK流程图; B. DETECTR流程图。RPA. 重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification); RT-RPA. 逆转录-重组酶聚合酶扩增技术 (reverse transcription-recombinase polymerase amplification)。

图4 SHERLOCK和DETECTR检测示意图^[34,39]

Fig. 4 Schematic diagram of SHERLOCK and DETECTR detection^[34,39]

SHERLOCK和DETECTR两种方法极为相似, 但由于采用不同的Cas酶而具有不同的检测特性。SHERLOCK检测手段不受PAM序列限制, 需要添加转录步骤且涉及RNA, 总流程较复杂。DETECTR方法直接作

用于双链DNA, 但Cas酶的识别受到PAM序列的限制, 对crRNA选择设计的限制较多。扩增阶段两种方法均采用了重组酶聚合酶扩增技术, 不受变温仪器限制, 但气溶胶污染和假阳性问题不可避免, 且扩增试剂成本较高, 不利于大规模推广。

针对SHERLOCK和DETECTR存在的问题, 研究者开发出了一系列针对性的改进方法。2018年, Sabeti团队将SHERLOCK方法应用于寨卡病毒和登革热病毒的现场检测, 并发明了一种被称为HUDISON (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases) 的样本提取方法^[40]。HUDISON方法针对液体样品 (如全血、血清、唾液、尿液等), 需在样品中添加一定浓度的三(2-羧乙基)膦和乙二胺四乙酸, 95 °C加热10 min, 热裂解病毒的同时灭活环境RNA酶。同年, 张锋团队将SHERLOCK升级为SHERLOCKv2, SHERLOCKv2体系包括多种Cas酶复合体系和多种荧光靶标检测体系, 能够实现多重靶标检测^[41]。中科院植物生理生态研究所王金团队在2018年基于PCR和LbCas12a开发了一种被称为HOLMES (an one-hour low-cost multipurpose highly efficient system) 的检测方法^[42]。HOLMES的最大特点便是快速简单且有效, 整个HOLMES流程包括了45 min的PCR循环和15 min的荧光检测, 简便的PCR扩增方法有助于成本降低和检测人员快速上手应用。2019年, 王金团队筛选纯化了来源于酸土脂环酸芽孢杆菌的AacCas12b蛋白, 并将广泛应用的环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 方法与之结合, 通过55 °C定温启动反应, 建立了称为HOLMESv2的检测方法^[43]。和LbCas12a相比, Aacas12b蛋白对PAM序列的需求更低 (5'-TTN-3'), 同时能够在更高的温度下产生顺式和反式切割活性 (45~55 °C)。HOLMESv2实现了扩增与检测一步法结合, 减少了容易导致外源性核酸污染的环节, 同时简化了变温仪器的选择, 但反应的灵敏度较于常规两步法有所降低。针对多种RNA靶标和DNA靶标, HOLMESv2实现了单管体系一步法定性和定量检测。

3 反式切割CRISPR/Cas在食源性致病微生物中的应用

3.1 基于核酸扩增和报告分子的检测应用

目前方法论相对成熟且应用较广泛的反式切割CRISPR/Cas检测方法, 和SHERLOCK、DETECTR方法类似, 基于核酸扩增和Cas蛋白识别产生反式切割活性, 使用报告分子进行荧光或试纸检测。由于原理清晰、上手简便, 这类方法在食源性致病菌检测方向已获得了广泛应用 (表2)。

表 2 基于核酸扩增和报告分子检测的应用统计
Table 2 Application of trans-cleavage CRISPR/Cas in the detection based on nucleic acid amplification and single-stranded reporter molecules

预扩增方式	检测目标	效应蛋白	检测时间	信号转导方法	检测灵敏度	定量情况	参考文献
RPA	大肠杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌	Cas12a	45 min	荧光	10 copies/reaction	N	[44]
RPA	沙门氏菌	Cas13a	45 min	荧光	1 copies/reaction	N	[45]
RPA	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	Cas12a	50 min	荧光	1 CFU/mL	N	[46]
RPA	沙门氏菌	Cas12a	35 min	荧光	10 CFU/mL	N	[47]
RAA	沙门氏菌	Cas12a	55 min	荧光	10 ³ CFU/mL	N	[48]
RPA	单增李斯特菌	Cas12a	50 min	荧光	10 CFU/mL	N	[49]
RPA	单增李斯特菌	Cas12a	25 min	荧光	4.4 CFU/g	N	[50]
RAA	金黄色葡萄球菌	Cas12a	70 min	试纸	5.4×10 ² CFU/mL	N	[51]
RAA	副溶血弧菌	Cas12a	60 min	试纸	6.7×10 ¹ CFU/mL	N	[52]
LAMP	沙门氏菌	Cas12a	90 min	试纸	1.22 CFU/mL	N	[53]
LAMP	大肠杆菌	Cas12a	90 min	荧光	1.22 CFU/mL	N	[54]
LAMP	副溶血弧菌	Cas12a	30 min	荧光	2.5 CFU/mL	Y	[25]
LAMP	福氏志贺菌	Cas12a	40 min	荧光	4 copies/μL	N	[55]
NEAA	沙门氏菌	Cas12a	20 min	荧光	80 CFU/mL	N	[56]
NASBA	沙门氏菌	Cas13a	2.5 h	荧光	1 CFU/mL	Y	[57]
PCR、RAA	单增李斯特菌	Cas12a	2 h	荧光	3.37×10 ¹ CFU/mL	Y	[58]
PCR	金黄色葡萄球菌	Cas13a	4 h	荧光	1 CFU/mL	N	[59]

