

CRISPR/Cas 生物传感器检测食源性病原体的研究进展

黄璐琦¹, 孙旭飞¹, 苑宁², 范少华³, 张伟^{1,4,5*}

¹河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

²河北农业大学理工学院 河北沧州 061100

³河北软件职业技术学院 河北保定 071000

⁴河北农业大学生命科学院 河北保定 071000

⁵河北省人畜共患病原微生物分析与防控重点实验室 河北保定 071000

摘要 食源性病原体引起的食源性疾病严重威胁着人类的健康,灵敏且快速检测食源性病原体成为预防疾病发生的重要手段。生物传感器具有灵敏度高,无需富集即可实时定量,易于现场检测等优点。CRISPR/Cas 系统与生物传感器结合可提高生物传感器检测的灵敏度和准确性。本文介绍 CRISPR/Cas 系统的分类及作用机制,回顾基于 CRISPR/Cas 的各种生物传感器检测食源性病原体的方法,包括荧光传感器、电化学传感器和侧流层析试纸,分析应用不同 Cas 蛋白检测的优缺点,为食源性病原体的检测提供借鉴。

关键词 CRISPR/Cas; 生物传感器; 食源性病原体

文章编号 1009-7848(2022)10-0378-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.10.039

食源性疾病作为全球范围内的重大公共卫生问题之一,关系着人们的身体健康和生命安全。目前,引起食源性疾病的病原体包括食源性致病菌、病毒、生物毒素、药物残留、重金属、非法添加物等^[1]。据 WHO 报道,全球每年约有 6 亿人(几乎每 10 人中就有 1 人)因食用受污染的食品而患病,导致约 42 万人的死亡,造成 3 300 万健康生命年损失。各国每年用来治疗食源性疾病的费用约高达 150 亿美元^[2]。其中,食源性致病菌和病毒是造成食源性疾病的重要原因^[3-4]。常见的食源性致病菌有沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等。常见的食源性病毒有诺如病毒、轮状病毒、冠状病毒、猪瘟病毒等^[5-6]。生物传感器因具有响应时间快、成本低、不需要任何预富集步骤、可移植性和易于使用的优点,被广泛应用

于食源性病原体的检测^[7]。成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins,CRISPR/Cas)系统是于 1987 年由 Ishino 等在大肠埃希菌中首次发现的^[8]。它是由细菌进化出的一种具有免疫记忆的获得性免疫防御系统,用于抵制外源核酸及噬菌体的入侵^[9]。CRISPR/Cas 系统具有较强的核酸识别特性,近年来逐渐被用作生物传感系统研究的识别元件。本文介绍并总结 CRISPR/Cas 系统及其在食源性病原体检测中的应用。

1 CRISPR/cas 系统

近年来,由于成簇的规律间隔的短回文重复序列 CRISPR 及其相关蛋白 Cas 系统可以作为一种高效的基因组编辑工具,因此引起研究人员的关注。2019 年 12 月,CRISPR 基因编辑技术入选了 Nature 近 10 年中最具影响力的五项重大科学事件之一,并作为“变革生物技术”斩获了 2020 年诺贝尔奖^[10]。CRISPR/Cas 系统通过 Cas 效应蛋白-向导 RNA(guide RNA,gRNA)双链体进行高特异性识别活性,使 Cas 效应蛋白对靶 DNA 产生切割活性^[11],引起双链断裂(Double-stranded DNA break,DSB),进而激活细胞内源通路修复 DSB 缺

收稿日期: 2021-10-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172288, 31371772); 河北省自然科学基金重点项目(C2019204342); 河北省重点研究开发计划项目(18275501D); 中央引导地方科技发展资金项目-基础研究项目(216Z5501G); 河北省外专百人计划(360-0803-JSN-3YGS); 河北省博士后科研项目(B2021005007)

作者简介: 黄璐琦(1997—),女,硕士生

通信作者: 张伟 E-mail: zhangwei631126@163.com

口,实现对靶位点的编辑^[12]。有研究表明,CRISPR/Cas 系统分布于 47%已测序细菌和 90%已测序古细菌的基因组中,目前已知有 2 大类 6 个亚型^[13-14]。

1.1 作用机制

完整的 CRISPR 基因座包含一系列 CRISPR 阵列、CRISPR 相关 Cas 蛋白和由不同间隔区(26~72 bp)分隔的短的、高度保守的重复序列(21~48 bp)^[15-16]组成。当噬菌体或质粒等外源 DNA 入侵宿主后,细菌通过 CRISPR 序列与 Cas 蛋白的共同作用来防御噬菌体的入侵,其作用机制包括“捕获-表达-干扰”3 个阶段的免疫反应。

