

CRISPR/Cas 系统的生物传感器在食品安全快速检测中的应用

唐兴悦^{1,2,3}, 沈亚芳², 舒在习^{1,3}, 黄爱霞², 林锋², 乔朝晖⁴, 戴煌^{1,3*}, 郝贵杰^{2*}

¹ 武汉轻工大学食品科学与工程学院 武汉 430000

² 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室 浙江省鱼类健康与营养重点实验室
湖州市水产品品质提升与加工技术重点实验室 浙江省淡水水产研究所 浙江湖州 313001

³ 大宗粮油精深加工教育部重点实验室 武汉 430023

⁴ 宁波大学食品与药学学院 浙江宁波 315800

摘要 规律成簇的间隔短回文重复序列(CRISPR)及其相关蛋白(Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统,因具有极高的特异性、可编程性和易操作等优势而被广泛应用于食品安全快速检测领域。近年来,基于 CRISPR/Cas 系统的生物传感器发展迅速,已成为快速检测领域的明星工具之一。本文探讨 CRISPR/Cas 系统中 Cas9、Cas12a、Cas13a 和 Cas14a 等常见 Cas 效应蛋白的作用机制及应用范围,综述其在食源性致病菌、重金属、农药残留和真菌毒素等常见食品有害物质快速检测中的应用,分析 CRISPR/Cas 生物传感器目前所面临的挑战和趋势,以期为其在食品安全领域的应用提供新思路。

关键词 CRISPR/Cas; 生物传感器; 食品安全; 快速检测

文章编号 1009-7848(2025)01-0411-16 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.039

食源性疾病已成为全球最突出的公共问题,严重威胁公众健康和国民经济。据世界卫生组织(World Health Organization,WHO)报道,全球每年约有 6 亿人因食用受污染的食物患病,造成 42 万人死亡,导致全球健康寿命年损失高达 3 000 万年以上^[1]。因此,保障食品安全迫在眉睫。2021 年 3 月,《中华人民共和国国民经济和社会发展第十四个五年规划和 2035 年远景目标纲要》提出,严格食品药品安全监管,加大重点领域食品安全问题联合整治力度,加强食品药品安全风险监测、抽检和监管执法等^[2]。引发食源性疾病的有害物质主要包括重金属、农药、真菌毒素和食源性致病微生物等,准确和快速检测食源性有害物质是目前

亟需解决的问题。

目前,食品中有害物质的检测仍以传统方法为主,包括适用于毒素等化学物质检测的仪器分析法和适用于致病菌等微生物检测的平板培养法等。虽然这些方法具有较高的重现性,但是存在分析时间长,操作繁琐等不足,因此在实际应用中具有一定的局限性。与传统方法相比,快速检测方法因操作方便、检测速度快等优势而越来越受到人们的青睐。其中,核酸检测技术因极高的灵敏度和特异性而广受关注,尤其以聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)为代表的核酸扩增技术已成为细菌、病毒等物质检测的“金标准”。然而,PCR 操作复杂且需要精密的仪器和专业人员操作,因此限制了其发展和应用。为弥补这一不足,以环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)和重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)等为代表的等温扩增技术近年来得到快速发展。由于可在恒温条件下实现目标物的快速扩增,因此在一定程度上拓宽了核酸检测技术的应用范围。然而,其繁琐的引物设计和扩增子污染,仍制约了其进一步应用。新型核酸检测技术仍待进一步研究。

近些年,规律成簇的间隔短回文重复序列

收稿日期: 2024-01-20

基金项目: 浙江省科技厅重点研发项目(2022C02028);浙江省自然科学基金项目(LTGN23C200019);湖州市公益性应用研究项目(2022GZ25);湖州市科技局重点研发项目(2022ZD2052);浙江省科技厅省属科研院所扶持专项(2023YSZX009, 2023YSZX003);国家自然科学基金青年科学基金项目(32001773)

第一作者: 唐兴悦,女,硕士生

通信作者: 戴煌 E-mail: huangdai9@126.com
郝贵杰 E-mail: 391601350@qq.com

(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated, CRISPR) 及其相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 组成的 CRISPR/Cas 系统在检测领域备受关注。CRISPR/Cas 系统是细菌和古细菌等原核生物在演化过程中形成的一种适应性免疫系统^[3], 具有极高的特异性, 甚至可识别目标序列中单个碱基的错配。随着 SHERLOCK^[4]、DETECTR^[5] 和 HOLMES^[6] 等基于 CRISPR 的核酸检测技术的问世, CRISPR/Cas 系统迅速成为快速检测领域的明星工具, 为食品中各类有害物质的快速、灵敏和特异性检测提供了新的方法。近年来, 随着学科领域的不断交叉, 人们对 CRISPR/Cas 系统的研究逐步深化, 对其在快速检测方面的应用研究越来越多, 应用范围也从传统的核酸靶标进一步拓展到各类非核酸物质。在此背景下, 本文探讨 CRISPR/Cas 系统中 Cas9、Cas12a、Cas13a 和 Cas14a 等常见 Cas 蛋白的作用机制和应用范围, 综述其在食源性致病菌、重金属、农药残留和真菌毒素等常见食品有害物质快速检测中的应用, 分析 CRISPR/Cas 生物传感器目前所面临的挑战和未来发展趋势, 以期为其在食品安全领域的应用提供新思路。

1 CRISPR/Cas 系统概述

CRISPR/Cas 系统是细菌抵抗外来核酸侵略的一种适应性免疫系统, 由 CRISPR 序列元件和编码 Cas 蛋白的相关基因组成^[7]。其中, CRISPR 序列主要包括数个高度保守的重复序列和多段间隔

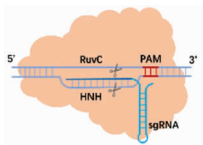
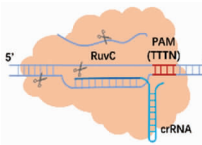
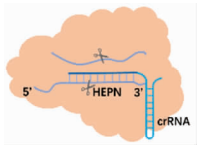
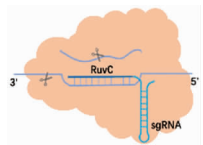
序列。其附近区域存在编码 Cas 蛋白的相关基因, 编码的蛋白具有核酸酶活性, 可特异性切割核酸序列^[8-9]。当外源核酸入侵宿主时, 入侵基因被加工成间隔序列存储在重复序列之间; 随后, CRISPR 序列转录生成 CRISPR RNA (crRNA); 最后, crRNA 与 Cas 蛋白复合, 并切割入侵核酸^[10]。基于 CRISPR/Cas 系统的检测技术正是基于该作用机制, 首先设计向导 RNA (Single-guide RNA, sgRNA) 特异性识别核酸靶标并激活 Cas 蛋白的切割活性, 然后通过一定手段对切割产物进行分析, 从而实现核酸靶标的检测。根据 Cas 基因与位点结构之间的相似性, CRISPR/Cas 系统可分为两大类: 其一, 需要多个 Cas 蛋白联合形成复合体发挥功能的 I 型、III 型和 IV 型组成的第 1 类 CRISPR/Cas 系统; 其二, 仅需要单个 Cas 蛋白即可发挥作用的 II 型、V 型和 VI 型组成的第 2 类 CRISPR/Cas 系统。其中, Cas9、Cas12a、Cas13a 和 Cas14a 是属于第 2 类 CRISPR/Cas 系统的核心蛋白, 已经被广泛应用于检测领域, 它们的相关性质如表 1 所示。

1.1 Cas9

CRISPR/Cas9 系统是目前研究最深入和应用最广泛的 CRISPR/Cas 系统之一。Cas9 蛋白含有 HNH 和 RuvC 共 2 个结构域, 其切割活性的激活需要同 crRNA 和 tracrRNA (crRNA 和 tracrRNA 组成 sgRNA) 协同发挥作用。在 CRISPR/Cas9 系统中, Cas9 与 sgRNA 部分结合形成 Cas9/sgRNA 复合物, 其能特异性识别含 5'NGG 原间隔相邻基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 的双链 DNA