注：RAA.重组酶介导等温核酸扩增（recombinase aided amplification）；NEAA.切口酶辅助扩增（nicking enzyme-assisted amplification）；NASBA.核酸依赖性扩增（nucleic acid sequence-based amplification）。N.未实现定量；Y.实现定量。

2006年由Piepenburg等^[60]发明的RPA是一种恒温（37~42℃）核酸扩增技术，其反应过程极快，无需精密的控温设备，已被广泛应用于现场核酸检测。Liu Hua等^[44]将Cas12a与RPA结合，针对大肠杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌进行检测。同时发现，相比于传统的RPA结合侧流试纸，RPA-Cas12a两步法能够增加10 倍以上的灵敏度，能够检测到10 拷贝级别的DNA。An Bailin等^[45]针对沙门氏菌特异性*invA*基因开发了RPA-Cas13a方法，建立并验证了两步法和一步法检测体系。An Bailin等^[45]同时指出，RPA-Cas13a一步法在方便快捷的同时，检测限约为100 拷贝，和传统PCR一致；两步法流程较复杂，但检测限最低能够达到1 拷贝。Wang Yunqing等^[46]对大肠杆菌O157:H7和金黄色葡萄球菌建立了RPA-Cas12a一步法检测，同时将一种基于水浴的快速DNA提取方法应用到食品基质中，总检测时间能控制在50 min，检测限达到了1 CFU/mL。Liu Li等^[47]针对沙门氏菌*fimY*基因建立了RPA-Cas12a两步检测法，并成功应用于鸡蛋沙门氏菌检测中。Zhu Lishan等^[48]将和RPA相似的RAA技术和Cas12a进行结合，针对大肠杆菌O157:H7建立了荧光法和试纸条法，灵敏度高于传统qPCR和酶联免疫吸附法。Tian Yachen等^[49]建立了一种针对单增李斯特菌的超灵敏的RPA-Cas12a反应平台，通过开发一种固定式添加容器实现了与外界隔离，不仅极大地简化了操作流程，且该平台检测灵敏度超过了一管法。Xiao Yiran等^[50]通过在同一容器中将RPA和Cas12a

结合，以单增李斯特菌为目标进行检测，25 min内在加标猪肉中检测限为4.4 CFU/g。Zhou Baoqing等^[51]将RAA与Cas12a结合，针对金黄色葡萄球菌建立了试纸条检测法，检测限低至5.4×10² CFU/mL。Lv Xinrui等^[52]将RAA与Cas12a结合用于副溶血弧菌检测，并证明了添加牛血清白蛋白和脯氨酸可以增强反应。

2000年，Notomi等^[61]发明了LAMP技术，LAMP通过*Bst* DNA聚合酶的链置换效应以及识别延伸效应，能够在65℃恒温条件下大量快速扩增目的片段。传统的LAMP技术一般是通过荧光染料结合双链DNA，容易造成非特异性结合从而导致假阳性^[62]。将LAMP作为目的片段的扩增方法，不仅可以提高CRISPR技术检测的灵敏度，也可以有效缓解LAMP的假阳性问题。Lee等^[53]将LAMP和Cas12a结合，添加了两端修饰FAM和生物素的报告DNA，针对沙门氏菌进行了检测（图5）。在Lee等^[53]的检测体系中，如果未包含目的基因，则Cas12a非特异性切割特性将不会被激活，试纸中针对FAM生物素复合物检测T线和控制线C线均会显色；当目的基因片段存在时，报告分子受到切割，T线即无法显色，仅有C线能够显色。另外，Lee等^[54]还建立了针对大肠杆菌O157:H7的LAMP-Cas12a荧光检测方法，整个流程包括20 min的DNA释放、40 min的LAMP扩增和5 min的Cas12a荧光显色。Hu Antuo等^[25]将LAMP和Cas12a结合，使用自筛特异性基因靶点建立了针对副溶血弧菌的LAMP-Cas12a检测方法。通过在LAMP引物中添加TTTT序列，成功解决了自筛引物中没有PAM结合位点的问题。Shi Yaoqiang等^[55]将Cas12a与LAMP结合，建立了一种可以使用蓝色LED灯目测观察的快速荧光检测福氏志贺氏菌的两步法，具有较高的灵敏度和特异性。