在捕获阶段,首次入侵的噬菌体会被保守的适应性蛋白 Cas1 和 Cas2 识别加工成短片段,通过获取入侵噬菌体的核酸序列,在一些相关效应因子或一些效应蛋白的参与下将其整合到细菌的 CRISPR 序列中,形成间隔子序列。在表达阶段,CRISPR 阵列被转录为前体 crRNA(pre-crRNA),然后被加工为成熟的 crRNA(crispr RNA)。1 类系统中,Cas6 作为一种核糖核酸内切酶可以切割 pre-crRNA 中重复序列的单个磷酸二酯键使其成为成熟的 crRNA^[17]。2 类系统的机制较为复杂多样,有些需要 RNase III 对 pre-crRNA 进行加工^[18],且这一加工过程需要反式激活 tracrRNA (trans-activating crRNA)的参与^[19];有些可以独立转录出成熟的 crRNA。在某些 V 型以及所有 VI 型系统中并未发现 tracrRNA 的存在,Cas12a 和 Cas13a 可分别通过不同的机制直接加工 pre-crRNA 形成成熟的 crRNA^[20]。在干扰阶段,效应蛋白复合物或单个的效应蛋白与 gRNA 结合形成核糖核蛋白复合物,通过特异性识别前间隔序列毗邻基序(Protospacer adjacent motif,PAM),使 gRNA 与入侵靶标碱基互补,Cas 核酸酶特异性切割外源核酸序列,从而达到防御的目的。作用原理图见图 1。

1.2 分类

随着研究人员对 CRISPR/Cas 系统的深入研究,CRISPR 系统中的各种 Cas 核酸酶相继被发现。2015 年,Makarova 等^[21]根据 CRISPR/Cas 系统中 Cas 复合体的组成与 Cas 蛋白结构特征,将 CRISPR/Cas 系统分为 2 类-5 型-18 亚类,这是首次对 CRISPR/Cas 系统进行较为明确的划分,已得

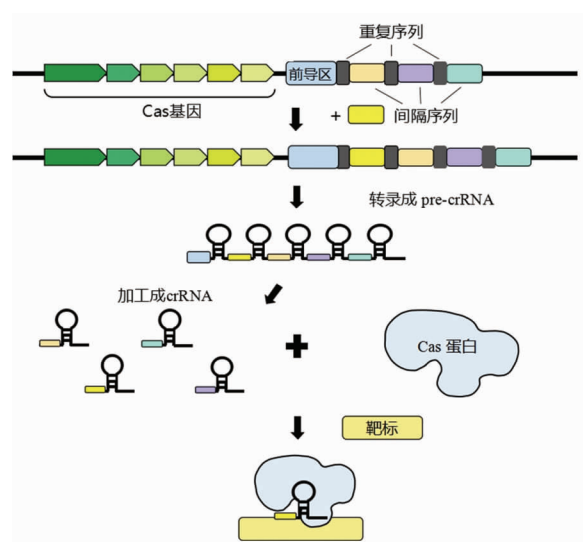


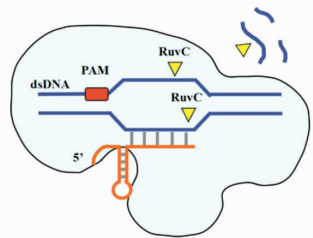
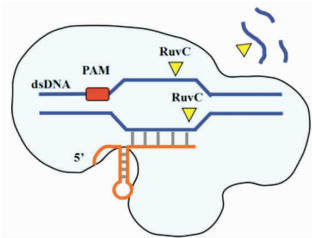
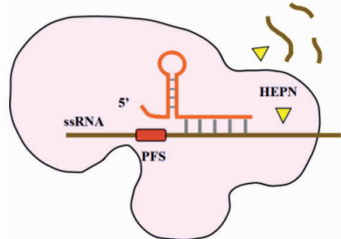
图 1 CRISPR-Cas 系统结构部件机理示意图

Fig.1 Diagrammatic illustration of mechanism of structural components of CRISPR-Cas system

到普遍认可。在此基础上,研究人员于 2016 年又发现一种新型的 CRISPR/Cas 系统,进一步对 CRISPR/Cas 家族进行补充与完善。目前,根据 CRISPR/Cas 系统参与干扰阶段的 Cas 蛋白数量分为两大类,6 个亚型,每种亚型都有标志性的 Cas 核酸酶^[22]。第 1 类包括 I、III 和 IV 型,这种类型需多种 Cas 蛋白共同参与干扰机制。第 2 类包括 II 和 V 和 VI 型,这种类型只需一个具有多个结构域,分子质量较大的蛋白参与干扰阶段^[23]。由于 2 类系统简单、高效,因此常用于生物工程和 CRISPR 诊断。目前研究最广泛的是 Cas9 系统、Cas12 系统和 Cas13 系统。不同类型 Cas 系统分类见表 1。

1.2.1 Cas9 系统 Cas9 是一种由双 RNA 引导的具有 DNA 核酸内切酶活性的效应蛋白,可以通过组氨酸-天冬氨酸-组氨酸样结构域 (His-Asn-His,HNH)和原核同源重组蛋白 Ruv C 样结构域 (Cross-over junction endodeoxyribonuclease Ruv C)诱导特定双链 DNA(dsDNA)断裂^[22,25]。2012 年,Wiedenheft 等^[26]发现从嗜热链球菌中纯化出的 Cas9 可通过 crRNA 靶向切割基因,这一发现极大地推动了研究人员对于 Cas9 系统的研究。Cas9 系统是 II 型 CRISPR/Cas 系统中最具有标志性的家族,由 crRNA、tracrRNA 和 Cas9 蛋白 3 个重要部

