

CRISPR/Cas 系统的核酸检测及其在食品安全快速检测中的应用

翟百强², 程楠³, 王洪涛², 徐媛聪^{1*}

(¹北京工业大学环境与生命学部 北京 100024

²河南省铁路食品安全管理工程技术研究中心 郑州 450052

³中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要 近年来,快速检测技术成为食品安全领域的一个重要研究方向。成簇规律间隔短回文序列(CRISPR)及 CRISPR 相关蛋白(Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统因优越的靶向性而被广泛应用于核酸检测中。基于 CRISPR/Cas 系统的核酸传感器具有灵敏度高、特异性强、时效性快等优势,成为快检领域的研究热点,也推动了食品安全快速检测技术的发展。本文基于 CRISPR/Cas 系统进行综述,分析不同的 CRISPR/Cas 系统结合核酸技术在靶标检测中的应用情况,展望 CRISPR/Cas 核酸传感器在食品安全快速检测领域的未来研究方向,为研发基于此核酸传感器的新型检测方法提供参考。

关键词 成簇规律间隔短回文序列(CRISPR);核酸传感器;食品安全;快速检测

文章编号 1009-7848(2023)02-0383-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.037

食品安全关乎民生,快速、精准的检测能够为食品安全事件提供有效的科学预警。生物传感器检测技术能够将未知靶标有效转化成可测量的信号,成为食品安全快速检测领域的佼佼者。核酸传感器依托核酸中间体承载信号的识别、放大和转导的作用,在食源性致病菌、农药残留、重金属检测、生物掺伪等^[1-3]检测中表现优异,有效缩短了检测时间,提高了检测特异性及灵敏度。2020 年诺贝尔化学奖揭晓后,CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR; CRISPR-associated protein, Cas)系统因优异的基因编辑能力、独特的靶点识别方式、极高的酶活力等特性广为人知,在核酸检测领域表现出巨大的应用价值^[4-6]。由其构建的核酸传感器也成为食品安全快速检测平台的研究热点。本文就基于 CRISPR/Cas 系统的研究进行综述,分析不同 CRISPR/Cas 系统结合核酸技术在不同靶标检测中的应用情况,展望 CRISPR/Cas 核酸传感器在食品安全快速检测领域的未来研究方向,以促进其在食品安全检测中的进一步应用。

1 CRISPR/Cas 系统概述

CRISPR-Cas 系统即成簇规律间隔的短回文重复序列以及 CRISPR 相关蛋白系统,是一种获得性免疫系统,存在于众多古细菌和细菌中^[7]。根据系统依赖的 Cas 蛋白的不同可以分成 2 大类^[8]:第 1 类 Cas 蛋白是多亚基蛋白复合物,发挥活性需要依靠多个效应蛋白协同作用,第 2 类 Cas 蛋白是独立蛋白,发挥活性仅依靠单一效应蛋白。根据 Cas 蛋白的基因结构及重复间隔序列结构不同可以分为 6 类(I~VI 型),其中 I 型、III 型和 IV 型属于第 1 类系统,II 型、V 型和 VI 型属于第 2 类系统^[8-9]。CRISPR/Cas 系统的作用机制包括 3 个阶段:获取、表达和干扰。首先将外源基因整合到 CRISPR 基因座 2 个重复序列中间,获得间隔序列;其次基因座转录成前体 crRNA,随后加工为成熟 crRNA (CRISPR RNA);最后 crRNA 与 Cas 蛋白复合,发挥核酸酶活性对外源基因进行切割^[9]。基于 CRISPR/Cas 系统的检测技术则是依据作用机制,根据检测靶标序列设计向导 RNA (Single-guide RNA, sgRNA),当其与特异性靶标识别配对后,激活 Cas 蛋白的切割活性,通过切割产物的分析实现靶标的检测。目前的研究主要集中在 Cas9、Cas12、Cas13 以及 Cas14 这 4 种蛋白(图 1),其中基于 Cas9 的检测侧重于 sgRNA 的设计,通过特异性识别靶序列实现多重检测;基于 Cas12、Cas13 及 Cas14 的检测则重点依赖 Cas 蛋

收稿日期: 2022-02-17

基金项目: 中国博士后面资助项目(2021M690277)

第一作者: 翟百强,男,博士,教授

通信作者: 徐媛聪 E-mail: xuyuancong@bjut.edu.cn

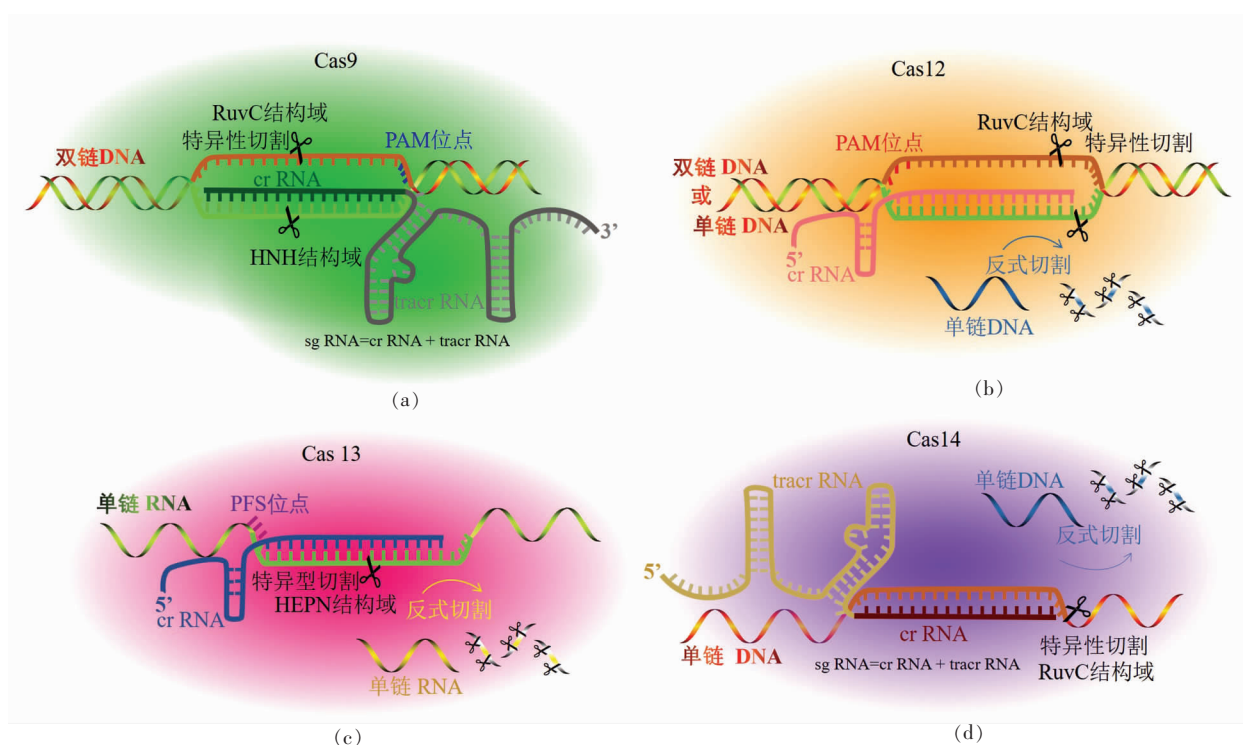


图1 CRISPR/Cas9(a)、Cas12(b)、Cas13(c)及 Cas14(d)基本组成及作用原理图

Fig.1 Fundamental components and mechanism of CRISPR/Cas9(a), Cas12(b), Cas13(c), and Cas14(d) systems