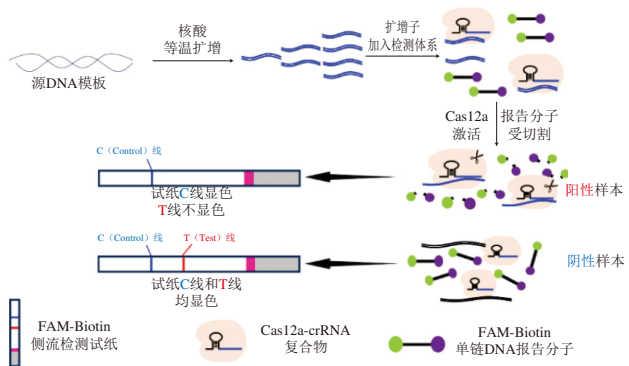


图 5 CRISPR-Cas12a结合侧流试纸^[53]
Fig. 5 Schematic diagram of CRISPR-Cas12a binding lateral flow test strips^[53]

除了RPA和LAMP，结合其他扩增手段的CRISPR/Cas检测技术在食源性致病菌方面也有不少研究。Bai Linlin等^[56]将NEAA与Cas12a进行结合，针对蛋液中的沙门氏菌进行检测，避免了传统NEAA会扩增大量非目的

基因的问题。Xue Ting等^[57]将NASBA和Cas13a结合,以沙门氏菌16S rRNA为靶标建立荧光检测方法,实现了对样品中活菌的定量检测。Li Fan等^[58]运用PCR和RAA扩增与Cas12a进行结合,针对草鱼中的单增李斯特菌检测,对活菌的检测限低至 3.37×10^1 CFU/mL。Zhou Jin等^[59]将PCR和Cas13a进行结合,针对金黄色葡萄球菌进行荧光检测,检测限低至1 CFU/mL。