表1 CRISPR-2类效应核酸酶^[24,34,61]
Table 1 Class 2 CRISPR-associated effector nucleases^[24,34,61]

效应蛋白	Cas 9	Cas 12a(Cpf1)	Cas 13a(C2c2)
特征			
核酸酶类型	II-A	V-A	VI-A
靶标	dsDNA	dsDNA/ssDNA	ssRNA
pre-crRNA 加工	需要 RNase III 干预	自处理	自处理
向导 RNA	tracrRNA、crRNA	crRNA	crRNA
间隔子长度	20 nt	20 nt	28 nt
结构域	HNH、RuvC	RuvC	2×HEPN
PAM/PFS	5'-NGG-3'	5'-TTTN-3'	non-G
切割活性	顺式切割	顺式切割、反式切割	顺式切割、反式切割
切割末端	平末端	5 nt 的交错末端	-
切割位点	PAM 上游 3 个核苷酸外侧	PAM 下游靶链 23 位和非靶链 18 位	富含 U 位点
反式切割	-	非特异性 ssDNA	非特异性 ssRNA

分构成。Charpentier 和 Doudna 团队^[25]将 tracrRNA 和 crRNA 的组合命名为单一的向导 RNA (gRNA)。在基因编辑中,crRNA 和 tracrRNA 还可以人工融合产生嵌合的单链向导 RNA (sgRNA)。gRNA 与 Cas9 的结合会产生活性核糖核蛋白复合物,对靶序列的识别、切割起着至关重要的作用^[27]。

Cas9 系统的激活首先需对特异性目标进行识别,由 tracrRNA 和 crRNA 形成的 gRNA 识别靶标 PAM。PAM 最早由 Mojica 等^[28]于 2009 年提出,他们发现在原间隔子靶序列的一侧存在 2~5 nt 的保守序列,这段序列可使 CRISPR/Cas 系统区分出自己的基因组 DNA 和入侵的核酸序列^[29],在病毒入侵时加速识别^[30],促使 dsDNA 链分离,RNA-靶 DNA 杂交形成 R 环^[31]。PAM 一般存在于间隔子靶序列下游 3 nt 处,Cas9 蛋白的 PI 结构域可识别 5'-NGG-3' 的 PAM^[30]。在 CRISPR/Cas9 系统中,对 PAM 的识别会启动 dsDNA 解链,使 crRNA 链侵入并与靶碱基配对。靶标 DNA 的识别严格依赖于 DNA 靶位点下游同源 PAM 的存在,同时也需 PAM 旁边的种子序列与 gRNA 的特异性互补结

合^[32]。种子序列即 crRNA 与靶 DNA 互补的前 8~10 个碱基^[25]。有研究表明,种子序列的存在能够进一步促进 crRNA-靶 DNA 的杂交,种子序列的错配还会导致酶切割活性的丧失^[33]。在识别 PAM 区和种子序列后,crRNA 5' 末端的 20 个核苷酸通过碱基互补对目标靶序列进行捕获,形成一个 R 环结构^[34]。一旦 crRNA-DNA 杂交 R-环开始形成,Cas9 就会启动效应蛋白的酶切特性,在位于 HNH 和 RuvC 结构域的 PAM 序列上游 3 个碱基处以二价阳离子依赖的方式分别催化靶 DNA 链和非靶 DNA 链的切割,产生平的断裂 DSB 位点^[35-37]。

随着对 Cas9 研究的深入,有研究发现了 Cas9n(Cas9 nickase)^[38],它是 Cas9 变种中的一种。这种类型的 Cas9 是由在 RuvC 或 HNH 域中引入 D10A 或 H840A 沉默突变产生的^[39]。该酶可在靶标的相应链上产生切口。而当两个域都发生突变并同时失活,会形成缺乏核酸酶的另一变种 dCas9 (dead Cas9),失活的 dCas9 核酸酶只保留了与 DNA 的结合能力,可特异性地结合到靶 DNA 序列上,但不发生切割^[40]。dCas9 还与相应的转录激

活或者抑制域结合,利用 CRISPR/dCas9 系统,实现对靶标基因转录的激活或者抑制,实现基因位点的可视化成像等^[41]。

1.2.2 Cas12 系统 与 CRISPR/Cas9 类似,V 型 Cas12 蛋白也是 CRISPR 家族 2 类成员之一,这种蛋白可在 gRNA 的作用下特异性结合互补的靶单链 DNA(ssDNA)和 dsDNA^[42],激发非特异切割活性。到目前为止,已发现 Cas12 的多种亚型,有 V-A, Ve-B, Ve-C, Ve-U, 其中对 Cas12a (Cpf1)和 Cas12b(C2c1)^[43]的研究较多。