白激活后的切割活性。

1.1 CRISPR-Cas9

Cas9 蛋白是最为典型的 2 类 II 型 CRISPR 系统效应蛋白,是 RNA 引导和 dsDNA (Double-strand DNA) 靶向的核酸内切酶,含有 HNH 和 RuvC 2 个核酸酶结构域,其中 HNH 只有 1 个核酸酶区域,RuvC 含有 3 段核酸酶区域^[10]。CRISPR-Cas9 系统需要 Cas9、crRNA 和 tracrRNA (Trans-activating RNA) 协同发挥作用,其中 crRNA 与 tracrRNA 合并设计形成一条 sgRNA,当 Cas9 与 crRNA 部分结合后,能够识别含有 PAM (Protospacer adjacent motif) 位点 (5'-NGG) 的靶标 dsDNA,crRNA 与靶标 dsDNA 中的互补链形成 RNA-DNA 异源双链结构,随后 Cas9 的两个核酸酶结构域活性被激活,进而切断靶标 dsDNA^[11]。后有研究发现单独添加小段 PAMmer 序列,与 ssDNA 靶标形成含有 PAM 序列的部分 dsDNA 后,Cas9 依然能够发挥切割活性对 ssDNA 靶标进行切割^[12]。此外研究通过对 Cas9 的 HNH 和 RuvC 结构域进行突变,得到没有活性的 dCas9 (Nuclease-deactivat-

ed Cas9) 蛋白,虽能够识别靶标 dsDNA,但是没有核酸酶切割活性^[13]。

1.2 CRISPR-Cas12

Cas12 蛋白属于 2 类 V 型 CRISPR 系统效应蛋白,也是 RNA 引导和 DNA 靶向的核酸内切酶,只含有 RuvC 核酸酶结构域^[8]。CRISPR-Cas12 系统中,Cas12 蛋白能够在 crRNA 的引导下识别含有 PAM 位点 (5'-TTTN) 的靶标 dsDNA,或者识别不需要 PAM 位点的 ssDNA (Single-strand DNA) 靶标序列,形成三链或者双链复合体,随后激活 RuvC 的核酸内切酶活性,切割特异性靶标 dsDNA 或者靶标 ssDNA (也称作 cis 切割),同时还激活了反式切割活性,能够切割其它非特异性 ssDNA (也称作 trans 切割)。其中反式切割活性的激活需要一个必备条件,就是要求靶标模板序列中至少有 15 个碱基与 crRNA 互补。由于 dsDNA 靶标中非互补链有助于提升“互补链/crRNA/Cas12 蛋白”的稳定性,因此 dsDNA 靶标激活的反式切割能力要远远高于 ssDNA 靶标。Cas12 蛋白的家族成员包括 Cas12a~Cas12f,但研究多集中在 Cas12a 和

Cas12b。Cas12a 又称为 Cpf1 蛋白, Cas12b 又称为 C2c1 蛋白, 两者的区别在于前者的 crRNA 成熟不需要 tracrRNA 参与, 而后者需要, 但是两者都同时具备核酸内切酶活性和反式切割活性^[14-16]。

1.3 CRISPR-Cas13

Cas13 蛋白属于 2 类 VI 型 CRISPR 系统效应蛋白, 是 RNA 引导和 RNA 靶向的核酸内切酶, 含有两个 HEPN 核酸酶结构域^[8]。CRISPR-Cas13 系统中, Cas13 蛋白本身能够对 crRNA 的成熟进行加工处理, 不需要 tracrRNA 参与, 随后在 crRNA 的引导下识别含有 PFS (protospacer-flanking sequence) 位点的 (3'-A 或 U 或 C) 的 RNA, 形成双链 RNA 复合物促使 HEPN1 和 HEPN2 两个结构域相互靠近, 从而激活 HEPN 核酸酶的核酸内切酶活性, 切割特异性靶标 RNA, 同时还激活了反式切割活性, 能够非特异性切割其它非靶标 RNA^[17-18]。Cas13 蛋白的家族成员包括 Cas13a~Cas13d, 其中关于 Cas13a 的研究较多, 不同的 Cas13 对切割探针具有不同的偏好性。Cas13a 又称为 C2c2 蛋白, 通过对核酸酶区域的残基突变可得到没有核酸酶活性 dCas13a, 能够结合靶标 RNA 却没有切割性能^[19]。

1.4 CRISPR-Cas14

Cas14 蛋白属于 2 类 V 型 CRISPR 系统效应蛋白, 是 RNA 引导和 ssDNA 靶向的核酸内切酶, 含有 RuvC 核酸酶结构域。CRISPR-Cas14 系统与 Cas9 系统相似, 需要 Cas 蛋白、crRNA 和 tracrRNA 协同发挥作用, 不同的是 Cas14 的识别不需要 PAM 位点。其切割特性与 Cas12 相似, 与 Cas13 的区别在于识别的靶标不同, Cas14 专一识别靶标 ssDNA 后激活 RuvC 核酸酶的核酸内切酶活性, 切割特异性靶标 ssDNA, 同时还激活了反式切割活性, 能够非特异性切割其它非靶标 ssDNA^[20]。由于 CRISPR/Cas14 系统对 crRNA 和 ssDNA 靶标的错配容忍度很低, 成功突破了 ssDNA 靶标精准识别的短板, 成为了 CRISPR 系统巨大的进步。其家族成员包括 Cas14a~Cas14c, 是目前最小的第 2 类 CRISPR 效应蛋白^[21]。后有研究报道, Cas14 是属于 Cas12f 的亚类, 其中 Cas14a 属于 Cas12f1, Cas14b 属于 Cas12f2, 而 Cas14c 属于 Cas12f3^[22]。

2 CRISPR/Cas 系统与核酸扩增技术的结合应用

不同的 CRISPR/Cas 系统识别不同类型的靶标, 在检测过程中直接识别则存在靶标浓度低, 基质干扰等问题, 一般需要通过核酸扩增技术对靶标进行放大, 再利用产物作为新的靶标与 CRISPR/Cas 系统结合建立相应的核酸传感器检测平台。不同的核酸扩增技术能够生产不同类型的靶标产物, 两者之间的组合能够充分发挥 CRISPR/Cas 系统的检测功能, 目前已组装成多种类型的 CRISPR/Cas 核酸检测平台并广泛应用于各大检测领域。各平台之间的差异和改进多集中在 5 个方面: 操作步骤(扩增和检测两步反应的合并)、特异性(碱基突变的识别)、过程污染(闭管反应避免交叉污染)、检测通量(单重升级到多重检测)以及结果输出(实现肉眼可视化)。核酸扩增技术根据温度依赖程度可以分为恒温扩增和变温扩增, 根据产物类型可以分为双链产物扩增和单链产物扩增, 其中能够生成双链产物的恒温扩增技术应用较多, 典型代表是重组聚合酶扩增技术 (Recombinase polymerase amplification, RPA), 有经典的 SHERLOCK、DETECTR 等检测平台。

2.1 CRISPR/Cas 系统结合 NASBA

NASBACC (NASBA/CRISPR cleavage) 检测平台是 CRISPR/Cas 系统与核酸扩增技术的首次结合应用。核酸序列依赖扩增 (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) 是以 RNA 为模板, 依赖 AMV 反转录酶、Rnase H 酶和 T7RNA 聚合酶的等温扩增技术, 其中间产物为 DNA 双链。NASBACC 方法中, 以寨卡病毒的 RNA 为靶标进行 NASBA 扩增, 中间产物 DNA 转录得到 RNA, 然后通过小立足点置换激活传感器上的颜色反应, 通过黄色和紫色的区分实现基因分型。方法的巧妙之处在于, CRISPR/Cas9 系统中 crRNA 选取的 PAM 序列恰好是两种寨卡病毒的基因差异片段。美国寨卡病毒通过 NASBA 扩增后能够得到含有“CGG”的 dsDNA 产物, 与 crRNA 进行和互补配对, 并激活 Cas9 蛋白的切割活性, 将 dsDNA 切断, 随后转录只能得到小段 RNA, 无法激发后续反应而呈现出黄色结果。非洲寨卡病毒存在碱基突变, 扩增后得到的是含有“CAG”的 dsD-

NA产物,由于PAM序列的突变,无法激活Cas9的切割活性,此时dsDNA能够转录得到完整的RNA,通过小立足点置换反应激活后续的生化反应呈现紫色结果,从而实现寨卡病毒的精准分型鉴定^[23]。

2.2 CRISPR/Cas系统结合RPA

SHERLOCK (Specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking)^[24]和DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)^[14]是CRISPR/Cas系统结合RPA扩增技术的2个经典平台。RPA是以DNA为模板,依赖重组聚合酶、单链结合蛋白和链置换DNA聚合酶的等温扩增技术,其扩增产物是DNA双链。

张锋团队建立的SHERLOCK平台,是基于CRISPR/Cas13a与RPA进行结合,整体包括2个步骤。先由RPA扩增生成dsDNA产物,由于Cas13a识别的是RNA靶标,因此需要对dsDNA产物进行转录得到RNA产物,随后与crRNA结合并激活Cas13a的反式切割活性,切割荧光淬灭的RNA探针,通过荧光的变化实现了寨卡病毒和登革病毒的区别检测、致病菌的检测、人类基因组分型以及单碱基突变检测等。如果靶标是RNA,则需要先进行反转录再完成RPA扩增^[24]。不同的Cas13蛋白对切割探针具有不同的偏好性,该团队基于该特性进一步建立了SHERLOCKv2平台,通过PsmCas13b、LwaCas13a、CcaCas13b和Cas12a对不同荧光探针的切割,实现了四重检测,后续通过结合CRISPR相关酶Csm6进一步提升灵敏度,并应用于侧流层析试纸条实现可视化检测^[25]。SHERLOCK中RPA扩增需要对靶标进行基因组提取,为了简化核酸的提取步骤,该团队再次建立HUDSON (Heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases)平台。通过加热和化学处理释放核酸,并使核糖核酸酶失活,从而实现寨卡病毒和登革热病毒的SHERLOCK快速检测^[26]。Arizti-Sanz等^[27]基于上述研究,组合SHERLOCK和HUDSON建立了SHINE (SHERLOCK and HUDSON integration to navigate epidemics)平台,通过体系优化实现了两步法检测的一体化,成功用于SARS-CoV-2的免提取快速精准检测。这一系列检测平台虽然具有良好的特异性和灵敏度,