表 1 不同 Cas 蛋白比较

Table 1 Comparison of different Cas proteins

Cas 蛋白	Cas9	Cas12a	Cas13a	Cas14a
				
间隔长度	18~24 nt	18~25 nt	22~30 nt	20~40 nt
核酸酶域	HNH, RuvC	RuvC	2×HEPN	RuvC
向导 RNA	sgRNA	crRNA	crRNA	sgRNA
靶向目标	dsDNA	dsDNA, ssDNA	ssRNA	ssDNA
PAM/PFS	5'-NGG-3'	5'-TTTN-3'	3'PFS; 无 G	—
切割方式	顺式切割	顺式切割, 反式切割	顺式切割, 反式切割	顺式切割, 反式切割

(Double-stranded DNA, dsDNA), 随后激活 HNH 和 RuvC 共 2 个结构域的核酸酶活性, 从而切割靶标 dsDNA。CRISPR/Cas9 系统目前已被广泛应用于核酸检测领域, 然而相比 Cas12a、Cas13a 和 Cas14a 等具有反式切割活性的 Cas 蛋白, Cas9 蛋白自身很难将目标物识别、切割等行为转化为可读信号, 导致其检测过程往往较为复杂^[11]。

1.2 Cas12a

虽然 Cas12a 与 Cas9 同属于第 2 类 CRISPR/Cas 系统, 但二者在识别机制和切割活性等方面仍存在较大差异。相比 Cas9, Cas12a 无需 tracrRNA 参与即可将前体 crRNA (pre-crRNA) 加工为成熟的 crRNA^[12-14]。在 crRNA 引导下, 它可以识别 dsDNA (含 5' TTTN PAM 位点) 或单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) (无需 PAM 位点) 并激活切割活性。其不仅特异性切割靶标 dsDNA/ssDNA (顺式切割活性), 同时也可非特异性切割周围任意 ssDNA (反式切割活性)。Cas12a 蛋白的反式切割活性使其能够以每秒千次的速率解离核酸报告分子, 从而显著提高检测灵敏度^[15-16]。除拥有 Cas9 蛋白不具备的反式切割活性之外, Cas12a 蛋白虽然只有 RuvC 核酸酶结构域, 但依旧能够促使 dsDNA 断裂^[17], 且其细胞毒性比 Cas9 小^[18]。然而相较于其它 CRISPR/Cas 系统, CRISPR/Cas12a 系统很难识别单碱基的差异, 识别精度有待提升。

1.3 Cas13a

Cas13a 又称 C2c2, 是由 crRNA 识别 (REC) 叶和核酸酶 (NUC) 叶组合成的“双叶”球蛋白, 其中 REC 叶包含 2 个 HEPN 结构域。在免疫过程中, Cas13a 中的 Helicai-1 结构域会剪切 pre-crRNA 而得到成熟的 crRNA, 并与 Cas13a 蛋白结合形成二元复合物。复合物中的 Cas13a 识别靶标 RNA 的前间隔序列侧翼位点 (Protospacer flanking sequences, PFS)^[19], 并与靶标 RNA 杂交, 刺激 Cas13a 的 2 个 HEPN 核酸酶结构域相互靠近形成催化位点^[20], 从而激活 Cas13a 的切割活性。在激活状态下, 其不仅能切割靶标 RNA, 而且能切割其它任意 RNA^[21-22]。相比 Cas12a, Cas13a 具有更高的反式切割效率 (大约高 1~2 个数量级), 因此通常具有更高的检测灵敏度^[23]。然而, 其靶向目标为 RNA, 在检测 DNA 靶标时需事先进行反转录。

1.4 Cas14a

Cas14a 是目前发现最小的 II 类 CRISPR 效应蛋白, 具有 RNA 引导的 ssDNA 靶向性。与 Cas12a 和 Cas13a 等其它 Cas 蛋白相比, Cas14a 质量较小 (约为其它蛋白的一半)^[24], 且在识别 ssDNA 时, 不需要 PAM 位点^[25]。除识别靶标仅为 ssDNA 之外, Cas14a 具有与 Cas12a 相似的切割特性, 在特异性识别靶标 ssDNA 后, 可激活 RuvC 结构域的核酸酶活性, 从而具备顺式特异性切割靶标 ssDNA 和反式随机切割任意 ssDNA 的能力^[26]。与 Cas12a 不同的是, Cas14a 对 ssDNA 的识别具有高度特异性和敏感性, 错配容忍度较低, 因此识别精度显著提高。目前, CRISPR/Cas14a 系统已被广泛应用于单核苷酸多态性分析和病原体鉴别^[25, 27]。

2 CRISPR/Cas 系统在食品有害物质检测中的应用

2.1 食源性致病菌检测

食源性致病菌是通过食物传播的致病性细菌, 可能导致人恶心、干呕、胃肠道感染, 甚至中毒死亡^[28-30]。基于 CRISPR/Cas 系统的生物传感器已被广泛研究, 而直接检测致病菌基因组 DNA 存在灵敏度不足的问题。通过核酸扩增技术指数级放大靶标数量, 再结合 CRISPR/Cas 系统检测扩增产物是提高灵敏度的常用手段。例如, Ma 等^[31]利用 PCR 扩增目的基因并激活 Cas12a 反式切割活性, 结合金纳米颗粒 (Gold nanoparticle, AuNPs) 独特的比色和光热性质开发了双模信号输出的生物传感器检测沙门氏菌, 检测限为 1 CFU/mL。显然, 结合 PCR 扩增可显著提高 CRISPR/Cas 检测方法的灵敏度, 然而 PCR 技术对温度控制要求较高, 不适合偏远地区以及现场即时检测。将 CRISPR 技术与 RPA、LAMP 和滚环扩增 (Rolling circle amplification, RCA) 等等温扩增技术结合是有效的解决途径。为此, Lee 等^[32]开发了基于 LAMP-CRISPR/Cas12a 的荧光生物传感器检测大肠杆菌 O157:H7。结合膜过滤富集, 该方法对大肠杆菌 O157:H7 的检测限达到 1.22 CFU/mL。然而, PCR 或 LAMP 扩增后需要开盖取出扩增产物再进行 CRISPR 切割, 可能导致气溶胶污染。为解决这一问题, Cai 等^[33]利用抗体修饰的 DNA 生物条形码

特异性标记沙门氏菌,经 RPA 扩增 DNA 生物条形码后,激活 Cas12a 蛋白的切割活性,实现在 60 min 内检测鼠伤寒沙门氏菌(图 1)。该方法采用 RPA 技术扩增标记的生物条形码 DNA,无需直接扩增目标基因,且可与 CRISPR 切割实现“一管式”反应,解决了气溶胶污染问题。然而抗体成本高且易失活,难以满足贫困地区和野外现场检测需求,因此目前仍需要开发成本低、鲁棒性好、操作简便且灵敏度高的新型检测方法。

2.2 重金属检测

近年来,铅、汞、铬、镉等重金属离子超标是造成食品安全问题的主要原因之一。CRISPR/Cas 系统作为一种新兴诊断技术,在定量检测食品中重金属含量方面极具潜力。例如,Yu 等^[34]发现 G-四链体在 Pb^{2+} 存在下的构象变化可阻止其被 CRISPR/Cas12a 系统反式切割,从而构建了一种基于荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)的生物传感方法检测 Pb^{2+} ,检测限为 2.6 nmol/L(图 2)。Chen 等^[36]利用脱氧核酶(DNAzyme)识别 Pb^{2+} 后,释放的 ssDNA 激活 CRISPR/Cas12a 系统的切割活性,从而建立 Pb^{2+} 含量与 CRISPR/Cas12a 系统切割活性之间的联系,实现 Pb^{2+} 的定量检测,检测限低至 0.48 nmol/L。这些方法都充分利用了 Cas12a 效应蛋白的反式切割活性产生可读信号。而作为一类非核酸靶标,重金属离子自身无法激活 CRISPR/Cas 系统的切割活性,因此常常需要借助 G-四联体和 DNAzyme 等功能核酸,打破其与 CRISPR/Cas 系统之间的壁垒。由于只有 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 等少部分重金属离子可被一些功能性核酸识别并发生作用,导致检测目标范围受限,因此亟需建立基于 CRISPR 技术的重金属检测通用方法。

2.3 农药残留检测

农药滥用直接污染蔬菜、水果、谷物和茶叶等农产品,而且其具有生物蓄积性、生物毒性、神经毒性和诱变性,对人类健康造成严重威胁^[37-38]。痕量检测农药残留对保障农产品质量和公众健康至关重要。目前利用 CRISPR 技术结合 DNA 链置换反应^[39]、双酶级联反应^[15]等已实现多种农药检测。例如,Fu 等^[15]以 MnO_2 纳米片为媒介,利用双酶级联反应激活 CRISPR/Cas12a 的切割活性,并