Cas12a 系统由 crRNA 与 Cas12 蛋白两部分组成。与 CRISPR/Cas9 相比,CRISPR/Cas12a 构成分子质量较小,约有 1 200 至 1 500 个氨基酸^[44]。Cas12a 效应蛋白具有一个特征的 RuvC 核酸酶结构域,同时具有 DNase 和 RNase 活性^[45]。与 Cas9 不同,Cas12a 系统中 crRNA 的形成不需要 tracrRNA 或 RNase III 的参与。pre-crRNA 由 Cas12a 自身的 RNase 结构域加工,使 Cas12 在 CRISPR 重复序列形成的发夹结构上游 4 nt 处剪切 pre-crRNA,产生中间 crRNA 分子,在体内进一步加工成约 43 nt 的成熟 crRNA^[46]。Cas12a 与成熟 crRNA 形成 Cas12a-crRNA 核糖核蛋白二元复合体,发生构象变化,表现出对 dsDNA 的切割活性。在 crRNA 的引导下,Cas12a 识别位于靶标上富含 T 的 PAM 序列与 5~8 nt 的种子序列^[47]。当 crRNA 特异性识别靶标链形成 RNA-DNA 结合体后,Cas12a 通过 RuvC 结构域中的核酸酶位点,在 PAM 序列的远端(3'方向)18 nt 与非靶标链 PAM 位点的远端(5'方向)23 nt 处对靶标链进行切割,从而形成 5 nt 突出的黏性末端。除了高特异性的 dsDNA 切割活性,Cas12a 还显示出与 crRNA/目标 DNA 形成三元复合物后持续的 Cas12 裂解活性,可以无选择地发挥 DNase 活性^[46,48],通过 RuvC 结构域裂解非特异的 ssDNA,即反式切割活性^[49]。

2015 年,Shmakov 等^[50]鉴定出一个新的 CRISPR 系统蛋白 Cas12b (又称为 C2c1)。与 Cas12a 不同,CRISPR/Cas12b 系统是由 tracrRNA 和 crRNA 组成的 gRNA 为导向的 Cas12b 蛋白核酸酶,可以识别 5'-(A)TTN 的 PAM 序列,切割双链 DNA 后产生 7 nt 突出的黏性末端^[51-52]。由于 Cas12a 仅带有用于 DNA 切割的 RuvC 结构域,因

此还可以被修饰成核酸酶失活的 Cas12a (dead Cas,dCas12a),用于基因编辑等领域。

1.2.3 Cas13 系统 2016 年,研究人员在沙氏纤毛菌 (*Leptotrichia shahii*) 中发现一种新型 2 类 VI-A 型蛋白 Cas13a(又称 C2c2)^[53]。同年,该研究团队在进行沙氏纤毛菌 C2c2(Lsh Cas13a)的体外切割试验时发现,在靶 RNA 存在的情况下,Cas13a-crRNA 复合物不仅可以切割靶 RNA,还可以非特异性地切割侧枝 ssRNA。迄今为止,CRISPR/Cas13 是目前 CRISPR/Cas 家族中除第 1 类 III 型外唯一靶向 RNA,且具有非特异性切割活性的 CRISPR/Cas 系统。已发现的 Cas13 蛋白有 4 种亚型^[54],即 VI-A(Cas13a/C2c2)、VI-B(Cas13b)、VI-C(Cas13c)和 VI-D(Cas13d)。Cas13a(C2c2)亚型是第 1 个广为人知且具有典型特征的 Cas13 蛋白。

Cas13a 系统是由 crRNA 与 Cas13 蛋白两部分构成。crRNA 是由 pre-crRNA 在 Cas13 的单独作用下形成的,不需要 traRNA 的参与。Cas13a 蛋白是由 1 个识别瓣叶 (Recognition lobe, REC) 和 1 个核酸酶瓣叶 (Nuclease lobe, NUC) 组成。其中,组成 REC 叶片的 Helical-1 结构域负责切割 pre-crRNA 形成成熟的 crRNA,组成 NUC 叶片的 2 个高等真核生物和原核生物核苷酸结合域 (Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding, HEPN) 负责诱导 Cas13a 发生协同构象变化,使无酶切活性状态的 Cas13a-crRNA 复合物表现出 RNase 活性,特异性地对靶向 RNA 进行顺式切割^[55-56]。Cas13a 蛋白一旦被靶 RNA 活化,也会展现出针对 ssRNA 的“附带切割”能力,裂解附近的其它 ssRNA^[57-58]。一直以来,由于不涉及 dsDNA 解链的关系,靶标不包含 PAM 序列。然而,当成熟的 crRNA 与 Cas13 蛋白结合形成 Cas13-crRNA 复合物后,该复合物会在靶 RNA 链 3' 端识别与 PAM 类似的前间隔序列侧翼位点 (Protospacer-flanking site, PFS),激活 Cas13 蛋白在 crRNA 互补位置外的侧翼序列附近切割靶 RNA。据 Abudayyeh 等^[53]发现,Cas13a 复合物更偏向于在富 U 区进行非特异性切割。

为了扩展 CRISPR/Cas13a 系统在 RNA 研究上的应用,研究人员对 Cas13a 蛋白的 HEPN 结构

域进行突变失活,可以产生无 RNA 核酸酶活性的 Cas13a (dead Cas13a, dCas13a)。dCas13a 能够特异性识别和结合靶向 RNA 而不进行切割,通过与各种不同功能性蛋白进行融合,可实现 RNA 从编辑到修改再到可视化的各种操作^[39]。2017年,Smargon 等^[59]还发现另一种同样具有靶向和编辑 RNA 能力的蛋白 Cas13b。与 Cas13a 不同的是, Cas13b 发挥作用需要靶 RNA 的两端均存在 PFS 结构,这增加了该系统对 ssRNA 切割的限制条件^[60]。