但是由于依赖的是Cas13蛋白,因此需要增加反转录过程,一定程度上增加了操作的繁琐性。

DETECTR平台^[14]是基于CRISPR/Cas12a与RPA结合的原理建立,含有PAM序列的dsDNA产物与crRNA结合并激活Cas12a的反式切割活性,切割荧光淬灭的ssDNA探针,通过荧光的变化进行结果判定。利用“TTTC”PAM序列后的6个碱基差异,成功实现人乳头瘤病毒HPV16和HPV18的精准快速检测。随后又基于Cas14a建立了Cas14-DETECTR平台,用于人类眼球颜色基因HERC2中单核苷酸多态性 (Single nucleotide Polymorphism, SNP)的分型鉴定。由于Cas14a识别的是ssDNA靶标,反应中先由硫代磷酸化引物(只有一条引物进行标记)进行RPA扩增生成单标记dsDNA产物,随后利用T7核酸外切酶对没有标记的链进行水解得到ssDNA产物,随后与crRNA结合并激活Cas14a的反式切割活性,对荧光淬灭的ssDNA探针进行切割。鉴于CRISPR/Cas14系统对crRNA和ssDNA靶标的错配容忍度很低,能够在没有PAM序列的条件下有效区分单碱基突变,该方法成功实现蓝眼球和棕眼球的SNP检测,相比之下Cas12a无法区分^[20]。为了简化反应流程,实现扩增和检测一体化,Wang等^[28]合并DETECTR建立了Cas12aVDet (Cas12a-based visual detection)平台,将所有试剂整合在一个管中,Cas12a附着在管壁上,RPA扩增后通过离心将Cas12a与之混合进而完成切割,最后通过蓝光激发实现裸眼判定。该方法能够在与DETECTR保持相同灵敏度的条件下,成功将检测时间从2h缩短至0.5h,并且全程闭管反应有效避免了交叉污染。

除了以上经典检测平台之外,还有许多关于CRISPR/Cas系统和RPA的联合应用,大部分致力于特异性、灵敏度及便携性上的升级。例如基于Cas12b的CDetection (Cas12b-based DNA detection)用于HPV检测,灵敏度优于DETECTR。同时利用单碱基错配的tgRNA (Tuned guide RNA)提高检测特异性,实现血型SNP分型检测^[29]。例如基于Cas12a的AIOD-CRISPR (All-In-One Dual CRISPR-Cas12a)用于SARS-CoV-2检测,利用产物在上下游设计两条crRNA,通过提升Cas12a的

利用率来提升检测灵敏度^[30]。例如基于 Cas13a 的 DESCS (Dual methylation sensitive restriction endonucleases coupling with an RPA-assisted CRISPR/Cas13a System) 用于 SEPT9 基因的甲基化检测, 利用限制性内切酶对甲基化位点的敏感性来调控后续 RPA 反应, 存在甲基化位点则限制性内切酶不产生切割, 此时靶基因连续就能继续发生 RPA 扩增, 进而完成 Cas13a 的有效切割, 结合侧流层析试纸条实现可视化检测^[31]。

2.3 CRISPR/Cas 系统结合 PCR

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 是最为传统的核酸扩增技术, 属于变温扩增, 产物为 dsDNA。HOLMES (one-hour low-cost multipurpose highly efficient system) 是基于 CRISPR/Cas12a 与 PCR 结合的经典平台, 较 SHERLOCK 而言更适合 DNA 靶标检测。通过含有 PAM 序列的 dsDNA 产物与 crRNA 结合并激活 Cas12a 的反式切割活性, 通过探针切割反应中荧光的变化完成。对于 24nt crRNA 而言, HOLMES 能够识别 PAM 序列以及 PAM 后 1~7 位碱基中单碱基突变, 但是无法区分 8~18 位碱基中的突变; 对于 16nt 和 17nt crRNA 而言, HOLMES 能够识别 PAM 后 1~16 位碱基中的突变。根据这一特性, 在 SNP 位点附近设计插入 PAM 序列的 PCR 引物, 提升对 SNP 检测的特异性和灵敏度。HOLMES 检测平台中, 核酸扩增技术并不局限于 PCR, 还可以采用其它等温扩增技术^[32]。多重 PCR 实现了单一检测向高通量检测的进阶, Wang 等^[33]将多重 PCR 与 CRISPR/Cas12a 结合建立了多重检测平台, 针对不同的靶标设计不同的 crRNA 序列, 并将 crRNA 分别装载入不同的反应孔中, 最后通过荧光的变化实现五重检测。普通 PCR 扩增耗时长达 2 h 左右, 快速 PCR 能够显著缩短反应时间至 5 min 内, Wang 等^[34]将快速 PCR 与 CRISPR/Cas12a 结合建立了 CRISPCR (CRISPR & rapid PCR in single capillary), 将快速 PCR 反应试剂与 Cas12a 切割反应试剂分别置于反应管的上下两部分, 扩增后再混匀试剂进行切割, 紫外照射后实现裸眼判定。该方法与 Cas12aVDeT 有异曲同工之妙, 但能够在 10 min 内完成整体检测, 效率上更胜一筹。

2.4 CRISPR/Cas 系统结合 LAMP

环介导等温扩增技术 (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) 是经典的恒温扩增技术, 能在短时间内生成大量的 dsDNA 产物, 并且不依赖于热循环仪器。为了简化操作和避免反应交叉污染, 同一团队在 HOLMES 的基础上, 将 CRISPR/Cas12b 和 LAMP 结合建立了 HOLMESv2 平台, 用于 DNA 和 RNA 靶标的检测, 并有效区分 SNP。在 LAMP 产物中选取含有 PAM 位点的片段作为检测靶标, 与 crRNA 互补配对后激活 Cas12a 的反式切割活性, 根据荧光的变化进行结果分析。该检测平台中的核酸扩增技术并不局限于 LAMP, 也可以是 PCR, 或者是能够生成单链产物的非对称 PCR。该方法还可以用于检测基因甲基化, 利用酸性亚硫酸盐处理靶基因, 甲基化的胞嘧啶保持不变, 未甲基化的胞嘧啶变成尿嘧啶, 经过 PCR 扩增后, 只有甲基化的产物与 crRNA 配对结合, 产生荧光的变化^[35]。结合 LAMP 的其它应用也比较多, 例如 TB-QUICK 技术中, 利用 LAMP 进行核酸扩增, 基于 CRISPR/Cas12b 的 cis 切割活性实现结核杆菌的检测^[36]; CAL-LAMP (CRISPR/Cas12a assisted ligation-initiated LAMP) 技术中, 利用靶标连接发夹引物进而触发 LAMP 反应, 基于 CRISPR/Cas12a 的 trans 切割活性实现 microRNA let-7a 的检测^[37]。虽然 LAMP 应用十分广泛, 但是污染问题一直是限制该技术的最大弊端, 为了避免交叉污染引起的假阳性, Qian 等^[38]建立了尿嘧啶-LAMP, 采用 dUTP 代替 dTTP, 因此得到的是带有 dUTP 的扩增产物。同时发现 Cas12bde PAM 序列可以由“TTTN”更改为“UU-UN”, 且不影响各种切割活性。因此结合尿嘧啶糖基化酶 (UDG)、尿嘧啶-LAMP 和 CRISPR/Cas12a 建立了 ULC (UDG-LAMP-CRISPR) 检测平台。先用 UDG 进行酶解消化, 去除体系中残存的 dUTP 扩增产物, 再进行扩增和后续的切割反应, 有效避免了反应污染问题。ULC 方法虽然有效, 但是一定程度上增加了操作的复杂性, 同样是为了解决污染问题, Bao 等^[39]基于 CRISPR/Cas9 建立了 CUT-LAMP (Contamination-free loop-mediated isothermal amplification), 通过在 LAMP 内引物中添加 PAM 序列, 使得扩增产物中含有重复的 PAM 序