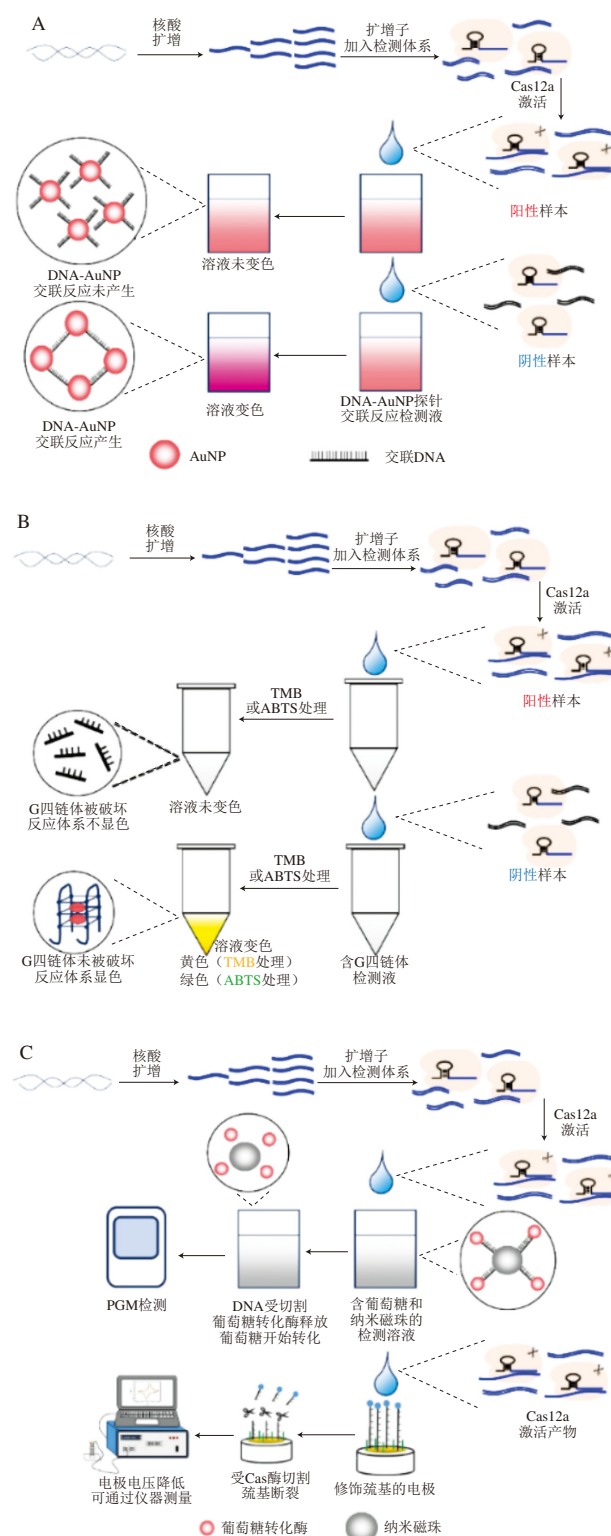
3.2 基于其他信号转导方法的检测应用

CRISPR-Cas荧光和试纸检测法中,两端修饰报告分子的单链DNA价格较为昂贵。因此研究者开发了多种信号转导方法,用于转导受激活的Cas蛋白核酸酶活性。金纳米粒子(Au nanoparticle, AuNP)具有特殊的光学属性和化学结合活性,其与单链DNA结合产生的聚集效应能够产生可目测的变色效应。当具有DNA反式切割活性的Cas蛋白被添加至AuNP交联体系中,聚集效应无法产生,体系中变色受到抑制(图6A)。Zhou Baoqing等^[63]针对AuNP交联单链DNA反应建立了金黄色葡萄球菌的PCR-Cas12a-AuNP探针检测体系,检测限最低可达 6.4×10^2 CFU/mL。Ma Long等^[64]建立了沙门氏菌的PCR-Cas12a-AuNP检测体系,使用红外相机记录交联反应中的热效应,检测限低至1 CFU/mL。

G四链体作为一种具有过氧化物酶活性的核酸序列分子,与氯化血红素结合时,可使3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)产生显色反应。当反式切割Cas蛋白识别靶标产生核酸酶活性时,G四链体被降解,TMB试剂即无法产生显色反应(图6B)。Yin Lijuan等^[65]将具有催化活性的单链G四链体与Cas12a结合,针对沙门氏菌*invA*基因建立了超灵敏RPA-Cas12a-G四链体显色检测方法。Chen Xueyun等^[66]基于G四链体单链DNA特性和过氧化物酶活性,建立了针对副溶血弧菌的LAMP-Cas12a-G四链体检测体系,检测限能达到 6.1×10^2 CFU/mL。

基于Cas酶特性构建不同纳米磁珠用于信号转导也是研究热点之一。2021年,Liu Ran等^[67]提出使用血糖转化酶修饰的纳米磁珠与Cas12a核酸酶活性相结合,将反应体系中核酸酶活性转导为血糖转化酶转化葡萄糖活性。葡萄糖转化酶活性可通过个人血糖仪(personal glucose meters, PGM)进行核酸信号转导,最终实现对COVID19的检测。Zhou Chi等^[68]将Cas12a-PGM应用在沙门氏菌*invA*基因检测上,实现了定量检测,牛奶样品中检测限可达1 CFU/reaction(图6C)。Huang Luqi等^[69]构建了以巯基-单链DNA-免疫磁珠为主要结构的报告分子电极,被激活的Cas12a加入电极时,巯基受切割导致电流信号降低,实现阳性信号转导。Huang Luqi等^[69]将沙门氏菌和金黄色葡萄球菌作为报告电极的检测靶

标,构建了包括跨越式滚环等温扩增-Cas12a-分子电极的级联检测方法,检测限可达到3 CFU/mL(图6C)。



A. 结合AuNP交联; B. 结合G四链体过氧化物酶活性; C. 结合纳米磁珠和电化学。

图6 CRISPR-Cas12a结合其他信号转导^[63,65,68-69]