2 CRISPR-传感器在食源性病原体检测中的应用

近年来,基于 CRISPR/Cas 的技术已广泛应用于基因组编辑、基因转录调控、表观遗传工程和许多其它领域。CRISPR/Cas 系统之间的多样性和 Cas 蛋白的特异性,使 CRISPR/Cas 系统被用作生物传感器和生物传感系统开发中的识别元件。生物传感器虽具有灵敏、灵活、低成本和快速等优点,但也存在一些缺点,如特异性差。CRISPR/Cas 系统具有可编程、高特异性的诱导切割活性,这为识别目标提供了机会,可满足生物传感器理想条件下对目标的检测。将 CRISPR/Cas 系统与生物传感器结合,可利用其独一无二的识别与切割活性,满足对目标高特异、高灵敏的检测。目前有研究人员对基于 CRISPR/Cas 的生物传感系统进行研究和开发^[61]。特别是 CRISPR/Cas 技术对核酸识别的特异性与 gRNA 设计的便捷性,使得该系统在核酸检测方面展现出巨大的发展潜力^[62]。

2.1 基于 Cas9 系统检测食源性病原体

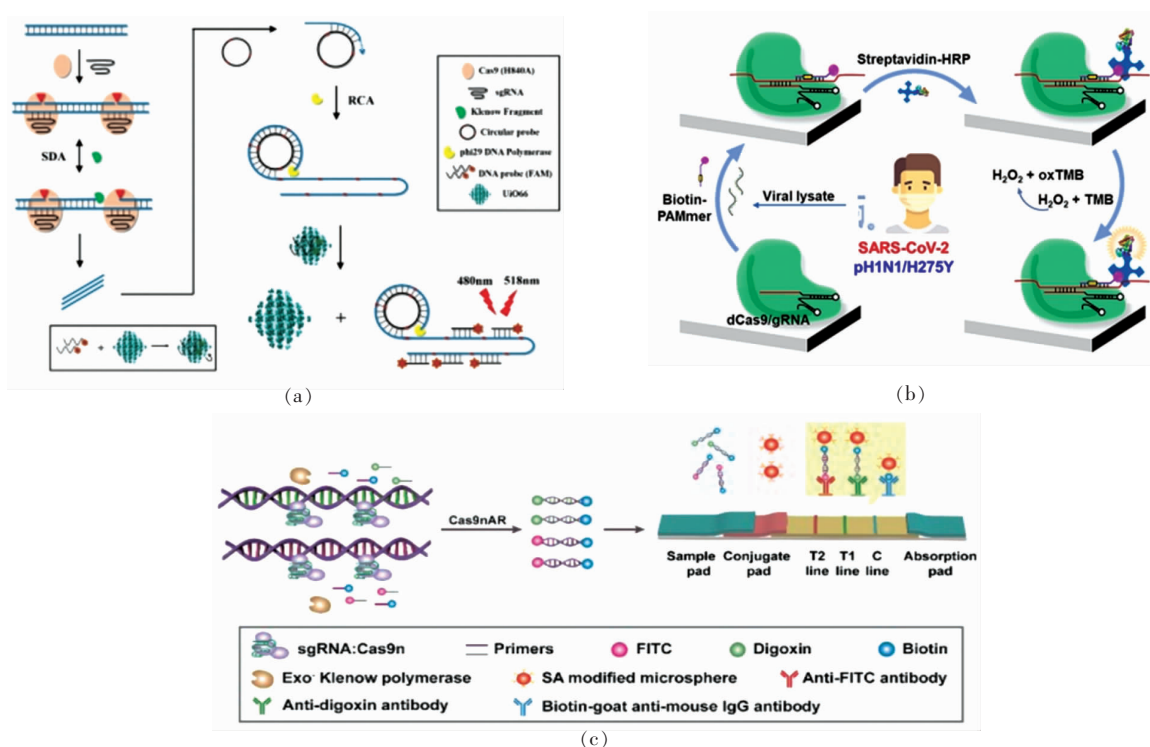
基于 CRISPR/Cas9 系统的检测大多是利用其对靶标的识别与切割作用。Sun 等^[63]开发一种由 Cas9 触发的两步等温扩增方法,用于大肠杆菌 O157:H7 的高灵敏检测,如图 2a 所示。利用 Cas9 (H840A) 对特异链的切割来取代一些切割内切酶。将两个 Cas9 (H840A):sgRNA 复合物识别并切割靶 DNA 的一条链缺口,触发新链在缺口处延伸并置换原始 DNA 链,进行 SDA 反应。SDA 的产物进一步 RCA 反应以产生 ssDNA 与荧光探针杂交。使荧光探针离开携带有猝灭基团的 Uio66,导致荧光产生。通过荧光强度来定量检测目标 DNA。该方法能够检测浓度为 40 CFU/mL 的大肠