列,在Cas9/crRNA的识别下能够将产物进行切割降解,从而避免污染问题,有效杜绝假阳性反应。LAMP技术是基于DNA扩增的检测方法,针对RNA靶标,则需要通过反转录建立RT-LAMP,随后将其与CRISPR/Cas12a系统进行结合,建立了iSCAN (*in vitro* specific CRISPR-based assay for nucleic acids detection)检测平台,搭载侧流层析试纸条实现SARS-CoV-2的可视化检测^[40];建立了opvCRISPR (a one-pot visual reverse transcription (RT)-LAMP-CRISPR)检测平台,通过蓝光激发实现SARS-CoV-2的目视分析,具有良好的特异性灵敏度以及准确性^[41]。

2.5 CRISPR/Cas系统结合单链扩增技术

对于原始靶标信号来说,核酸扩增能够有效放大靶标浓度,进而激活Cas蛋白的活性。像RPA、LAMP等这些扩增方法产物都是dsDNA,能够直接与CRISPR系统进行结合,但是还有许多核酸扩增技术的产物是ssDNA,与CRISPR系统结合时具有一定的选择性,例如CRISPR/Cas12和CRISPR/Cas14能够识别单链靶标,则能直接结合应用,而CRISPR/Cas9与之结合则需要添加互补链组装成双链靶标。

滚环扩增技术(Rolling circle amplification, RCA)是单链扩增中研究较多的一种方法,能够在短时间内生产大量连续重复的ssDNA产物。RACE(RCA-assisted CRISPR/Cas9 cleavage)检测平台是基于RCA扩增和CRISPR/Cas9系统联合建立的,整体包括扩增和检测两个步骤。以靶标为引物,对含有PAM序列的环模板进行RCA扩增,产生含有大量重复靶标序列的单链产物;添加荧光淬灭的互补探针组装成双链产物,与crRNA识别配对后激活Cas9蛋白的切割活性,对双链产物进行切割,导致探针断裂而释放荧光,通过荧光的变化实现对miR-21的检测^[42]。Xu等^[43]利用适配体进行靶标转导,基于RCA和CRISPR/Cas12a建立了针对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的快速检测方法。选择菌体表面的A蛋白和PBP2蛋白的适配体A和B,其中适配体A与磁珠偶连,适配体B用互补链进行封闭,当靶标菌体与两条适配体混合时,通过磁分离能够将“适配体A-菌体-适配体B”进行分离,剩下封闭链用于RCA扩增,随后与

crRNA互补后激活Cas12a蛋白的反式切割活性,利用荧光变化完成检测。Qing等^[44]利用RCA作为一种转导扩增,结合CRISPR/Cas12a实现不同类型靶标的通用检测。扩增部分,在环模板中设计特定的一段通用序列,根据靶标改变引物结合区序列,RCA扩增后都能够得到含有重复通用互补序列的产物,而通用互补序列能够与crRNA互补后激活Cas12a蛋白的反式切割活性。检测部分,连接氧化石墨烯电极,切割探针断裂后,无法与亚甲基蓝标记的报告探针互补配对,此时的报告探针被氧化石墨烯吸附,引起电信号升高,反之切割探针与报告探针形成双链,无法被氧化石墨烯吸附,则电信号降低。通过RCA的扩增转导、Cas12a的反式切割以及电化学传感器的分析,实现了疾病相关核酸以及小分子的通用检测。

除RCA应用较多之外,还有一类依赖酶切反应的单链扩增技术,其中链置换扩增技术(Strand displacement amplification, SDA)是典型代表。Wang等^[45]利用SDA结合CRISPR/Cas12a实现了PNKP的超灵敏检测。发夹底物末端的磷酸基团在T4 PNKP的作用下转化成羟基,随后发生SDA反应,在链置换酶的作用下生成dsDNA,进而在切克内切酶的作用下生成ssDNA,两者都是Cas12a/crRNA的靶标,进而实现对荧光淬灭探针的切割。TITAC-Cas (Target-induced transcription amplification to trigger the trans-cleavage activity of Cas13a)检测平台是基于RNA聚合酶介导的SDA和CRISPR/Cas13a的联合,用于碱性磷酸酶ALP的检测。磷酸基团修饰的T7启动子序列与转录模板形成双链底物,此时T7启动子序列能够被外切酶水解。当存在ALP时,磷酸基团被转化成羟基从而使得T7启动子序列得到保护,进而在T7 RAN聚合酶的作用下生成RNA,与crRNA结合后激活Cas13a的反式切割活性,通过切割探针荧光的变化完成检测^[46]。指数扩增技术(Exponential amplification reaction, EXPAR)是以单链靶标为引物进行扩增的SDA反应。CAS-EXPAR (CRISPR/Cas9 triggered exponential amplification method)检测平台是基于EXPAR和CRISPR/Cas9的联合,与以往的不同是,该平台是由CRISPR激发EXPAR扩增。ssDNA靶标与PAMmer小片段以

及 Cas9/sgRNA 混合后,形成含有 PAM 序列的 ss-DNA-dsDNA-Cas9/sgRNA 复合物,激活 Cas9 蛋白活性对 ssDNA 靶标进行切割,形成的产物能够作为 EXPAR 的引物触发后续的扩增反应,对单核增生李斯特菌检测具有良好的特异性和灵敏度^[47]。Cas-G4EX(a CRISPR/Cas9 system mediated G4-EXPAR) 检测平台是基于 EXPAR、G4 核酸酶和 CRISPR/Cas9 的联合,用于 ssRNA 和 ssDNA 的方法学检测。与 CAS-EXPAR 前半部分原理相似,单链靶标与 PAMmer 小片段和 Cas9/sgRNA 形成复合物,切断单链靶标为 EXPAR 提供引物。EXPAR 扩增模板中设计有两个切割位点,因此一级产物能够再次触发二次扩增,终产物是富含鸟嘌呤的单链核酸,能够在氯高铁血红素的作用下折叠成 G 四面体,并呈现出类过氧化物酶活性,催化底物 ABTS 发生颜色变化^[48]。

2.6 CRISPR/Cas 系统结合核酸免扩增技术

对于低浓度靶标而言,核酸扩增虽能够显著放大原始信号,促进 Cas 蛋白活性最大化,但也存在一些弊端,例如需要引物设计、需要扩增仪器、可能造成污染等等,因此许多免核酸扩增的技术与 CRISPR/Cas 系统也开始进行结合应用。Choi 等^[49]利用双纳米金传感器,结合 CRISPR/Cas12a 实现了癌症核酸标志物的免扩增直接检测。20 nm 金颗粒上连接有 7 nm 长的 ssDNA 荧光探针,60 nm 金颗粒上连接有 9 nm 长的 ssDNA 探针,两条探针通过碱基配对组装后,探针的荧光被 60 nm 金颗粒淬灭。根据核酸靶标设计 crRNA,不存在靶标则无法激活 Cas12a 的活性。当单链核酸靶标存在时,能够与 crRNA/Cas12a 结合并激活切割活性,将探针的单链部分切断,致使荧光恢复,20 nm 金颗粒则能进一步增强荧光,通过荧光的变化能实现对癌症核酸标志物靶标的有效灵敏检测。Li 等^[50]利用金属核酸酶的切割特性,结合 CRISPR/Cas12a 实现重金属的超灵敏检测。根据铅离子的金属核酸酶的底物链设计 crRNA,由于序列封闭使其无法与 crRNA 结合,当铅离子存在时,能够切割底物链,释放游离的 ssDNA,进而与 Cas12a/crRNA 结合并激活反式切割活性,通过荧光的变化实现铅离子的直接检测。Niu 等^[51]利用适配体的生物功能,结合 CRISPR/Cas12a 建立

Molecular Radar (Random molecular aptamer-dependent CRISPR-assist reporter)检测平台,实现小分子物质的直接检测检测。根据小分子物质的适配体设计 crRNA,适配体与 Cas 12a/crRNA 结合并激活反式切割活性,荧光强度发生变化。当靶物质存在时,能够与适配体结合引起适配体空间构象的变化,导致其无法与 crRNA 结合,也就不存在反式切割。体系中靶物质浓度与荧光强度成反比,通过的荧光强度能够实现小分子靶标的灵敏检测。Sha 等^[52]将 CRISPR/Cas13a 和 CRISPR/Cas14a 进行串联,实现了 microRNA 的超灵敏直接检测。利用 microRNA 作为靶标,与 Cas13a/crRNA 结合并激活反式切割活性,将发夹底物的环单链进行切割,随后在小立足点的作用下与 Cas14a/crRNA 互补结合并激发反式切割活性,切割体系中荧光淬灭的探针,通过荧光的变化实现 microRNA 的免扩增检测。