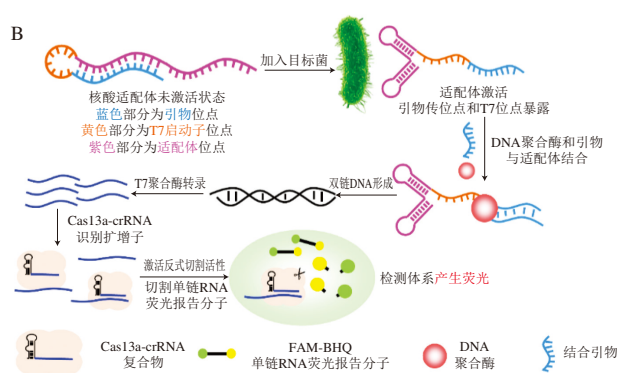
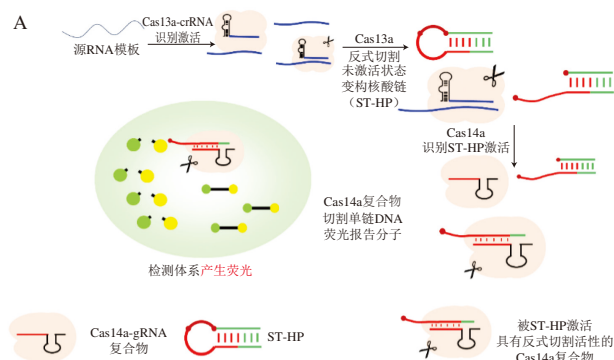
Fig. 6 CRISPR-Cas12a assay combined with other signaling methods^[63,65,68-69]

现有的CRISPR检测体系中,加样环节不仅操作复杂,且不同样本之间易产生核酸污染,将微流体方法与CRISPR整合,正逐渐成为快速核酸检测中的一个热点研究方向。Wu Hui等^[70]开发了一种旋转阀辅助的LAMP-Cas12a检测方法,针对副溶血弧菌*tlh*基因进行检测,全部检测流程可控制在80 min内,灵敏度达到 3.1×10^1 拷贝。随后, Wu Hui等^[71]又开发一种新微流体架构,通过将液滴数字LAMP与引入液滴注射器的CRISPR/Cas12a相结合,靶向沙门氏菌*invA*基因,在未经核酸提取的生乳样品中成功实现检测。

3.3 基于非核酸扩增的检测应用

Cas蛋白反式切割步骤前的核酸预扩增,能有效增加体系中目的基因在总反应体系中的比例,但也增加了检测的复杂性。基于免核酸扩增的Cas技术优化方向可分为3类,包括减少反应体积,通过电化学传感器提高检测灵敏度和通过级联放大反应输出信号^[72]。Yue Huahua等^[73]开发了一种微Cas12a反应方法,通过在微滴反应器中添加2条crRNA,实现单分子层面的定量检测,可直接检测原液中浓度仅为100 fmol/L的DNA。Sha Yong等^[38]设计了一种可以作为Cas14a检测靶标的变构DNA,并使用变构DNA将Cas13a反式切割与Cas14a识别相结合,建立了称为casCRISPR的极高精度检测方法(图7A)。casCRISPR对DNA的检测限最低能达到1.33 fmol/L,比传统Cas13a体系敏感1 000倍。

CRISPR-Cas系统也可针对非核酸靶标进行检测,通过功能性原件核酸适配体变构产生信号转导,非核酸信号即被转化为核酸信号,实现检测目的^[22]。Shen Jinjin等^[74]将变构核酸探针与Cas13a系统进行结合,对肠炎沙门氏菌进行检测,达到了与qPCR相同甚至更高的灵敏度(图7B)。Shen Jinjin等^[74]设计的探针分为3个部分,包括识别细菌抗原的适配体部分,引物结合位点和T7启动子结合位点。环境中不含目标菌时,变构探针保持发夹结构与非活性构型,无法结合引物启动转录;环境含目标菌时,变构探针结合目标菌导致发夹结构打开, DNA聚合酶与T7 RNA聚合酶结合相关位点启动转录, Cas13a酶识别RNA转录子并切割报告分子产生荧光效应。



A. Cas13a-Cas14a级联放大; B. Cas13a结合变构核酸适配体。

图7 基于非核酸扩增的CRISPR检测^[38,74]

Fig. 7 CRISPR assays based on non-nucleic acid amplification^[38,74]

4 结语

作为一种新兴的检测技术,反式切割CRISPR-Cas检测体系已被证实能够达到极高的特异性和灵敏度,在病毒检测方面获得了广泛的应用。2020年5月, SHERLOCK™ CRISPR SARS-CoV-2试剂盒获得了美国食品药品监督管理局的授权,用于检测COVID-19病毒。目前反式切割CRISPR检测和大部分基于核酸扩增的快速检测手段一样,存在不少亟待解决的问题,阻碍了其在食源性致病菌方面大规模广泛应用:1) 设备与原料成本昂贵;2) 酶易受到样本或外源污染;3) 检测体系复杂,对加样仪器与人员要求高;4) gRNA设计复杂,对序列有要求,可能产生脱靶效应;5) 多重检测实现较困难;6) 不能区分活细胞和死细胞的核酸;7) 核酸提取手段限制精度。