杆菌 O157:H7。Wang 等^[64]开发一种简单巧妙的 Cas9n 的扩增反应 (Cas9nAR)。利用 Cas9n 的特异性识别能力获得 ssDNA, 然后进行多次引发、延伸、切割和置换反应,并用 SYBR Green I 染料实时监测 Cas9nAR 的进程,用强大的荧光信号反映 dsDNA 扩增产物的量。该方法将鼠伤寒沙门氏菌作为靶标,通过高效的指数扩增机制,在 60 min 显示 2 copy/反应的检测限。除了以荧光作为检测信号外,其它可视化手段在 CRISPR/Cas9 的基础上也显示出良好的应用效果。Wang 等^[65]以 Cas9n 触发的等温 DNA 扩增技术为基础,以侧向流动试纸为检测平台,利用特异性 sgRNAs 和引物,建立一种同时对鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的检测方法,如图 2b 所示。分别用地高辛/生物素和 FITC/生物素标记对基因组 DNA 扩增子进行双标记,使其直接显示在一个简单的横向流动条上。该方法利用试纸平台的扩展性,实现多重目标的检测,具有较高的特异性和敏感性。对细菌的检测限为 100 CFU/mL,整个分析从样品制备到读出结果可在 3 h 内完成。Moon 等^[66]针对新型冠状病毒报道了一种基于 CRISPR/dCas9 系统的比色法,如图 2c 所示。该方法设计了能够与新型冠状病毒靶 RNA 杂交的 PAM-mer 序列,并在其 3' 端设置生物素,以允许其与链霉亲和素-辣根过氧化物酶结合,在微孔板上通过氧化四甲基联苯 (TMB) 胺来诱导颜色变化,成功实现了病毒的可视化检测。

尽管 CRISPR/Cas9 系统已被应用于基因编辑与检测,还需要 2 个连续碱基为 G 的 PAM 序列对靶标进行识别。这类位点约占基因组的 9.9%^[67],在很大程度上限制了 CRISPR/Cas9 的应用范围。此外,CRISPR/Cas9 系统在使用时可能产生严重的脱靶效应。哈佛大学实验室发现 Cas9 的脱靶效率最高可达 84%^[68],这也是限制其应用的一大难题^[69]。

2.2 基于 Cas12 系统检测食源性病原体

基于 CRISPR/Cas12 的生物传感器,利用 Cas-crRNA 对靶序列的识别以及对非特异性 ssDNA (用作报告子) 的切割作用,使读出信号发生变化。目前,CRISPR/Cas12 系统与荧光技术相结合被用于核酸检测,显示出高灵敏度、强特异性、快速的优势,具有良好的应用前景。

图 2 基于 CRISPR-Cas9 系统的生物传感分析^[63, 65-66]Fig.2 Biosensing assays based on CRISPR-Cas9 system^[63, 65-66]

Li 等^[70]利用 Cas12a 的反式切割活性,与扩增技术结合,建立了 CRISPR/Cas12a 的荧光检测平台,称为“Cas12aFDet”。该检测平台可降低被气溶胶污染的风险,将 Cas 体系预先加在试管盖中,在扩增反应后,密封的反应管通过离心将 PCR/RAA 反应与 Cas12a 介导的切割反应相结合,利用 Cas12a 的裂解活性对报告探针进行切割,根据荧光强度在 15 min 内即可完成对单增李斯特氏菌的检测。Zhang 等^[71]发现 CRISPR/Cas12a 系统还可以识别新的 PAM 序列(UUUN),在此基础上,通过设计 gRNA 即可实现对副溶血性弧菌的检测。该方法同样为避免气溶胶污染将 Cas 体系与扩增体系预先加在同一试管中,在自制的紫外装置中可达到 1.02×10^2 拷贝/ μL 的检测限。如图 3a 所示,Wang 等^[72]同样将 PCR 与 Cas12 体系集成在特殊的单个毛细管中,建立“CRISPCR”方法来检测大肠杆菌。这种单个毛细管不仅可以解决 CRISPR/Cas 核酸酶的不耐热问题,还使反应在不到 10 min 内获得稳定的荧光信号。除与 PCR 方法结合外,近年来快速发展的等温扩增方式也被应用于与

CRISPR 系统相结合。Liu 等^[73]将 RPA 等温扩增技术与 CRISPR/Cas12a 相结合,建立“RPA-Cas12a-FS”检测平台用于检测大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌。该系统可在 37 °C 下 45 min 内特异性检测低至 10 拷贝的目标基因水平。Mukama 等^[74]也将 CRISPR/Cas12 和 LAMP 技术结合,开发一种超灵敏的特异性侧向流动生物传感器(LFB),用于铜绿假单胞菌的检测,如图 3b 所示。该方法在纯样品和复杂样品中均显示单拷贝的灵敏性和高特异性。LFB 检测试纸使用简单,检测快速,便携廉价。Li 等^[75]在建立“Cas12aFDet”后,同年,进一步利用 Cas12a 的侧裂解诱导信号变化的特性,将其引入电化学传感平台,如图 3c 所示。通过 RAA 扩增,用修饰在电极上的 MB-ssDNA 代替荧光信号标记的信号探针,对目标引入前、后的 MB 信号进行监测,检测限低至 0.68 amol/L。