3 CRISPR/Cas 核酸传感器在食品快速检测中的应用

核酸传感器是利用核酸贯穿整体检测,实现“靶标信号-核酸信号-化学信号”的层层转化,CRISPR/Cas 核酸传感器则是在核酸传感器的基础上,将 CRISPR/Cas 系统引入其中,完成整体检测信号的识别、放大与转导,显著提高检测灵敏度和特异性。目前,CRISPR/Cas 核酸传感器已逐步应用于食品安全的快速检测,例如食源性致病微生物、生物毒素、金属离子、生物技术食品、肉类掺假以及非法添加等方面。

3.1 食源性致病菌的检测

食源性致病菌引发的食品安全事件长居榜首。致病菌的 CRISPR/Cas 核酸传感器检测可分为两大类(图 2):第一,通过增菌后提取基因组,结合核酸扩增技术和 Cas 蛋白的切割能力建立核酸传感器检测;第二,结合适配体实现致病菌向核酸的转化,随后直接或者间接与 CRISPR/Cas 系统结合,建立相应的核酸传感器,实现免培养免提取检测。Peng 等^[53]基于核酸扩增和 CRISPR/Cas12a 建立了 CRISPR/Cas-荧光传感器,用于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的检测。通过基因组提取进行 PCR 扩增,随后将扩增产物与 Cas12a/

crRNA 结合, 利用反式切割活性切割荧光淬灭探针, 通过荧光强度的变化完成金黄色葡萄球菌的检测, 最低检测限为 10^3 CFU/mL。Mukama 等^[5]基于核酸扩增、CRISPR/Cas12a 和试纸条技术建立了 CRISPR/Cas-侧流层析传感器, 用于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的检测。通过基因组提取进行 LAMP 扩增, 随后将扩增产物与 Cas12a/crRNA 结合, 荧光淬灭探针作为连接体能够将纳米金固定在试纸条的检测线上。当探针在反式切割活性作用下被切断后, 纳米金则无法被固定在检测线上, 通过检测线的有无实现了铜绿假单胞菌的定性检测。Li 等^[54]基于核酸扩增、

CRISPR/Cas12a 和电化学技术建立了 CRISPR/Cas-电化学传感器, 用于单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的检测。通过基因组提取进行 RAA 扩增(原理与 RPA 相同), 随后将扩增产物与 Cas12a/crRNA 结合, 利用反式切割活性将电极表面 ssDNA 探针切断引发电信号变化, 实现了单核增生李斯特菌的检测, 最低检测限为 26 CFU/mL。Gootenberg 等^[29]基于核酸扩增和 CRISPR/Cas13 建立了 CRISPR/Cas-双重荧光传感器, 用于金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的检测。通过基因组提取进行多重 RPA 扩增, 随后将扩增产物反转录后与 Cas13a/crRNA 和 Cas13b/crRNA 结合,

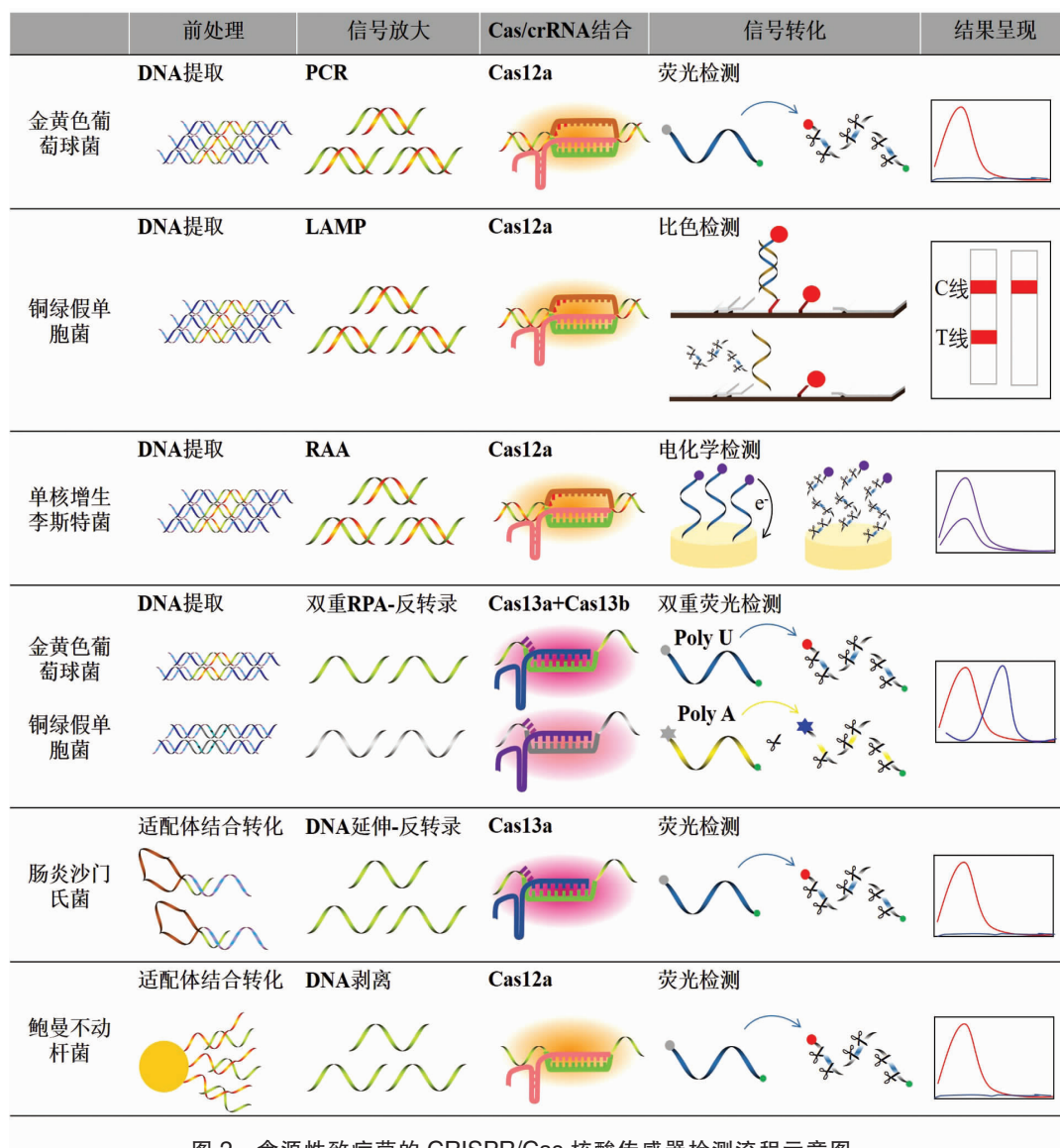


图2 食源性致病菌的 CRISPR/Cas 核酸传感器检测流程示意图

Fig.2 Schematic diagram of CRISPR/Cas nucleic acid biosensors detection process for foodborne pathogens

根据 Cas13 蛋白对切割探针的偏好性, 采取 Cas13a 切割 poly U 探针, Cas13b 切割 poly A 探针, 通过两种荧光信号强度的变化, 实现了金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的同时检测。Shen 等^[55] 基于适配体、核酸扩增和 CRISPR/Cas13a 建立了 CRISPR/Cas-荧光传感器, 用于肠炎沙门氏菌 (*Salmonella Enteritidis*) 的免培养检测。利用“适配体-T7 启动区-引物结合区”设计发夹探针, 探针中的适配体能够有效识别靶标并与之结合, 通过空间构象的变化释放出引物区, 结合引物后在 DNA 聚合酶的作用下形成 dsDNA, 进而在 T7 RNA 聚合酶的作用下生成 ssRNA, 与 Cas13a/crRNA 结合后激活反式切割活性, 通过荧光强度的变化实现肠炎沙门氏菌的检测, 最低检测限为 1 CFU/mL。Li 等^[56] 基于适配体和 CRISPR/Cas12a 建立了 CRISPR/Cas-荧光传感器, 用于鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 的免培养免扩增检测。利用磁珠探针进行菌体捕获, 探针中的适配体与靶标结合后释放互补链, 而互补链能够结合 Cas12a/crRNA 激活反式切割活性, 通过荧光强度的变化实现鲍曼不动杆菌的检测, 最低检测限为 3 CFU/mL。