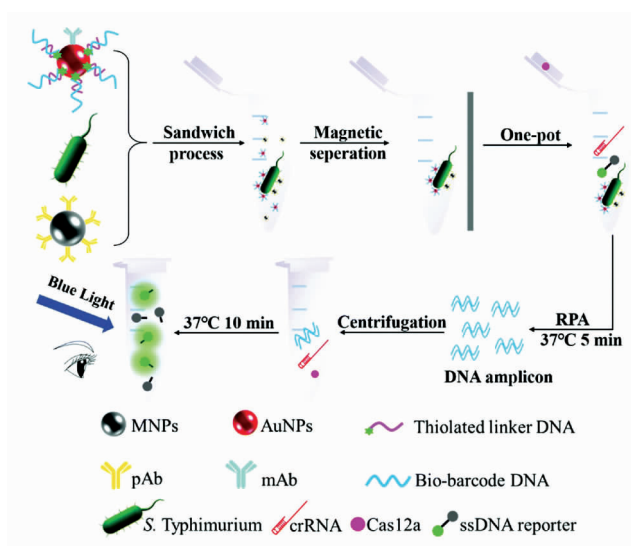


图 1 基于“一管式”CRISPR/Cas12a-RPA 系统的生物传感器检测鼠伤寒沙门氏菌原理图^[33]

Fig.1 Illustration of the one-pot CRISPR/Cas12a-RPA system for *Salmonella Typhimurium* detection^[33]

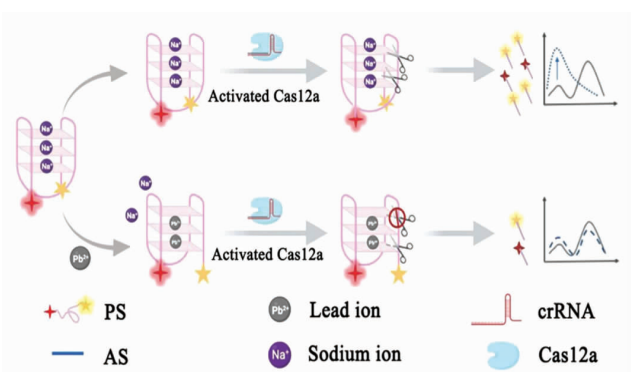


图 2 基于 G-四链体构象变化的 CRISPR/Cas12a 系统检测 Pb^{2+} 原理图^[34]

Fig.2 Illustration of the CRISPR/Cas12a biosensor based on the conformation change of G-quadruplex for Pb^{2+} detection^[34]

产生荧光信号对农产品中有机磷农药(OPs)进行超灵敏快速检测。在该方法中,乙酰胆碱酯酶(AChE)催化硫代乙酰胆碱水解生成硫代胆碱(TCh),致使 MnO_2 降解释放 Mn^{2+} 并激活 DNAzyme 的切割活性产生短链 DNA。释放的短链 DNA 激活 CRISPR/Cas12a 的切割活性并产生荧光信号。而当 OPs 存在时,AChE 的活性被抑制,从而阻碍 TCh 的生成和 MnO_2 的还原,进而无法激活 DNAzyme 和 CRISPR/Cas12a 系统的切割活性。该

方法实现了对 OPs 的超灵敏检测,对对氧磷、敌敌畏和双氧磷的检测限分别为 270,406,218 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而此荧光分析方法需要外部光源激发,可能会受到食品样品中背景荧光的影响。相比之下,电化学发光(Electrochemiluminescence, ECL)法无需外加光源且背景干扰较小。Li 等^[35]在 AuNPs@Fe₃O₄ 磁珠(Au@MBs)表面修饰适配体和其互补 ssDNA

组成的 dsDNA。当目标物啉虫脒存在时,其特异性结合 Au@MBs 表面的适配体并释放 ssDNA。随后,游离 ssDNA 激活 CRISPR/Cas12a 系统的切割活性,并非特异性切割淬灭探针(二茂铁修饰的 ssDNA),使其远离电极表面,导致 ECL 信号恢复。该方法具有较高的灵敏度,对啉虫脒的检测限可达到 2.7 pmol/L (图 3)。

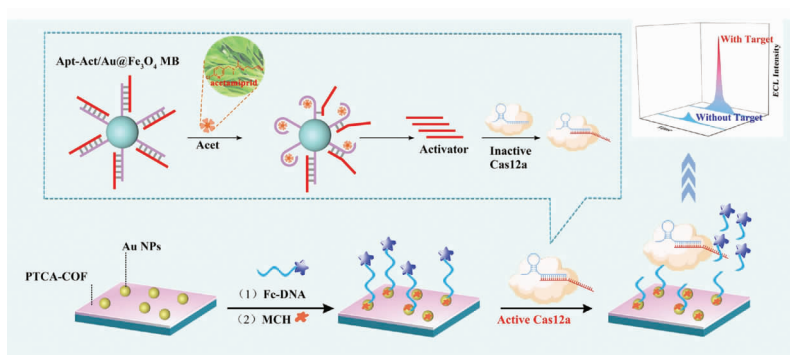


图 3 基于 CRISPR/Cas12a 系统的电化学发光生物传感器检测啉虫脒原理图^[35]

Fig.3 Illustration of CRISPR/Cas12a-based electrochemiluminescence biosensor for acetamidid detection^[35]

2.4 真菌毒素检测

真菌毒素常存在于谷物粮食中,是一种真菌所代谢的低分子质量化合物^[40]。食品中的真菌毒素主要包括黄曲霉毒素(Aflatoxin)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)等。这些毒素具有致突变、致畸和致癌等不利影响^[41]。为此,我国对食品中的真菌毒素限量作了严格规定。根据《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761-2017)规定,不同食品中 AFB₁、AFM₁、ZEN、OTA 和 DON 限量分别为 0.5~20, 0.5, 60, 2~10, 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[42]。

与重金属和农药残留等非核酸靶标相类似,真菌毒素自身无法激活 Cas 蛋白的切割活性。当前检测方法主要以核酸适配体为媒介,利用其在识别目标毒素的同时建立 CRISPR/Cas 系统切割活性与目标物含量之间的定量关系。例如, Lin 等^[43]以 ssDNA 修饰的上转换颗粒(Upconversion nanoparticles, UCNPs)为荧光标签, AuNPs 修饰的 Ti₃C₂Tx MXene 纳米片(MXene-Au)为淬灭剂,开发了一种 CRISPR/Cas12a 介导的发光共振能量转移(Luminescence resonance energy transfer, LRET)

传感方法检测 DON。该方法利用适配体激活 CRISPR/Cas12a 系统的切割活性,使其非特异性切割 UCNPs 表面的 ssDNA。因此, UCNPs 无法吸附在 MXene-Au 表面,可实现上转换发光;而当 DON 存在时,适配体与 DON 结合,从而抑制 CRISPR/Cas12a 系统的切割活性。UCNPs 通过表面的 ssDNA 被吸附在 MXene-Au 表面,二者之间产生 LRET 效应,致使 UCNPs 的发光被淬灭。该方法对 DON 的检测限为 0.64 ng/mL 。为进一步提高检测灵敏度, Yao 等^[16]利用 Nt.AlwI 核酸内切酶水解产生大量 ssDNA 以放大检测信号,实现了对 ZEN 的灵敏检测,检测限可达到 0.213 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 4)。对于真菌毒素等非核酸靶标检测,引入核酸适配体建立其含量与 CRISPR/Cas 系统切割活性之间的联系是目前常见的策略。适配体合成简单,稳定性强,价格低廉等优势也使该类方法具有较强的应用前景。然而,此类方法严重依赖适配体筛选技术,仅适用于 DON、OTA、ZEN 等适配体筛选技术相对成熟的真菌毒素的检测,应用范围较为受限。因此,仍需进一步研究开发适用范围更广的新型检测模式。