针对病毒的检测,He 等^[76]通过编程 crRNA,使 CRISPR/Cas12a 能够在识别靶标 DNA 链后,切割荧光探针,达到对非洲猪瘟病毒的检测。在没有

核酸扩增的情况下,2 h 内可获得 1 pmol/L 的检测极限,延长反应时间还可使检测限达 fmol/L 水平。彭小唤^[77]应用改良的 Cas12a 检测非洲猪瘟病毒,可在 1 h 内将检测限提高至 amol/L 水平。针对 2019 年爆发的新型冠状病毒,Guo 等^[78]构建了基于 RT-RAA 的 CRISPR 系统 SARS-CoV-2 的检测平台,检出限为 1×10^4 拷贝,显示出良好的特异性。如图 3d 所示,Chen 等^[79]报道了一种基于 LAMP 和 CRISPR/Cas12a 技术的无污染目视检测 SARS-CoV-2 的方法,通过智能手机和便携式 3D 打印仪器,产生的荧光不需要任何专用仪器就可用肉眼看到,整个扩增和检测过程在 40 min 内完

成,达到 20 拷贝的高灵敏检测。Ali 等^[80]还将 RT-LAMP、CRISPR-Cas12 组成的“iSCAN”平台与侧流层析技术结合,显示出与荧光检测相同的结果,实现了对新型冠状病毒快速灵敏检测。

基于 CRISPR/Cas12a 的生物传感器与其它检测方法相比,虽具有灵敏度更高,特异性更强的优点,但仍有一定的局限性,如不同的扩增技术决定检测时间的长短;DNA 扩增产物转移过程中有气溶胶污染的风险。尽管有些研究将扩增过程与 CRISPR 体系集成于单试管内进行,研究人员仍需考虑扩增体系和 Cas12a 切割体系的相容性对试验结果的影响。

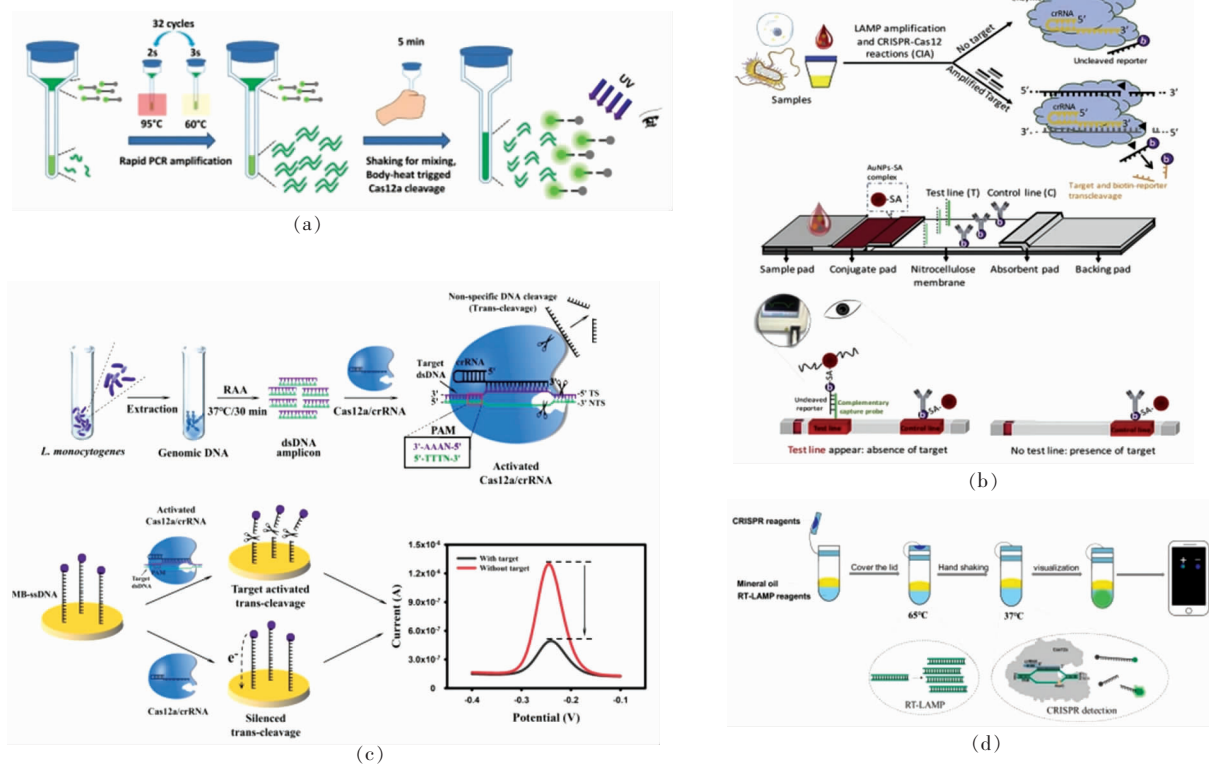


图 3 基于 CRISPR-Cas12 系统的生物传感分析^[72,74-75,79]

Fig.3 Biosensing assays based on CRISPR-Cas12 system^[72,74-75,79]