3.2 生物毒素的检测

生物毒素是由动物、植物、微生物产生的有毒有害物质, 引发食品安全事件较多的是微生物分泌的毒素。由于毒素属于非核酸物质, 所以在利用

CRISPR/Cas 核酸传感器检测时大多需要采用适配体进行核酸转化(图 3)。Abnous 等^[56] 基于适配体、CRISPR/Cas12a、和纳米金建立了 CRISPR/Cas-比色传感器, 用于黄曲霉毒素 M₁ (AFM₁) 的检测。利用适配体和作为 Cas12a/crRNA 的激活链, 当 AFM₁ 存在时, 适配体与靶标结合, 则无法结合 Cas12a/crRNA, 此时 Cas12a 没有活性, 纳米金表面的 ssDNA 引物和磷酸基团修饰的 ssDNA 锁式探针能够在 T4 连接酶和 Phi29 DNA 聚合酶的作用下发生 RCA 反应, 生成大量的单链环绕在纳米金表面。加入对硝基苯酚后, 体系呈现出绿色。若是没有 AFM₁, 则适配体与 Cas12a/crRNA 结合进而激活反式切割活性, 能够将纳米金表面的 ssDNA 引物和磷酸基团修饰的 ssDNA 锁式探针切断, 则无法发生后续 RCA 扩增, 导致纳米金表面裸露。加入对硝基苯酚后, 在纳米金的类过氧化物酶活性的催化下, 对硝基苯酚被氧化成氨基苯酚, 体系由绿色变为无色。通过颜色的变化实现 AFM₁ 的超灵敏检测, 最低检测限为 0.05 ng/L。脂多糖 (LPS) 是一种内毒素, Wang 等^[57] 基于适配体、金属核酸酶和 CRISPR/Cas12a 建立了 CRISPR/Cas-纳米机器荧光传感器, 用于 LPS 的检测。将胍基标记 ssDNA (ASI) 和镁离子金属核酸酶的底物链 (SS) 修饰在磁珠 (MB) 表面, 构建 MB@SS/ASI 复合物, 醛基标记的 ssDNA (ASII) 中包含有金属核酸酶的酶链, ASII 能够通过 C=N 键与 ASI 相

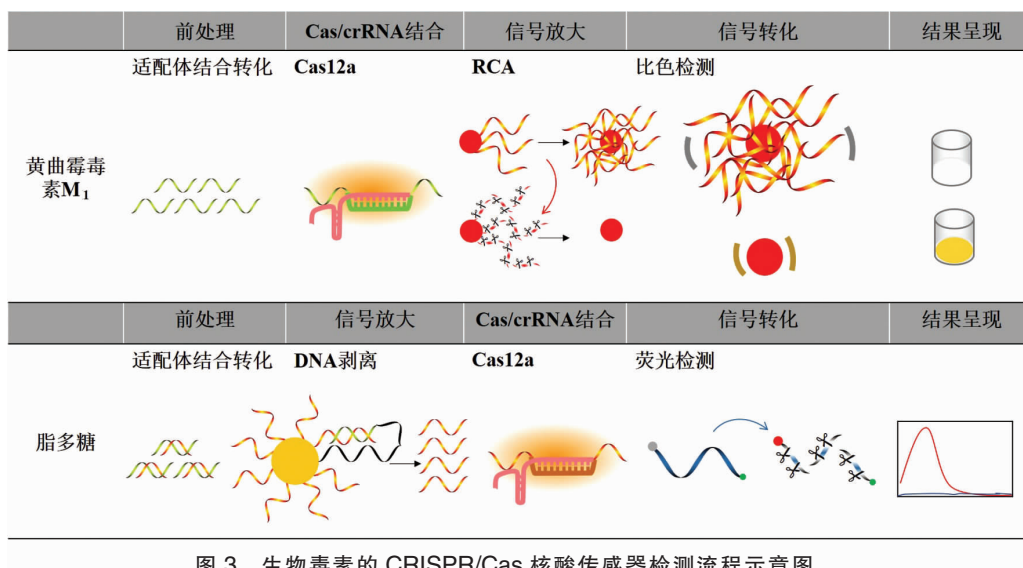


图 3 生物毒素的 CRISPR/Cas 核酸传感器检测流程示意图

Fig.3 Schematic diagram of CRISPR/Cas nucleic acid biosensors detection process for biotoxin

连,组装为 MB@SS/ASI/ASII 纳米机器。随后 ASII 的酶链部分与 SS 互补配对组装成完整的金属核酸酶,在镁离子的作用切断 SS,释放出游离的单链靶标,ASII 则再次与新的 SS 链互补并切割,往复循环至 SS 全被切断。通过磁分离将游离的单链靶标分离,与 Cas12a/crRNA 结合进而激活反式切割活性,荧光信号显著增强。在 LPS 的检测体系中,ASII 中含有适配体互补序列,与适配体形成双链而封闭活性,当 LPS 存在时,能够与适配体结合释放 ASII,触发后续反应,荧光增强。如果没有 LPS,则 ASII 与适配体维持双链状态,进而无法触发后续反应,没有荧光信号。通过荧光信号强度的变化实现 LPS 的检测分析,最低检测限为 7.31 fg/mL。

3.3 金属离子的检测

食品安全风险检测中提及的重金属包含铅、汞、银、镉、铬等,目前的传感器快检技术主要是依赖于金属离子对应的核酸酶开展研究,实现重金属离子向核酸信号的转化,同样,CRISPR/Cas 核酸传感器也采取相同的策略(图 4)。Li 等^[50]基于金

属核酸酶和 CRISPR/Cas12a 建立了 CRISPR/Cas-荧光传感器,用于铅离子的检测。将铅离子金属核酸酶修饰在磁珠表面,并根据底物链设计 crRNA,由于底物链互补且没有 PAM 序列,导致其无法激活 Cas12a 的活性,荧光信号不变。当铅离子存在时,切割底物链释放出游离的 ssDNA,进而与 Cas12a/crRNA 结合并激活反式切割活性,荧光信号增强。通过荧光的变化实现铅离子的检测,最低检测限为 0.053 nmol/L。除重金属外,食品中钠离子作为核心营养素也备受关注,过多摄入也会影响人体健康。Xiong 等^[58]基于金属核酸酶和 CRISPR/Cas12a 建立了 CRISPR/Cas-荧光传感器,用于钠离子的检测。将钠离子金属核酸酶底物链通过生物素-链霉亲和素作用进行固定,没有钠离子时,底物链与酶链组装为完整的金属核酸酶,无法激活 Cas12a 的活性,荧光信号不变。当钠离子存在时,能够切割底物链释放出游离的 ssDNA,进而与 Cas12a/crRNA 结合并激活反式切割活性,荧光信号增强。通过荧光的变化实现钠离子的检测,最低检测限为 0.1 nmol/L。

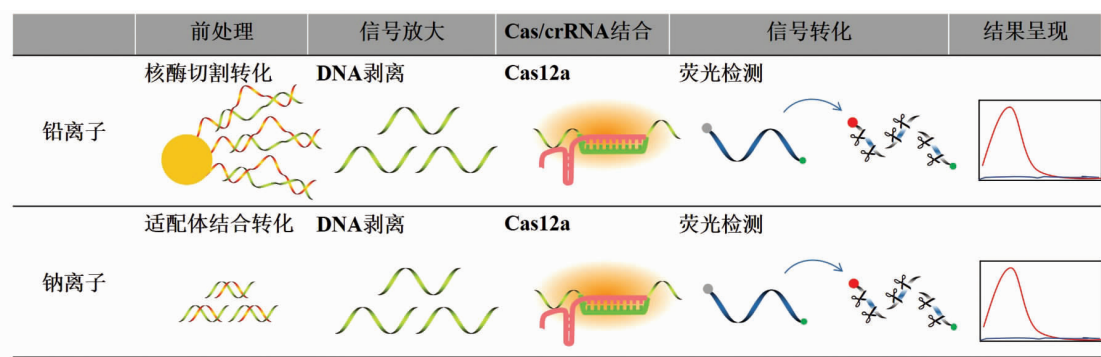


图 4 金属离子的 CRISPR/Cas 核酸传感器检测流程示意图

Fig.4 Schematic diagram of CRISPR/Cas nucleic acid biosensors detection process for metal ions

3.4 生物技术食品的检测

生物技术食品一般是指基于生物技术得到的食品,目前大家比较熟识的主要是转基因食品和基因编辑食品。采用 CRISPR/Cas 核酸传感器检测需要提取基因组、核酸扩增和 Cas 蛋白切割 3 个步骤(图 5)。Wu 等^[59]基于核酸扩增、CRISPR/Cas12a 和自主便携设备建立了 CRISPR/Cas-便携式荧光传感器,用于转基因大豆的检测。通过基因组提取,针对 35S 启动子和大豆内源基因(*Lectin*)

进行双重 LAMP 扩增,随后将反应管倒置,扩增产物分别与两个反应孔中的 Cas12a/crRNA 结合,利用反式切割活性切割荧光淬灭探针,通过两个孔的荧光变化完成转基因大豆的检测,最低检测限为 0.1%。Liu 等^[60]基于核酸扩增和 CRISPR/Cas12a 建立了 CRISPR/Cas-荧光传感器,用于转基因玉米的检测。通过基因组提取进行 RPA 扩增,随后将扩增产物与 Cas12a/crRNA 结合,在反式切割作用下通过荧光变化完成转基因玉米中 NOS 终止子