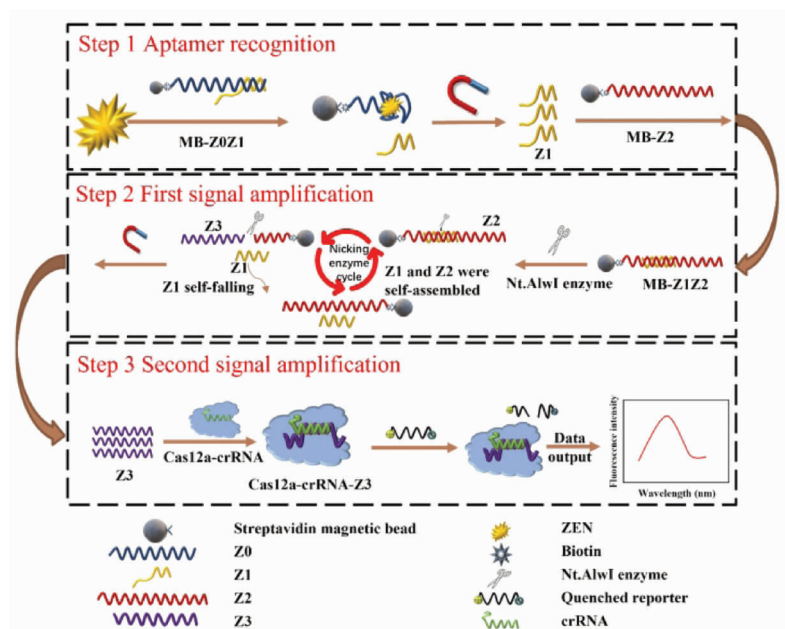


图 4 基于 Nt.AlwI 酶和 CRISPR/Cas12a 双重信号放大的荧光生物传感器检测玉米赤霉烯酮原理图^[16]

Fig.4 Illustration of the Nt.AlwI and CRISPR/Cas12a-based dual-signal-amplification aptasensor for ZEN detection^[16]

表 2 基于 CRISPR/Cas 系统的生物传感器检测食品中的常见有害物

Table 2 CRISPR/Cas-based biosensors for the detection of common harmful substances in food

目标物	Cas 蛋白	靶标	信号输出类型	样品	检测限	参考文献
重金属	Cas12a	Pb ²⁺	荧光	矿泉水	0.48 nmol/L	[36]
	Cas12a	Hg ²⁺	电化学发光	自来水	0.45 fmol/L	[44]
	Cas12a	Pb ²⁺	荧光	茶饮料与牛奶	2.6 nmol/L	[34]
农药残留	Cas12a	对氧磷、敌敌畏、双氧磷	荧光	柑橘与卷心菜	270, 406, 218 pg/mL	[45]
	Cas12a	啶虫脒	电化学发光	生菜	2.7 pmol/L	[35]
	Cas12a	啶虫脒、莠去津	荧光	蔬菜	2.5, 0.2 pmol/L	[39]
真菌毒素	Cas12a	AFB ₁	荧光	花生	0.92 pg/mL	[46]
	Cas12a	AFM ₁	比色	牛奶	0.05 ng/L	[47]
	Cas12a	DON	荧光	玉米粉	0.64 ng/mL	[43]
	Cas12a	OTA	荧光	玉米粉	0.83 ng/mL	[48]
	Cas12a	链格孢霉菌	比色和光热	柑橘	1.5 pmol/L	[49]
食源性致病菌	Cas12a	大肠杆菌 O157:H7	电化学	脱脂奶粉	10 CFU/mL	[50]
	Cas12a	沙门氏菌	比色和光热	牛奶	1 CFU/mL	[31]
	Cas12a	金黄色葡萄球菌	荧光	肉类与蔬菜	5.4×10 ² CFU/mL	[45]
	Cas12a	金黄色葡萄球菌	电化学	牛奶	3 CFU/mL	[51]
	Cas13a	金黄色葡萄球菌	荧光	肉类与蔬菜	10 CFU/mL	[52]
	Cas9	鼠伤寒沙门氏菌	比色	牛奶	10 CFU/mL	[53]
	Cas12a	鼠伤寒沙门氏菌	荧光	牛奶	1 CFU/mL	[33]
	Cas12a	副溶血性弧菌	比色	虾	6.1×10 ² CFU/g	[54]
	Cas13	单增李斯特菌	荧光	牛奶	148 CFU/mL	[55]
Cas12a	单增李斯特菌	电化学	金针菇	9.4×10 ² CFU/g	[56]	

注: AFB₁: 黄曲霉毒素 B₁; AFM₁: 黄曲霉毒素 M₁; DON: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; OTA: 赭曲霉毒素 A。

3 CRISPR/Cas 系统在食品安全检测领域面临的挑战与发展趋势

3.1 样品前处理

食品基质复杂,蛋白质、脂质、多糖、维生素等各类成分可能会严重影响检测结果,产生假阳性或者假阴性结果。因此,在检测前常常需要通过适当的样品前处理方法提取和纯化目标物以降低样品的基质效应。此外,一些被测目标物含量较低,难以检测,为了准确测量其含量,需在检测前对样品进行浓缩富集。然而在 CRISPR 检测领域,人们过度偏重检测方法的研究,往往忽视了食品基质的影响和实际应用目标。目前,与 CRISPR 检测技术相配套的样品前处理技术仍以传统处理方法为主。以食源性致病菌检测为例,煮沸裂解法和碱裂解法是常见的 DNA 快速提取方法^[57-58]。它们虽然操作简单,提取快速,但是 DNA 产率较低,而且杂质较多,不利于后续检测。离心柱法提取 DNA 的纯度较高,而且发展成熟,已经实现商业化。然而在提取过程中需要反复离心,不适用于现场高通量处理。为弥补以上不足,磁分离技术应运而生。其通过对磁性纳米材料的表面功能化高效结合目标物,并利用磁分离、洗脱等步骤实现待测物的分离和纯化。相比传统前处理方法,磁分离方法操作简单,用时短,而且能够实现自动化和大批量操作,因而受到广泛关注。例如,Wang 等^[53]利用磁性纳米颗粒(Magnetic nanoparticles, MNPs)分离、纯化沙门氏菌基因组 DNA,并将其与基于 CRISPR/Cas9 系统的侧流层析检测技术相结合,可实现对沙门氏菌的灵敏检测,检测限为 10² CFU/mL。然而,目前大部分磁分离方法仅聚焦于小体积样品的前处理,未能充分发挥 MNPs 在浓缩富集方面的独特优势。此外,磁性纳米材料在操作过程中易发生聚集,其稳定性问题仍需解决。因此,未来研究可通过磁泳、磁栅分离等技术提高对大体积样本的处理能力,并通过表面改性等技术提高磁性纳米材料的稳定性。

3.2 气溶胶污染

为提高检测灵敏度,人们常常将 CRISPR 检测与核酸扩增相结合。例如,Shen 等^[57]利用 PCR 技术扩增沙门氏菌基因组 DNA,然后与 CRISPR/Cas12a 系统结合建立了一种磁弛豫开关生物传感

器。He 等^[59]开发了一种基于 PCR 扩增和 CRISPR/Cas12a 的电化学生物传感器检测沙门氏菌。由于 PCR 扩增与 Cas 蛋白介导的切割反应所需温度条件不同,因此需要事先扩增目标物,然后将扩增子与 CRISPR 试剂混合,开盖过程极易产生气溶胶污染。与 PCR 扩增相比,RPA 扩增与 CRISPR 体系的反应温度相似,有望实现免开盖检测,以避免扩增子污染。当将 RPA 扩增与 CRISPR 切割相结合进行“一管式”反应时,CRISPR 的非特异性切割作用会破坏扩增模板,严重影响 RPA 的扩增效率和后续检测灵敏度。为弥补这一不足,Xiao 等^[60]利用空间上的隔绝作用将 RPA 扩增与 CRISPR 切割反应相分隔(图 5)。将 CRISPR 体系相关试剂置于离心管盖内,待 RPA 扩增完成后,再通过离心与扩增后的溶液相混合。该方法可在 25 min 内实现牛肉中单增李斯特菌的灵敏检测,检测限为 4.4 CFU/g。然而,此类方法需要额外的离心步骤实现液体转移,增加了检测的繁琐性。Lin 等^[61]研究发现,在反应体系中添加黏性较大的丙三醇可延缓 RPA 扩增体系与 CRISPR 检测体系之间相互扩散,从而无须离心即可实现非洲猪瘟病毒等目标物的“一管式”检测。相比未添加丙三醇方法的检测灵敏度提高了 100 倍。近期,Hu 等^[62]提出了光控 CRISPR/Cas12a 反应的新型检测模式。首先通过设计 6-硝基嘧啶氧基甲基笼化的 crRNA 沉默 CRISPR/Cas12a 活性。当 RPA 扩增完毕后,再通过紫外光诱导 crRNA 的脱笼化来恢复 CRISPR/Cas12a 的切割活性,从而避免了核酸扩增和 CRISPR/Cas12a 反应之间的相互影响。以上研究结果为食品安全领域新型“一管式”CRISPR 检测方法的开发提供了新思路。