研究者们正通过一系列手段解决这一系列问题,包括优化扩增子提取方法、添加叠氮溴化丙啶进行前处理、筛选新的Cas效应子、引入外源PAM序列、引入新的信号转导分子或核酸适配体、建立多Cas酶检测体系、结合微滴PCR或微流控技术、结合电化学技术等。相比于传统生化培养和PCR扩增方法,反式切割CRISPR-Cas检测方法能够实现更短的总检测时间和更高的检测精度。同时基于该技术单碱基精度、高特异性鉴别的特性,在检测不同分型的细菌病毒方面反式切割CRISPR也将会实现更广的应用。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Food Safety[EB/OL]. (2022-5-19)[2023-10-15]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- [2] 费韵洁, 刘元建, 熊晓辉. 食源性致病菌检测技术的发展及研究现状[J]. 生物加工过程, 2023, 21(3): 308-325. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2023.03.010.
- [3] 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. DOI:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- [4] MOJICA F J M, DÍEZ-VILLASEÑOR C, SORIA E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria[J]. Molecular Microbiology, 2000, 36(1): 244-246. DOI:10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.
- [5] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712. DOI:10.1126/science.1138140.
- [6] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821. DOI:10.1126/science.1225829.
- [7] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823. DOI:10.1126/science.1231143.
- [8] BIKARD D, EULER C W, JIANG W Y, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(11): 1146-1150. DOI:10.1038/nbt.3043.
- [9] DICARLO J E, NORVILLE J E, MALI P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(7): 4336-4343. DOI:10.1093/nar/gkt135.
- [10] GRATZ S J, UKKEN F P, RUBINSTEIN C D, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*[J]. Genetics, 2014, 196(4): 961-971. DOI:10.1534/genetics.113.160713.
- [11] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 688-691. DOI:10.1038/nbt.2654.
- [12] ZHOU J K, SHEN B, ZHANG W S, et al. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014, 46: 49-55. DOI:10.1016/j.biocel.2013.10.010.
- [13] FENG Y, SASSI S, SHEN J K, et al. Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2015, 33(2): 199-207. DOI:10.1002/jor.22745.
- [14] 李君, 张毅, 陈坤玲, 等. CRISPR/Cas系统: RNA靶向的基因组定向编辑新技术[J]. 遗传, 2013, 35(11): 1265-1273. DOI:10.3724/SP.J.1005.2013.01265.
- [15] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477. DOI:10.1038/nrmicro2577.
- [16] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNBASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(11): 722-736. DOI:10.1038/nrmicro3569.
- [17] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(2): 67-83. DOI:10.1038/s41579-019-0299-x.
- [18] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. Science, 2016, 353(6299): aaf5573. DOI:10.1126/science.aaf5573.
- [19] 高维崧, 窦金萍, 韦双, 等. CRISPR/Cas系统的分类及研究现状[J]. 生物技术进展, 2022, 12(4): 532-538. DOI:10.19586/j.2095-2341.2021.0198.
- [20] NUÑEZ J K, KRANZUSCH P J, NOESKE J, et al. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2014, 21(6): 528-534. DOI:10.1038/nsmb.2820.
- [21] CATCHPOLE R J, TERNIS M P. New type III CRISPR variant and programmable RNA targeting tool: oh, thank heaven for Cas7-11[J]. Molecular Cell, 2021, 81(21): 4354-4356. DOI:10.1016/j.molcel.2021.10.014.
- [22] LI Y R, MAN S L, YE S Y, et al. CRISPR-Cas-based detection for food safety problems: current status, challenges, and opportunities[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(4): 3770-3798. DOI:10.1111/1541-4337.13000.
- [23] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771. DOI:10.1016/j.cell.2015.09.038.
- [24] 党生, 张帅, 翟景波. CRISPR/Cas12a系统: 核酸检测的多功能工具[J/OL]. 生物化学与生物物理进展: 1-13[2023-11-26]. <https://doi.org/10.16476/j.pibb.2023.0163>.
- [25] HU A T, KONG L Y, LU Z X, et al. Construction of a LAMP-CRISPR assay for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Control, 2023, 149: 109728. DOI:10.1016/j.foodcont.2023.109728.
- [26] STELLA S, ALCÓN P, MONTOYA G. Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage[J]. Nature, 2017, 546(7659): 559-563. DOI:10.1038/nature22398.
- [27] SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. Molecular Cell, 2015, 60(3): 385-397. DOI:10.1016/j.molcel.2015.10.008.
- [28] KNOTT G J, EAST-SELETSKY A, COFSKY J C, et al. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2017, 24(10): 825-833. DOI:10.1038/nsmb.3466.
- [29] LIU L, LI X Y, WANG J Y, et al. Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities[J]. Cell, 2017, 168(1/2): 121-134.e12. DOI:10.1016/j.cell.2016.12.031.
- [30] LIU L, LI X Y, MA J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a[J]. Cell, 2017, 170(4): 714-726.e10. DOI:10.1016/j.cell.2017.06.050.
- [31] 陈静, 赵燕波, 赵兰, 等. 靶向RNA的CRISPR-Cas13系统及其研究进展[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2021, 37(2): 10-17. DOI:10.12046/j.issn.1000-5277.2021.02.002.
- [32] O'CONNELL M R. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR-Cas systems[J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(1): 66-87. DOI:10.1016/j.jmb.2018.06.029.
- [33] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, ESSLETZBICHLER P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13[J]. Nature, 2017, 550(7675): 280-284. DOI:10.1038/nature24049.
- [34] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442. DOI:10.1126/science.aam9321.
- [35] CASATI B, VERDI J P, HEMPELMANN A, et al. Rapid, adaptable and sensitive Cas13-based COVID-19 diagnostics using ADESSO[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 3308. DOI:10.1038/s41467-022-30862-y.
- [36] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. Science, 2018, 362(6416): 839-842. DOI:10.1126/science.aav4294.
- [37] YANG H, CHEN J B, YANG S, et al. CRISPR/Cas14a-based isothermal amplification for profiling plant microRNAs[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(37): 12602-12608. DOI:10.1021/acs.analchem.1c02137.
- [38] SHA Y, HUANG R, HUANG M Q, et al. Cascade CRISPR/cas enables amplification-free microRNA sensing with fM-sensitivity and single-base-specificity[J]. Chemical Communications, 2021, 57(2): 247-250. DOI:10.1039/d0cc06412b.
- [39] CHEN J S, MA E B, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439. DOI:10.1126/science.aar6245.
- [40] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. Science, 2018, 360(6387): 444-448. DOI:10.1126/science.aas8836.
- [41] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with

- Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. Science, 2018, 360(6387): 439-444. DOI:10.1126/science.aag0179.
- [42] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. Cell Discovery, 2018, 4: 20. DOI:10.1038/s41421-018-0028-z.
- [43] LI L X, LI S Y, 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. DOI:10.1021/acssynbio.9b00209.
- [44] LIU H, WANG J B, ZENG H J, et al. RPA-Cas12a-FS: a frontline nucleic acid rapid detection system for food safety based on CRISPR-Cas12a combined with recombinase polymerase amplification[J]. Food Chemistry, 2021, 334: 127608. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127608.
- [45] AN B L, ZHANG H B, SU X, et al. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* spp. using CRISPR-Cas13a combined with recombinase polymerase amplification[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 732426. DOI:10.3389/fmicb.2021.732426.
- [46] WANG Y Q, KE Y Q, LIU W J, et al. A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level[J]. ACS Sensors, 2020, 5(5): 1427-1435. DOI:10.1021/acssensors.0c00320.
- [47] LIU L, ZHAO G, LI X M, et al. Development of rapid and easy detection of *Salmonella* in food matrices using RPA-CRISPR/Cas12a method[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 162: 113443. DOI:10.1016/j.lwt.2022.113443.
- [48] ZHU L S, LIANG Z D, XU Y T, et al. Ultrasensitive and rapid visual detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on RAA-CRISPR/Cas12a system[J]. Biosensors, 2023, 13(6): 659. DOI:10.3390/bios13060659.
- [49] TIAN Y C, LIU T, LIU C, et al. An ultrasensitive and contamination-free on-site nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR-Cas12a system combined with recombinase polymerase amplification[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 152: 112166. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112166.
- [50] XIAO Y R, REN H L, WANG H, et al. A rapid and inexpensive nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR/Cas12a system[J]. Talanta, 2023, 259: 124558. DOI:10.1016/j.talanta.2023.124558.
- [51] ZHOU B Q, YE Q H, LI F, et al. CRISPR/Cas12a based fluorescence-enhanced lateral flow biosensor for detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 351: 130906. DOI:10.1016/j.snb.2021.130906.
- [52] LV X R, CAO W W, ZHANG H, et al. CE-RAA-CRISPR assay: a rapid and sensitive method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in seafood[J]. Foods, 2022, 11(12): 1681. DOI:10.3390/foods11121681.
- [53] LEE S Y, OH S W. Lateral flow biosensor based on LAMP-CRISPR/Cas12a for sensitive and visualized detection of *Salmonella* spp.[J]. Food Control, 2023, 145: 109494. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.109494.
- [54] LEE S Y, OH S W. Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid, sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Talanta, 2022, 241: 123186. DOI:10.1016/j.talanta.2021.123186.
- [55] SHI Y Q, KANG L, MU R R, et al. CRISPR/Cas12a-enhanced loop-mediated isothermal amplification for the visual detection of *Shigella flexneri*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 845688. DOI:10.3389/fbioe.2022.845688.
- [56] BAI L L, WANG L, HUANG S Q, et al. Rapid, visual, and sequence-specific detection of *Salmonella* in egg liquid with vis-NEAA, a CRISPR/Cas12 empowered new strategy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(7): 2401-2409. DOI:10.1021/acs.jafc.1c06715.
- [57] XUE T, LU Y, YANG H, et al. Isothermal RNA amplification for the detection of viable pathogenic bacteria to estimate the *Salmonella* virulence for causing enteritis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(5): 1670-1678. DOI:10.1021/acs.jafc.1c07182.