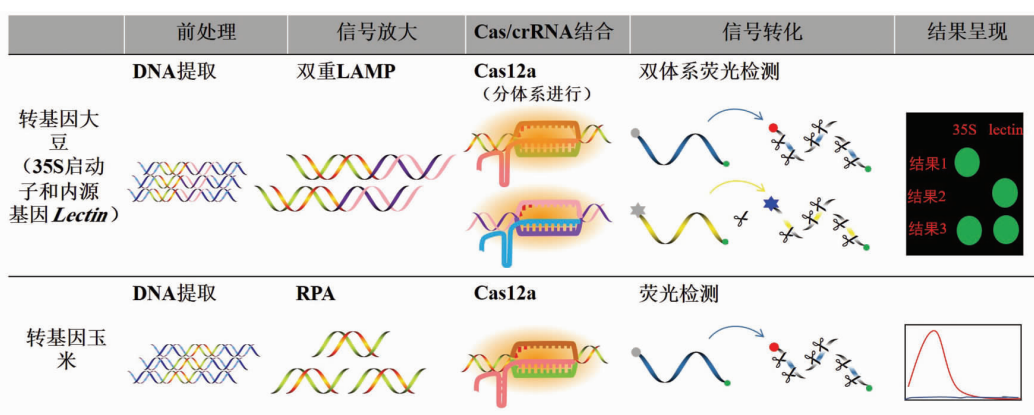


图 5 生物技术食品的 CRISPR/Cas 核酸传感器检测流程示意图

Fig.5 Schematic diagram of CRISPR/Cas nucleic acid biosensors detection process for biotech foods

和 35S 启动子的检测,最低检测限为 10 拷贝。

3.5 肉制品成分的检测

肉制品中的肉类掺假问题是全球热点,从我国的“挂羊头卖狗肉”到国外的“马肉事件”,以次充好、以假乱真的现象越来越常见。采用 CRISPR/Cas 核酸传感器检测同样需要提取基因组、核酸扩增和 Cas 蛋白切割 3 个步骤(图 6)。Liu 等^[60]基于

核酸扩增和 CRISPR/Cas12a 建立了 CRISPR/Cas-荧光传感器,用于肉制品中肉类成分的检测。通过基因组提取进行 RPA 扩增,随后将扩增产物与 Cas12a/crRNA 结合,在反式切割作用下通过荧光变化实现猪肉、牛肉和鸭肉的真实性的检测,最低检测限分别为 100 拷贝、10 拷贝和 10 拷贝。

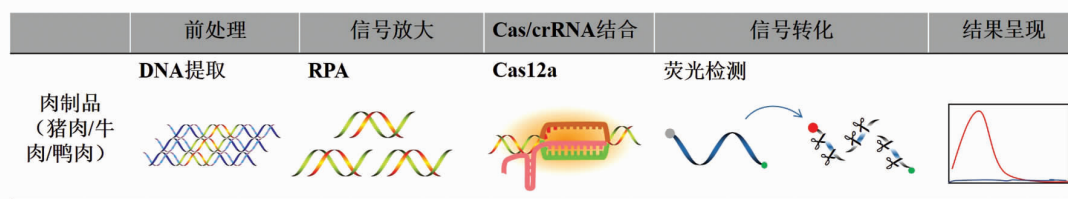


图 6 肉制品的 CRISPR/Cas 核酸传感器检测流程示意图

Fig.6 Schematic diagram of CRISPR/Cas nucleic acid biosensors detection process for meat product

3.6 非法添加物的检测

一些食品安全事件是由于非法添加引起的,例如 2008 年的“三聚氰胺事件”,对中国奶业商业信誉造成了重创,就是因为生产者违法向奶粉中添加“非法添加物”三聚氰胺,导致众多婴幼儿出现肾结石甚至肾损伤。采用 CRISPR/Cas 核酸传感器检测则需要将非法添加物转化成核酸进行分析(图 7)。Qiao 等^[61]基于适配体和 CRISPR/Cas12a 建立了两个 CRISPR/Cas-锁式荧光传感器,用于三聚氰胺的检测,检测准确性及灵敏度能够与 HPLC 相匹配。第 1 个传感器中,利用一条互补链与适配体配对,当三聚氰胺与适配体结合后释放互补链,

与 Cas12a/crRNA 结合并激活反式切割活性,通过荧光强度的变化完成检测,最低检测限为 38 nmol/L;第 2 个传感器中,利用一条互补链与两条适配体配对,后续反应一致,最低检测限可达到 0.24 μ mol/L。

4 展望

CRISPR/Cas 核酸传感器具有诸多优势,但在未来的发展中仍具挑战。第一,多重检测发展有局限,虽然能够通过不同的 Cas 蛋白的选择性或者分离反应能够实现多重检测,但是方法的通用性不强。尤其是针对食品安全风险检测而言,能够实

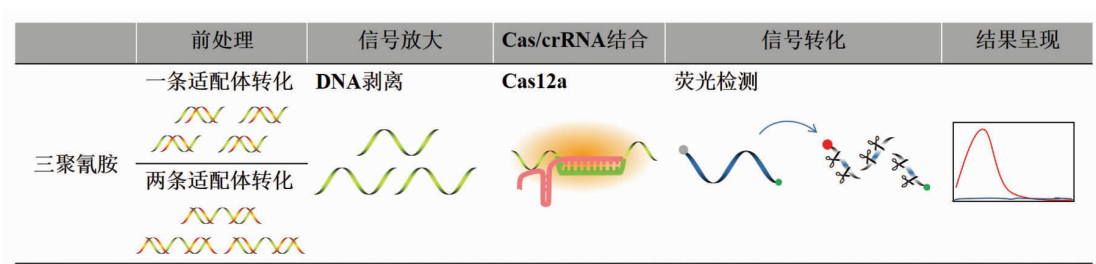


图7 非法添加物的 CRISPR/Cas 核酸传感器检测流程示意图

Fig.7 Schematic diagram of CRISPR/Cas nucleic acid biosensors detection process for illegal additives

现单一体系下的多重检测更有研究意义,因此未来还应该在 CRISPR/Cas 的多重分析上寻求新的突破,实现多重检测可行化、简便化。第二,核酸扩增技术虽能够显著放大原始信号,提升传感器的灵敏度,但是扩增过程中容易引起交叉污染造成结果假阳性。针对这一弊端虽然也有多种技术进行改进,但是却增加了操作上的繁琐,未来还需要进一步探索出更有效的方法。第三,结果呈现方面有比色、荧光、电信号等,其中液相的比色分析、部分荧光分析和固相的试纸条分析能够实现裸眼检测,能够应用在现场分析,但是电化学平台则推广受限,未来应该开发更多具有自主知识产权的小型便携设备,扩大基础科研走向现场应用。第四,食品安全检测应用方面,虽然涵盖了食源性致病菌、生物毒素等核酸和非核酸靶标,但是相关的研究并不多,并且大部分是以 CRISPR/Cas12a 系统开展的研究,此外在农兽药残留检测等关键风险因子方面仍没有相关的研究,未来还需要进一步拓展 CRISPR/Cas 的应用范畴。

参 考 文 献

- [1] LI Y J, WANG C, ZHU Y B, et al. Fully integrated graphene electronic biosensor for label-free detection of lead (II) ion based on g-quadruplex structure-switching[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 89: 758.
- [2] ARDUINI F, CINTI S, SCOGNAMIGLIO V, et al. Nanomaterials in electrochemical biosensors for pesticide detection: Advances and challenges in food analysis[J]. *Microchimica Acta*, 2016, 183(7): 2063.
- [3] LIU X B, MARRAKCHI M, XU D W, et al. Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80: 9.
- [4] WANG X S, XIONG E H, TIAN T, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2497.
- [5] MUKAMA O, WU J H, LI Z Y, et al. An ultrasensitive and specific point-of-care crisper/cas12 based lateral flow biosensor for the rapid detection of nucleic acids[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 159: 112143.
- [6] CHEN M, LUO R, LI S, et al. Based strip for ultrasensitive detection of oscc-associated salivary microRNA via CRISPR/Cas12a coupling with is-primer amplification reaction[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(19): 13336.
- [7] DEVEAU H, GARNEAU J E, MOINEAU S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64(1): 475.
- [8] KOONIN E V, MAKAROVA K S, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 67.
- [9] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11): 722.
- [10] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262.
- [11] JINEK M, JIANG F, TAYLOR D W, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation[J]. *Science*, 2014,