虽然以上技术的发展有效降低了核酸扩增带来的气溶胶污染问题,但“RPA+CRISPR”的“一管式”检测策略在一定程度上牺牲了预扩增和检测的最佳性能^[63]。若要从本质上解决气溶胶污染,简化操作过程,免扩增检测是最为有效的解决方式。为实现免扩增检测,关键是提高 CRISPR 的检测灵敏度,目前的研究进展主要包括以下几个方面:1) crRNA 的工程化改造或多路复用。Nguyen 等^[64]研究发现,在 crRNA 的 3' 端延伸 1 段 DNA 或 RNA 可显著提高 LbCas12a 的反式切割活性,提高

检测灵敏度。除工程化改造 crRNA 之外,Zeng 等^[65]设计 4 段不同 crRNA 序列同时识别同一目标物的不用位点,在不同组合条件下,可将检测灵敏度提高 6~64 倍。2)切割底物的改造。例如有研究发现,相比线性 ssDNA 底物,Cas12a 蛋白对发夹 DNA 的反式切割效率更高。当以发夹 DNA 作为信号标签时,方法的检测灵敏度显著提高^[66]。3)结合纳米材料提高检测性能。纳米材料具有极为优异的物理和化学性质,具有信号放大的潜力,将其引入 CRISPR 检测体系有望进一步提升检测灵敏

度,助力实现超灵敏检测。4)结合数字液滴等信号放大技术。CRISPR/Cas 方法通常通过测量切割反应所累积的荧光信号实现检测。当将反应体系缩小至 nL 及以下时,可有效提高荧光分子的相对浓度,从而放大检测信号,提高检测灵敏度^[63]。5)引入级联反应等信号放大方法。例如,Zhang 等^[67]将 CRISPR 方法与 DNA 步行器(DNA walker)相结合开发了一种级联放大方法,可实现鼠伤寒沙门氏菌的灵敏检测,检测限达到 5 CFU/mL。

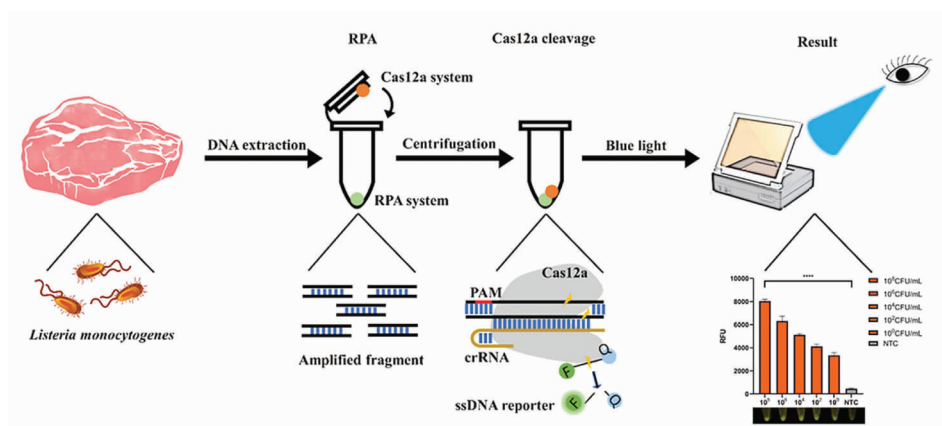


图5 基于 RPA 扩增和 CRISPR/Cas12 系统的“一管式”方法检测单增李斯特菌原理图^[60]
Fig.5 Illustration of the one-pot strategy based on RPA amplification and CRISPR/Cas12a for *Listeria monocytogenes* detection^[60]

3.3 多重检测

食品中往往存在多种有害物质,实现多种目标物的同时检测将有效提升检测效率,缩短检测周期,降低检测成本。由于 Cas 效应蛋白酶切荧光探针的单一性和非特异性,其在多重检测领域的应用备受挑战。近年来,具有不同核苷酸切割偏好的 Cas 蛋白被陆续发现,这为 CRISPR/Cas 多重检测技术的发展奠定了基础。2018 年,Gootenberg 等^[68]提出了利用 4 种荧光报告分子和 Cas 蛋白(LwaCas13a、PsmCas13b、CcaCas13b 和 AsCas12a)实现四重检测的概念,这为 CRISPR/Cas 技术应用于食品安全多重检测,提供了理论指导。除此之外,多通道微流控技术的发展也为实现 CRISPR 多重检测提供了新思路。通过合理设计微流控芯片,划分多个反应通道,可在空间维度上实现多重检测。例如,Xing 等^[69]报道了一种基于 CRISPR/Cas12a 和手指驱动的微流控芯片多重检测食源性

致病菌的生物传感方法。通过合理设计反应室和通道,该方法可在 1 h 内实现对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、鼠伤寒沙门氏菌等 7 种食源性致病菌的多重检测,检测限低于 500 CFU/mL。Xiang 等^[70]利用压力驱动的多通道微流控芯片实现 6 种真菌毒素的同时检测(图 6)。结合 CRISPR/Cas12a 的高效切割和光子晶体的荧光增强效应,该方法的检测限可低至 fg/mL。基于 Cas 蛋白反式切割差异的多重检测技术受限于 Cas 蛋白的种类,目前仅有少量具有不同切割偏好的 Cas 蛋白被研究报道,且可能存在一定的交叉反应。而多通道微流控技术在一定程度上拓展了 CRISPR/Cas 系统在多重检测领域的应用范围,其自动化程度较高,所需样品体积小,操作简便,而且封闭的反应环境可降低污染。目前其研究主要集中在生物医学领域,在食品检测领域的应用相对较少。如何将现有的 CRISPR 检测

方法与适宜的微流控技术相结合,并提高自动化水平和检测性能亟需解决。此外,鉴于食品基质的

复杂性,后续研究也需考虑将食品前处理等步骤整合至微流控芯片中,提高集成化水平。

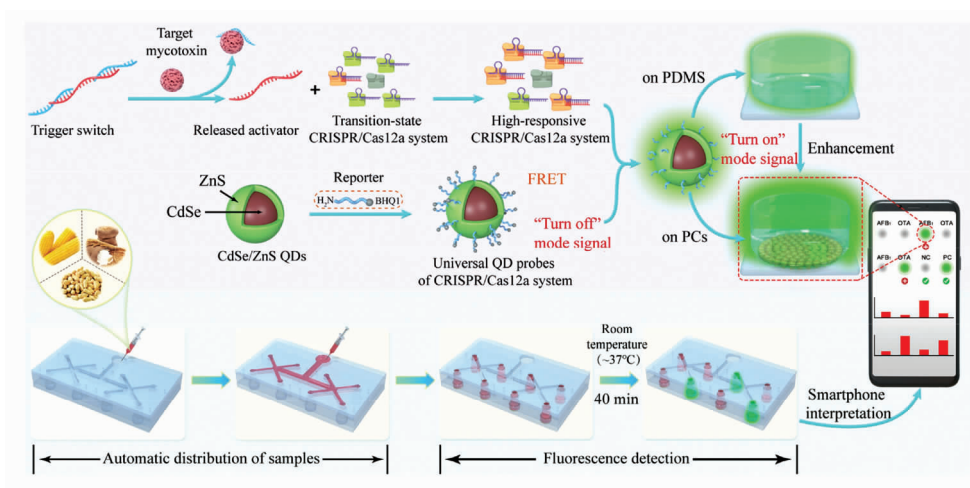


图 6 基于压力驱动的四通道微流控芯片检测 6 种真菌毒素原理图^[70]

Fig.6 Illustration of the pressure-driven eight-channel microfluidic chip for the detection of six mycotoxins^[70]