- [58] LI F, YE Q H, CHEN M T, et al. Cas12aFDet: a CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1151: 338248. DOI:10.1016/j.aca.2021.338248.
- [59] ZHOU J, YIN L J, DONG Y N, et al. CRISPR-Cas13a based bacterial detection platform: Sensing pathogen *Staphylococcus aureus* in food samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1127: 225-233. DOI:10.1016/j.aca.2020.06.041.
- [60] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204. DOI:10.1371/journal.pbio.0040204.
- [61] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63. DOI:10.1093/nar/28.12.e63.
- [62] 石磊, 王曼, 时国强, 等. 环介导等温扩增技术研究进展[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2021, 41(5): 565-571. DOI:10.3969/j.issn.1000-1565.2021.05.013.
- [63] ZHOU B Q, YE Q H, CHEN M T, et al. A label-free AuNP bioprobe-assisted CRISPR/Cas12a colorimetric platform for high-throughput detection of *Staphylococcus aureus* ST398[J]. Food Control, 2023, 145: 109451. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.109451.
- [64] MA L, PENG L, YIN L J, et al. CRISPR-Cas12a-powered dual-mode biosensor for ultrasensitive and cross-validating detection of pathogenic bacteria[J]. ACS Sensors, 2021, 6(8): 2920-2927. DOI:10.1021/acssensors.1c00686.
- [65] YIN L J, DUAN N H, CHEN S, et al. Ultrasensitive pathogenic bacteria detection by a smartphone-read G-quadruplex-based CRISPR-Cas12a bioassay[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 347: 130586. DOI:10.1016/j.snb.2021.130586.
- [66] CHEN X Y, WANG L, HE F, et al. Label-free colorimetric method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* by trimming the G-quadruplex DNAzyme with CRISPR/Cas12a[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(42): 14300-14306. DOI:10.1021/acs.analchem.1c03468.
- [67] LIU R, HU Y S, HE Y, et al. Translating daily COVID-19 screening into a simple glucose test: a proof of concept study[J]. Chemical Science, 2021, 12(26): 9022-9030. DOI:10.1039/d1sc00512j.
- [68] ZHOU C, HUANG D, WANG Z Y, et al. CRISPR Cas12a-based "sweet" biosensor coupled with personal glucose meter readout for the point-of-care testing of *Salmonella*[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(9): 4137-4147. DOI:10.1111/1750-3841.16287.
- [69] HUANG L Q, YUAN N, GUO W, et al. An electrochemical biosensor for the highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus* based on SRCA-CRISPR/Cas12a[J]. Talanta, 2023, 252: 123821. DOI:10.1016/j.talanta.2022.123821.
- [70] WU H, QIAN S, PENG C, et al. Rotary valve-assisted fluidic system coupling with CRISPR/Cas12a for fully integrated nucleic acid detection[J]. ACS Sensors, 2021, 6(11): 4048-4056. DOI:10.1021/acssensors.1c01468.
- [71] WU H, CAO X B, MENG Y C, et al. DropCRISPR: a LAMP-Cas12a based digital method for ultrasensitive detection of nucleic acid[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 211: 114377. DOI:10.1016/j.bios.2022.114377.
- [72] ZHANG J, LV H L, LI L X, et al. Recent improvements in CRISPR-based amplification-free pathogen detection[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 751408. DOI:10.3389/fmicb.2021.751408.
- [73] YUE H H, SHU B W, TIAN T, et al. Droplet Cas12a assay enables DNA quantification from unamplified samples at the single-molecule level[J]. Nano Letters, 2021, 21(11): 4643-4653. DOI:10.1021/acs.nanolett.1c00715.
- [74] SHEN J J, ZHOU X M, SHAN Y Y, et al. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 267. DOI:10.1038/s41467-019-14135-9.