- 343(6176): 1215.
- [12] STERNBERG S H, REDDING S, JINEK M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9[J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 62.
- [13] HESS G T, FRÉSARD L, HAN K, et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 1036.
- [14] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded dnase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436.
- [15] SWARTS D C, JINEK M. Mechanistic insights into the cis- and trans-acting dnase activities of Cas12a [J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(3): 589.
- [16] STRECKER J, JONES S, KOOPAL B, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1.
- [17] 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.
- [18] COX D B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Rna editing with CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2017, 358(6366): 1019.
- [19] ANDERSON K M, POOSALA P, LINDLEY S R, et al. Targeted cleavage and polyadenylation of RNA by CRISPR-Cas13[J/OL]. *BioRxiv*, (2019-01-26) [2021-09-17]. https://www.researchgate.net/publication/330664746_Targeted_Cleavage_and_Polyadenylation_of_RNA_by_CRISPR-Cas13.
- [20] SAVAGE D F. Cas14: Big advances from small crisper proteins[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(8): 1024.
- [21] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839.
- [22] KARVELIS T, BIGELYTE G, YOUNG J K, et al. Pam recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(9): 5016.
- [23] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255.
- [24] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/c2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438.
- [25] 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.
- [26] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444.
- [27] ARIZTI-SANZ J, FREIJE C A, STANTON A C, et al. Integrated sample inactivation, amplification, and Cas13-based detection of sars-cov-2[J]. *BioRxiv*, 2020, 11(1): 5921.
- [28] WANG B, WANG R, WANG D Q, et al. Cas12avdet: A crisper/cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(19): 12156.
- [29] TENG F, GUO L, CUI T T, et al. Cddetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-at tomolar sensitivity and single-base specificity [J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 1.
- [30] DING X, YIN K, LI Z Y, et al. All-in-one dual CRISPR-Cas12a (aiod-crispr) assay: A case for rapid, ultrasensitive and visual detection of novel coronavirus SARS-COV-2 and hIV virus[J]. *BioRxiv*, 2020, 11(1): 4711.
- [31] WANG X F, ZHOU S Y, CHU C X, et al. Dual methylation-sensitive restriction endonucleases coupling with an rpa-assisted CRISPR/Cas13a system (descs) for highly sensitive analysis of DNA methylation and its application for point-of-care detection [J]. *ACS Sensors*, 2021, 6: 2419.
- [32] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. Crispr-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discovery*, 2018, 4(1): 1.
- [33] WANG Y F, GUO Y C, ZHANG L, et al. Integration of multiplex pcr and crisper-cas allows highly specific detection of multidrug-resistant acinetobacter baumannii[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 334: 129600.
- [34] WANG R, CHEN R, QIAN C, et al. Ultrafast visual nucleic acid detection with CRISPR/Cas12a and rapid pcr in single capillary[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 326: 128618.
- [35] 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.
- [36] SAM I K, CHEN Y Y, MA J, et al. Tb–quick: CRISPR–Cas12b–assisted rapid and sensitive detection of mycobacterium tuberculosis[J]. *Journal of Infection*, 2021, 83(9): 54.
- [37] ZHANG M, WANG H, WANG H, et al. CRISPR/Cas12a –assisted ligation –initiated loop –mediated isothermal amplification (cal–lamp) for highly specific detection of micrnas[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(22): 7942.
- [38] QIAN C, WANG R, WU H, et al. Uracil–mediated new photospacer–adjacent motif of Cas12a to realize visualized DNA detection at the single –copy level free from contamination [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(17): 11362.
- [39] BAO Y, JIANG Y, XIONG E, et al. Cut–lamp: Contamination–free loop–mediated isothermal amplification based on the CRISPR/Cas9 cleavage[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(4): 1082.
- [40] ALI Z, AMAN R, MAHAS A, et al. Iscan: An rt–lamp–coupled CRISPR–Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS–COV–2[J]. *Virus Research*, 2020, 288: 198129.
- [41] WANG R, QIAN C Y, PANG Y N, et al. Opverispr: One–pot visual rt–lamp–CRISPR platform for SARS–COV–2 detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 172: 112766.
- [42] WANG R X, ZHAO X X, CHEN X H, et al. Rolling circular amplification (rca)–assisted CRISPR/Cas9 cleavage (race) for highly specific detection of multiple extracellular vesicle micrnas[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 92(2): 2176.
- [43] XU L Q, DAI Q Q, SHI Z Y, et al. Accurate mrsa identification through dual–functional aptamer and CRISPR–Cas12a assisted rolling circle amplification[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2020, 173: 105917.
- [44] QING M, CHEN S L, SUN Z, et al. Universal and programmable rolling circle amplification –CRISPR/Cas12a–mediated immobilization–free electrochemical biosensor[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(20): 7499.
- [45] WANG D X, WANG J, DU Y C, et al. CRISPR/Cas12a–based dual amplified biosensing system for sensitive and rapid detection of polynucleotide kinase/phosphatase [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 168: 112556.
- [46] WANG X F, ZHOU S Y, CHU C X, et al. Target–induced transcription amplification to trigger the trans–cleavage activity of CRISPR/Cas13a (titac–Cas) for detection of alkaline phosphatase[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 185: 113281.
- [47] HUANG M Q, ZHOU X M, WANG H Y, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic Repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site–specific nucleic acid detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(3): 2193.
- [48] WANG X F, CHEN X L, CHU C X, et al. Naked–eye detection of site–specific ssrna and ssdna using pammer–assisted crispr/cas9 coupling with exponential amplification reaction [J]. *Talanta*, 2021, 233: 122554.
- [49] CHOI J H, LIM J, SHIN M, et al. CRISPR –Cas12a–based nucleic acid amplification–free DNA biosensor via au nanoparticle –assisted metal –enhanced fluorescence and colorimetric analysis [J]. *Nano Letters*, 2020, 21(1): 693.
- [50] LI J J, YANG S S, ZUO C, et al. Applying CRISPR –Cas12a as a signal amplifier to construct biosensors for non–DNA targets in ultralow concentrations[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(4): 970.
- [51] NIU C Q, WANG C Y, LI F, et al. Aptamer assisted CRISPR –Cas12a strategy for small molecule diagnostics[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 183: 113196.
- [52] 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.
- [53] PENG L, ZHOU J, YIN L J, et al. Integration of logic gates to CRISPR/Cas12a system for rapid and sensitive detection of pathogenic bacterial genes[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1125: 162.
- [54] LI F, YE Q H, CHEN M T, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 179: 113073.
- [55] 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): 1.
- [56] ABNOUS K, DANESH N M, RAMEZANI M, et al. A novel colorimetric aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin M₁ based on the combination of CRISPR-Cas12a, rolling circle amplification and catalytic activity of gold nanoparticles[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1165: 338549.
- [57] WANG P, LIU Y M, YU Y, et al. Hydrazone ligation assisted dnzyme walking nanomachine coupled with CRISPR-Cas12a for lipopolysaccharide analysis [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1174: 338747.
- [58] XIONG Y, ZHANG J J, YANG Z L, et al. Functional DNA regulated CRISPR-Cas12a sensors for point-of-care diagnostics of non-nucleic-acid targets [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 142(1): 207.
- [59] WU H, QIAN C, WU C, et al. End-point dual specific detection of nucleic acids using CRISPR/Cas12a based portable biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 157: 112153.
- [60] 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.
- [61] QIAO B, XU J K, YIN W H, et al. "Aptamer-locker" DNA coupling with CRISPR/Cas12a-guided biosensing for high-efficiency melamine analysis [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 183: 113233.

CRISPR/Cas-based Nucleic Acid Detection and Its Application in Rapid Detection for Food Safety

Zhai Baiqiang², Cheng Nan³, Wang Hongtao², Xu Yuancong^{1*}

(¹Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100024

²Henan Railway Food Safety Management Engineering Technology Research Center, Zhengzhou 450052

³College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083)

Abstract In recent years, rapid detection technology has become one of the most important topics in the scope of food safety. CRISPR/Cas system consists of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas). Due to its superior targetability, CRISPR/Cas system has been widely used in the nucleic acid detection. CRISPR/Cas nucleic acid biosensor has become the research hotspot of rapid detection, because of its high sensitivity, strong specificity and good timeliness, driving the development of rapid detection for food safety. This review summarized the development of CRISPR/Cas system, introducing CRISPR/Cas systems combined with different nucleic acid amplification technologies, and their applications in target detection. Furthermore, the use of CRISPR/Cas nucleic acid biosensors in rapid detection for food safety was discussed, and future research directions was proposed. Overall, this review provides references and ideas for developing novel rapid detection methods utilizing CRISPR/Cas nucleic acid biosensors.

Keywords clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR); nucleic acid biosensor; food safety; rapid detection