3.4 非核酸靶标检测

食品中含有的有害物种类较多,除食源性致病菌、病毒等含核酸的物质之外,重金属、毒素、农药残留等非核酸物质的检测也至关重要。由于 CRISPR/Cas 的内在识别机制无法直接检测非核酸物质,因此,尽管 CRISPR/Cas 检测技术已经得到了飞速发展,但大部分方法仍是针对核酸靶标,对非核酸靶标的检测尚处于起步阶段。非核酸靶标在原则上需要通过一些生物转换元件将目标物存在的信息转化为核酸信号才能被 CRISPR/Cas 系统识别。这些生物转换元件包括适配体、抗体、DNAzyme 等^[71]。其中,以适配体为媒介将识别非核酸靶标的行为转导为 Cas 蛋白的切割信号是最常见的检测模式。例如,Hu 等^[72]提出了一种适配体介导的生物分析方法,检测鱼中的卡那霉素(图 7)。该方法利用适配体“锁住”CRISPR/Cas12a 系统的激活序列,沉默 Cas12a 蛋白的切割活性。而当卡那霉素存在时,其特异性结合适配体,从而释放激活序列,导致铈标记的信号标签被非特异性切割,释放铈元素。然后通过磁分离技术捕获分离未切割的信号标签后,利用电感耦合等离子体质谱检测清液中的铈元素,即可实现卡那霉素的定量检测。该方法检测时间在 30 min 以内,检测限低至 4.06 pmol/L。然而适配体在“锁住”激活序列

的同时,其识别和结合目标物的能力可能受到抑制。为弥补这一不足,Zhou 等^[73]设计了 1 段包含适配体序列和 CRISPR/Cas14a 系统激活序列的双嵌段 ssDNA (Aptavator)。在缺乏目标物的情况下,Aptavator 激活 Cas14a 的反式切割活性,使其非特异性切割荧光探针,产生荧光信号;而在目标物存在时,Aptavator 结合目标物并发生构象改变,Cas14a 的切割活性被抑制。通过合理设计不同 Aptavator,该方法具备一定的通用性,可检测包括黄曲霉毒素 B₁ 在内的不同有害物,检测限低至 nmol/L 级。

以上技术的发展证实了 CRISPR/Cas 技术检测非核酸靶标的能力。然而,CRISPR/Cas 系统需由核酸序列激活切割活性的局限性,使其需要借助功能性核酸(如适配体、DNAzyme)等生物转换元件,才能实现非核酸物质的检测。然而,目前仍有部分小分子缺乏相应的生物转换元件,导致方法的应用范围受限。此外,与检测核酸靶标类似,CRISPR 技术检测非核酸靶标也同样存在前处理复杂,灵敏度有待提升,多重检测备受挑战等不足。因此,未来仍需通过创新前处理技术,结合微流控、人工智能、纳米技术和生物技术等各种技术手段全面提高检测性能。

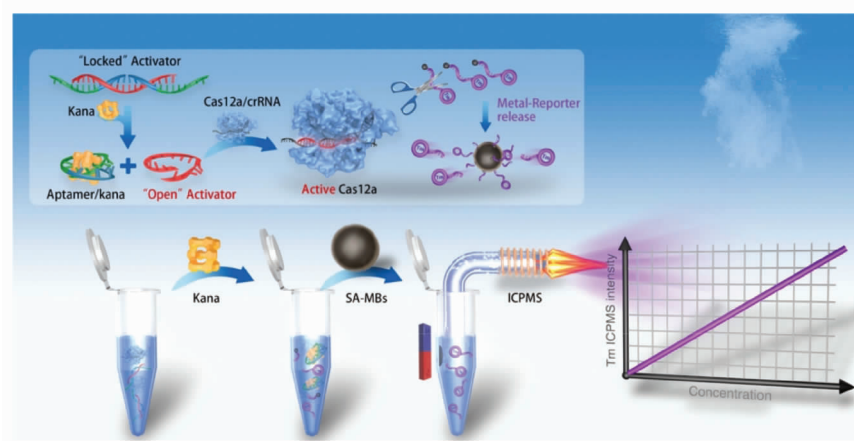


图7 CRISPR/Cas12a 系统检测检测卡那霉素原理图^[72]

Fig.7 Illustration of the CRISPR/Cas12a system for kanamycin detection^[72]

3.5 现场检测

食品供应链较为复杂,食源性致病菌等有害物可在养殖、加工、运输等各个环节污染食品。因此,开发可现场使用的“即时检测”(Point-of-care testing, POCT)技术以实现食品质量安全的全过程监控显得尤为重要,这也是食品安全检测领域的发展趋势。

根据 WHO 对 POCT 的定义,其需要满足“ASSURED”标准,即价格合理(Affordable)、灵敏度高(Sensitive)、特异性好(Specificity)、操作简单(User-friendly)、可靠性好(Robust)、无需仪器(Equipment-free)和易获取(Delivered)^[74]。侧流层析

技术(Lateral flow assay, LFA)是目前唯一发展较为成熟的、满足“ASSURED”标准中大部分要求的快速诊断技术^[75]。因此,将 CRISPR 技术与 LFA 技术相结合有望提高 CRISPR/Cas 检测方法的现场应用能力。Qian 等^[76]开发了 1 种基于 CRISPR/Cas12a 的便携式 LFA 检测平台,可在 1 h 内实现金黄色葡萄球菌的检测(图 8)。Wang 等^[77]通过在 LFA 试纸条表面设计 2 条检测线,并结合 CRISPR/Cas9 系统实现了大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的同时检测。相较于传统的 CRISPR 检测方法,CRISPR-LFA 操作相对比较简单,而且无需昂贵仪器。然而,与 SHERLOCK、HOLMES 和 DE-

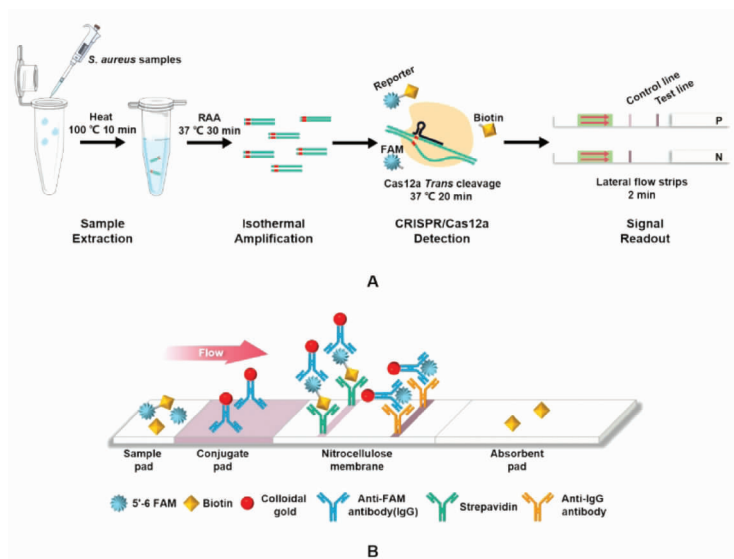


图8 基于 CRISPR/Cas12 的便携式 LFA 试纸条检测金黄色葡萄球菌原理图^[76]

Fig.8 Illustration of the portable CRISPR/Cas12a-based LFA platform for the sensitive detection of *Staphylococcus aureus*^[76]

TECTR 等常规 CRISPR 检测技术相比,滤纸上的反应效率较低,往往需要依靠功能性材料放大信号,提高检测灵敏度。此外,目前大部分 CRISPR-LFA 联用技术存在的另一个共同问题是,LFA 试纸条仅作为产生信号的载体,样品前处理和 CRISPR 切割等反应需要独立完成,检测的集成度和自动化水平相对较低。微流控芯片可在一定程度上弥补这些不足。例如,Qian 等^[78]利用 MNPs 分离、纯化目标核酸,并将其与 LAMP 扩增和 CRISPR 检测集成于微流控芯片中,可在 60 min 内实现对副溶血弧菌和沙门氏菌的同时检测。总体而言,依靠 LFA 和微流控技术,CRISPR 的现场检测能力得到了一定提高。而大部分方法目前仍停留在概念验证阶段,其实际应用能力仍有待进一步考察。

4 结论与展望

在过去几年里,CRISPR 技术在食品安全快速检测领域的应用得到了快速发展。随着 Cas9、Cas12、Cas13 和 Cas14 等各种 Cas 效应蛋白研究应用的不断深入,结合纳米材料、微流控技术、级联放大反应、LFA 等技术,各种基于 CRISPR/Cas 系统的生物传感器被广泛研究报道。检测靶标也从传统的核酸物质拓展至重金属、农兽药残留、真菌毒素等非核酸小分子物质(表 2)。其作为食品安全快速检测领域的一项新兴技术,发展潜力较大,在检测速度、特异性等方面具有一定优势,可在一定程度上弥补现有检测方法的不足。

然而,CRISPR/Cas 生物传感技术在未来发展过程中仍面临一些挑战,未来研究需着重解决的问题包括:1)提高检测灵敏度。虽然 CRISPR/Cas 系统具有内在的酶放大效应,但是信号放大效果有限。以 CRISPR/Cas12a 为例,检测限通常在 pmol/L 级,很难实现超灵敏检测。目前常规方法是利用核酸扩增技术提高灵敏度,而核酸扩增技术的引入可能会带来扩增子污染等问题,同时也增加了操作的繁琐性。因此,未来可通过结合高性能纳米材料、数字液滴等更为有效的信号放大技术实现免扩增超灵敏检测。2)简化样品前处理。目前,过度关注 CRISPR/Cas 检测技术的创新开发,对与之配套的样品前处理技术缺乏关注,导致检

测方法的实际应用能力不足。虽然很多检测方法声称便携性较高,具有现场应用能力,但样品前处理仍旧是传统的实验室处理方法,从检测全过程来看,实际应用性有待商榷。因此,亟需开发与 CRISPR/Cas 快速检测技术相匹配的高效样品前处理技术。3)提高便携性。通过将 CRISPR 技术与 LFA、微流控、便携式检测仪器等相结合,已经在一定程度上提高了 CRISPR/Cas 传感方法的便携性,而目前仍停留在概念验证阶段,未来还需从实际需求等出发,力争使 CRISPR/Cas 传感技术从基础科研走向市场应用。随着未来研究的不断深入,相信 CRISPR/Cas 技术将在食品安全检测领域发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Food safety [EB/OL]. (2023-07-14) [2023-09-26]. https://www.who.int/zh/health-topics/food-safety#tab=tab_1.
- [2] 国家发展和改革委员会. 中华人民共和国国民经济和社会发展第十四个五年规划和 2035 年远景目标纲要 [EB/OL]. (2021-03-23) [2023-09-26]. https://www.ndrc.gov.cn/xxgk/zc/fb/ghwb/202103/t20210323_1270124.html. National Development and Reform Commission. Outline of the 14th Five-Year Plan (2021-2025) for National Economic and Social Development and Vision 2035 of the People's Republic of China [EB/OL]. (2021-03-23) [2023-09-26]. https://www.ndrc.gov.cn/xxgk/zc/fb/ghwb/202103/t20210323_1270124.html.
- [3] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [4] 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.
- [5] 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): 436-439.
- [6] 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.
- [7] XU Y Y, LI Z J. CRISPR–Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy [J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2020, 18(1): 2401–2415.
- [8] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA–guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331–338.
- [9] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(1): 172.
- [10] KOONIN E V, WOLF Y I. Evolution of the CRISPR–Cas adaptive immunity systems in prokaryotes: Models and observations on virus–host coevolution[J]. *Molecular Biosystems*, 2015, 11(1): 20–27.
- [11] WENG Z, YOU Z, YANG J, et al. CRISPR–Cas biochemistry and CRISPR–based molecular diagnostics[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(17): e202214987.
- [12] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans–encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [13] 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.
- [14] FONFARA I, RICHTER H, BRATOVIC M, et al. The CRISPR–associated DNA–cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA [J]. *Nature*, 2016, 532(7600): 517–521.
- [15] FU R J, WANG Y W, LIU Y L, et al. CRISPR–Cas12a based fluorescence assay for organophosphorus pesticides in agricultural products[J]. *Food Chemistry*, 2022, 387(8): 132919.
- [16] YAO X J, YANG Q L, WANG Y F, et al. Dual–enzyme–based signal–amplified aptasensor for zearalenone detection by using CRISPR–Cas12a and Nt. AlwI[J]. *Foods*, 2022, 11(3): 487.
- [17] MELIAWATI M, SCHILLING C, SCHMID J. Recent advances of Cas12a applications in bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(8): 2981–2990.
- [18] JIANG Y, QIAN F H, YANG J J, et al. CRISPR–Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 15179.
- [19] 林冬媛, 谢龙飞, 梁玮珩, 等. CRISPR–Cas 系统检测病原菌的研究进展[J]. *中国动物传染病学报*, 2024, 32(5): 202–212.
- LIN D Y, XIE L F, LIANG W H, et al. Research progress of CRISPR –Cas system in detection of pathogenic bacteria [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2024, 32(5): 202–212.
- [20] TONG H W, YANG H. Engineered Cas13 variants with minimal collateral RNA targeting [J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 41(1): 29–30.
- [21] 张婧, 罗佳豪, 赵奕君, 等. CRISPR–Cas13a 系统用于肿瘤诊断与治疗的进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(6): 2079–2086.
- ZHANG J, LUO J H, ZHAO Y J, et al. Advances of using CRISPR–Cas13a system for tumor diagnosis and treatment[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(6): 2079–2086.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] TAKEDA S, NAKAGAWA R, OKAZAKI S, et al. Structure of the miniature type V–F CRISPR–Cas effector enzyme[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(3): 558–570.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] GE X L, MENG T, TAN X, et al. Cas14a1–mediated nucleic acid detection platform for pathogens [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 189(17):

- 113350.
- [28] 杨欢煜, 沈宝星, 杨雪娇, 等. 纳米材料在食源性致病菌检测的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(19): 6320–6326.
- YANG X Y, SHEN B X, YANG X J, et al. Recent advances in detection for foodborne pathogens with nanomaterials[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(19): 6320–6326.
- [29] MAHMOUDI S, POURAKBARI B, MORADZADEH M, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* and *Shigella* spp. among children with gastroenteritis in an Iranian referral hospital[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 109: 45–48.
- [30] 刘鑫, 李蔚然, 王丽佳, 等. 铜基靶向纳米粒子用于食源性致病菌的检测及灭活[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(12): 166–172.
- LIU X, LI W R, WANG L J, et al. Synthesis of copper-based targeted nanoparticles for the detection and inactivation of foodborne pathogens[J]. Food Research and Development, 2023, 44(12): 166–172.
- [31] 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.
- [32] 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(1): 123186.
- [33] CAI Q Q, WANG R, QIAO Z H, et al. Single–digit *Salmonella* detection with the naked eye using bio–barcode immunoassay coupled with recombinase polymerase amplification and a CRISPR–Cas12a system[J]. Analyst, 2021, 146(17): 5271–5279.
- [34] YU Y, LI W H, GU X Z, et al. Inhibition of CRISPR–Cas12a trans–cleavage by lead (II)–induced G–quadruplex and its analytical application[J]. Food Chemistry, 2022, 378(5): 131802.
- [35] LI Y, YANG F, YUAN R, et al. Electrochemiluminescence covalent organic framework coupling with CRISPR/Cas12a–mediated biosensor for pesticide residue detection[J]. Food Chemistry, 2022, 389(5): 133049.
- [36] CHEN Y J, WU H, QIAN S W J, et al. Applying CRISPR/Cas system as a signal enhancer for DNAzyme–based lead ion detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2022, 1192: 339356.
- [37] DOWGIALLO A M, GUENTHER D A. Determination of the limit of detection of multiple pesticides utilizing gold nanoparticles and surface–enhanced Raman spectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(46): 12642–12651.
- [38] KIM K H, KABIR E, JAHAN S A. Exposure to pesticides and the associated human health effects[J]. Science of The Total Environment, 2017, 575(1): 525–535.
- [39] YAN C, SHI G, CHEN J H. Fluorescent detection of two pesticides based on CRISPR–Cas12a and its application for the construction of four molecular logic gates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(39): 12700–12707.
- [40] XU D, XUE M Y, SHEN Z, et al. Phytotoxic secondary metabolites from fungi[J]. Toxins, 2021, 13(4): 261.
- [41] CHERKANI–HASSANI A, GHANNAME I, ZINE–DINE A, et al. Aflatoxin M1 prevalence in breast milk in Morocco: Associated factors and health risk assessment of newborns "CONTAMILK study" [J]. Toxicon, 2020, 187: 203–208.
- [42] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中真菌毒素限量: GB 2761–2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 12.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. Maximum levels of mycotoxin in foods: GB 2761–2017 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017: 12.
- [43] LIN X F, LI C X, MENG X Y, et al. CRISPR–Cas12a–mediated luminescence resonance energy transfer aptasensing platform for deoxynivalenol using gold nanoparticle–decorated Ti₃C₂T_x MXene as the enhanced quencher[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 433(1): 128750.
- [44] HANG X M, ZHAO K R, WANG H Y, et al. Exonuclease III–assisted CRISPR/Cas12a electrochemiluminescence biosensor for sub–femtomolar mercury ions determination[J]. Sensors and Actuators B–Chemical, 2022, 368: 132208.
- [45] 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(5): 130906.
- [46] WU Z H, SUN D W, PU H B, et al. A novel

- fluorescence biosensor based on CRISPR/Cas12a integrated MXenes for detecting Aflatoxin B₁[J]. *Talanta*, 2023, 252(18): 123773.
- [47] 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.
- [48] MAO Z F, WANG X J, CHEN R P, et al. Up-conversion-mediated CRISPR-Cas12a biosensing for sensitive detection of Ochratoxin A[J]. *Talanta*, 2022, 242: 123232.
- [49] LIU Y L, WANG Y W, MA L R, et al. A CRISPR/Cas12a-based photothermal platform for the portable detection of citrus-associated *Alternaria* genes using a thermometer[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 222 (Part B): 2661-2669.
- [50] CHEN Z B, MA L, BU S J, et al. CRISPR/Cas12a and immuno-RCA based electrochemical biosensor for detecting pathogenic bacteria[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2021, 901(10): 115755.
- [51] 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.
- [52] 苏璇, 葛以跃, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a 辅助 RAA 快速检测金黄色葡萄球菌的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(3): 253-258.
- SU X, GE Y Y, ZHANG Q, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by CRISPR-Cas combined with recombinase aided amplification (RAA)[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2020, 15(3): 253-258.
- [53] WANG H Y, WU Q, ZHOU M Y, et al. Development of a CRISPR/Cas9-integrated lateral flow strip for rapid and accurate detection of *Salmonella* [J]. *Food Control*, 2022, 142(1): 109203.
- [54] 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.
- [55] 曾红棱, 张婷, 邓锐杰, 等. 基于 CRISPR-Cas13 的单增李斯特菌 RNA 快速检测方法的建立[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(5): 256-261.
- ZENG H L, ZHANG T, DENG R J, et al. Establishment of a rapid RNA detection method for *Listeria monocytogenes* based on CRISPR-Cas13[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(5): 256-261.
- [56] LI F, YE Q H, CHEN M T, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 179: 113073.
- [57] SHEN Y F, JIA F, HE Y W, et al. A CRISPR-Cas12a-powered magnetic relaxation switching biosensor for the sensitive detection of *Salmonella* [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 213(39): 114437.
- [58] ZHANG M Y, LIU C Z, SHI Y, et al. Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application[J]. *Talanta*, 2020, 214: 120818.
- [59] HE Y W, JIA F, SUN Y X, et al. An electrochemical sensing method based on CRISPR/Cas12a system and hairpin DNA probe for rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium*[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 369: 132301.
- [60] 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(Part B): 124558.
- [61] LIN M, YUE H H, TIAN T, et al. Glycerol additive boosts 100-fold sensitivity enhancement for one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(23): 8277-8284.
- [62] HU M L, LIU R H, QIU Z Q, et al. Light-start CRISPR-Cas12a reaction with caged crRNA enables rapid and sensitive nucleic acid detection[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2023, 62(23): e202300663.
- [63] LI H M, XIE Y, CHEN F M, et al. Amplification-free CRISPR/Cas detection technology: Challenges, strategies, and perspectives[J]. *Chemical Society Reviews*, 2023, 52(1): 361-382.
- [64] NGUYEN L T, SMITH B M, JAIN P K. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4906.
- [65] ZENG M C, KE Y Q, ZHUANG Z Y, et al. Har-

- nessing multiplex crRNA in the CRISPR/Cas12a system enables an amplification-free DNA diagnostic platform for ASFV detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(30): 10805–10812.
- [66] ROSSETTI M F, MERLO R, BAGHERI N, et al. Enhancement of CRISPR/Cas12a trans-cleavage activity using hairpin DNA reporters[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(14): 8377–8391.
- [67] ZHANG H J, YAO S, SHENG R, et al. A cascade amplification strategy for ultrasensitive *Salmonella typhimurium* detection based on DNA walker coupling with CRISPR-Cas12a[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, 625(8): 257–263.
- [68] 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.
- [69] XING G W, SHANG Y T, WANG X R, et al. Multiplexed detection of foodborne pathogens using one-pot CRISPR/Cas12a combined with recombinase aided amplification on a finger-actuated microfluidic biosensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 220(7811): 114885.
- [70] XIANG X R, SONG M H, XU X W, et al. Microfluidic biosensor integrated with signal transduction and enhancement mechanism for ultrasensitive noncompetitive assay of multiple mycotoxins[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(20): 7993–8001.
- [71] CHENG X K, LI Y R, KOU J, et al. Novel non-nucleic acid targets detection strategies based on CRISPR/Cas toolboxes: A review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 215: 114559.
- [72] HU J Y, SONG H J, ZHOU J, et al. Metal-tagged CRISPR/Cas12a bioassay enables ultrasensitive and highly selective evaluation of kanamycin bioaccumulation in fish samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(42): 14214–14222.
- [73] ZHOU B, YANG R L, SOHAIL M, et al. CRISPR/Cas14 provides a promising platform in facile and versatile aptasensing with improved sensitivity[J]. *Talanta*, 2023, 254: 124120.
- [74] REID R, CHATTERJEE B, DAS S J, et al. Application of aptamers as molecular recognition elements in lateral flow assays[J]. *Analytical Biochemistry*, 2020, 593: 113574.
- [75] MOUSSEAU F, FÉRAUDET TARISSE C, SIMON S, et al. Luminescent lanthanide nanoparticle-based imaging enables ultra-sensitive, quantitative and multiplexed *in vitro* lateral flow immunoassays[J]. *Nanoscale*, 2021, 13(35): 14814–14824.
- [76] QIAN J J, HUANG D, NI D S, et al. A portable CRISPR Cas12a based lateral flow platform for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* with double insurance[J]. *Food Control*, 2022, 132(6): 108485.
- [77] WANG L Y, SHEN X Y, WANG T, et al. A lateral flow strip combined with Cas9 nickase-triggered amplification reaction for dual food-borne pathogen detection[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 165(6313): 112364.
- [78] QIAN S W J, CHEN Y J, PENG C, et al. Integrated slip valve-assisted fluidic chip coupling with CRISPR/Cas12a system for nucleic acid analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1239(3): 340670.

Applications of CRISPR/Cas-Based Biosensors in Rapid Detection for Food Safety

TANG Xingyue^{1,2,3}, SHEN Yafang², SHU Zaixi^{1,3}, HUANG Aixia², LIN Feng²,
QIAO Zhaohui⁴, DAI Huang^{1,3*}, HAO Guijie^{2*}

¹College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430000

²Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Huzhou Key Laboratory of Aquatic Product Quality Improvement and Processing Technology, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001

³The Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil (Wuhan Polytechnic University), Ministry of Education, Wuhan 430023

⁴College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315800, Zhejiang

Abstract The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) system has

been widely used in the field of rapid detection for food safety, owing to its advantages of extremely high specificity, programmability and ease of operation. In recent years, the CRISPR/Cas-based biosensors have flourished and become a favored tool in the rapid detection area. In this paper, the mechanism of various Cas proteins, represented by Cas9, Cas12a, Cas13a and Cas14a, were discussed, and their application in the rapid detection of harmful substances in food (*e.g.*, foodborne pathogenic bacteria, heavy metals, pesticide residues and mycotoxins) was reviewed as well. Furthermore, current challenges and future perspectives of the CRISPR/Cas-based biosensors for food safety are emphasized. This review aims to provide useful information to help future development of novel CRISPR/Cas-based biosensors for food safety.

Keywords CRISPR/Cas; biosensor; food safety; rapid detection