2.3 基于 Cas13 系统检测食源性病原体

相比于 Cas12 对靶标 DNA 的非特异性切割活性,Cas13 同样具有出色的表现。由于 DNA 在微生物细胞中长期存在,且无论其生理条件如何,靶向 DNA 的方法很难指示细菌活性,因此以 DNA 为检测目标的核酸分析方法无法区分死菌和活菌,会使假阳性率较高。相比之下,RNA 很容易在死细菌中快速消化,可被用来快速指示细菌

的生存状态^[81]。在食品中致病菌对人体的危害关键在于其保持一定的生长活性,从而产生的致病性。对食品中活的致病菌的检测至关重要。以 RNA 为目的靶标的 Cas13 在食源性致病菌上的检测方面具有不可估量的发展前景。

Zhou 等^[82]建立了“CCB-D”的细菌传感策略,用于金黄色葡萄球菌的检测。如图 4a 所示,将 *nuc* 基因作为分子标记,由 PCR 扩增的产物转录成单

链 RNA (ssRNA), 并借助 crRNA 的可编程性和 Cas13a 附带的 RNase 活性, 使 FAM 荧光基团与 BHQ1 荧光基团分离, 产生显著增强的荧光。用该方法成功检测到低至 1 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌。通过可靠性、敏感性、特异性和简单性的验证, 证实 Cas13 在检测平台具有高灵敏度、高特异性的优势。而葛以跃等^[83]将 CRISPR-Cas13a 系统与 RAA 技术相结合, 建立一种副溶血性弧菌快速检测方法 (RAA-Cas13a)。将靶核酸进行 RAA 扩增和 T7-RNA 聚合酶转录后, 在 crRNA 的引导下激活 Cas13a 酶的附带切割活性, 切割荧光探针从而释放荧光信号。该方法避免了传统 RAA 荧光检测使用的合成相对复杂的 RAA 荧光探针, 降低了检测难度与成本。整个检测反应需 1 h 左右, 与实时 PCR 具有相同的检测灵敏度, 为 10 拷贝/ μL 。苏璇等^[84]同样用该方法建立了 CRISPR/Cas13a 辅助 RAA 方法检测金黄色葡萄球菌, 达到 10 CFU/mL 的灵敏检测。Shen 等^[85]基于核酸的变构探针和 CRISPR/Cas13a 组合, 提出一种“APC-Cas”的检测系统。用变构探针的适体区域结合靶标, 通过扩增和转录过程获得能与 Cas13 蛋白结合的 ssDNA, 进而产生强大的荧光信号, 可选择性、敏感地定量检测牛奶等各类样品中的肠炎沙门氏菌。不同于大多需要转录步骤的 CRISPR 检测手段, Zhang 等^[81]建立了一种可直接靶向检测致病菌 RNA、无需逆转录、PCR 扩增和核酸标记的检测平台。如图 4b 所示, 利用发光 RNA 适体 (Broccoli)-CRISPR/Cas13a 系统来分析活蜡样芽胞杆菌。这种适体不同于其它基于 CRISPR/Cas 的分析中使用的化学合成和修饰的 RNA 探针, 它可与 DFHBI-1T 染料

结合, 产生强荧光信号。Broccoli-DFHBI-1T 复合物在 CRISPR/Cas13a 识别到细菌 RNA 后被 Cas13 激发的切割活性剪切, 其结构被破坏, 无法维持原有的结合状态, 使 DFHBI-1T 染料暴露, 导致荧光淬灭, 以此监测病原菌 RNA 的存在。该方法成功地定量分析活菌, 检测低至 10 CFU 的蜡样芽胞杆菌, 并精确定量 10^5 个 CFU 总细菌中的活菌, 从而更准确地估计蜡样芽胞杆菌破坏食物的能力。曾红棱等^[86]同样利用该方法成功实现食品中单增李斯特菌的检测。

对于病毒的检测, Fozouni 等^[87]报告了一种无扩增的 CRISPR-Cas13a 分析方法, 如图 4c 所示, 通过组合多个 crRNA 来增加 Cas13a 活性, 该方法可从鼻拭子中直接检测 SARS-CoV-2 的 RNA, 通过手机显微镜读取。在 30 min 内可达到 100 拷贝/ μL 的灵敏度, 可在 5 min 内准确检测出 1 组阳性临床样本中预先提取的 RNA。

目前, 利用 Cas13 的侧裂解活性在食源性病原体检测方面已有较大的进展, 这一切割活性比基于 Cas9 的检测更具应用价值。就 Cas12 与 Cas13 而言, 有研究人员对基于 Cas13 与 Cas12 检测病原体的方法进行比较, 发现 Cas13 活性比 Cas12 强, 可产生更多的信号。在灵敏度方面, Cas13a 远优于 Cas12a, 使用 Cas13a, 反式切割信号可被 Cs6 效应核酸酶进一步放大, 从而达到极高的灵敏度^[80]。在应用 Cas13 的检测平台时, 需使用 RNA 荧光报告基团, 其易受环境中 RNA 酶降解, 可能出现假阳性结果。同样也涉及气溶胶污染而导致的问题, 需在转移操作步骤中加入石蜡油或矿物油等来严格控制污染的发生。此外, 检测致

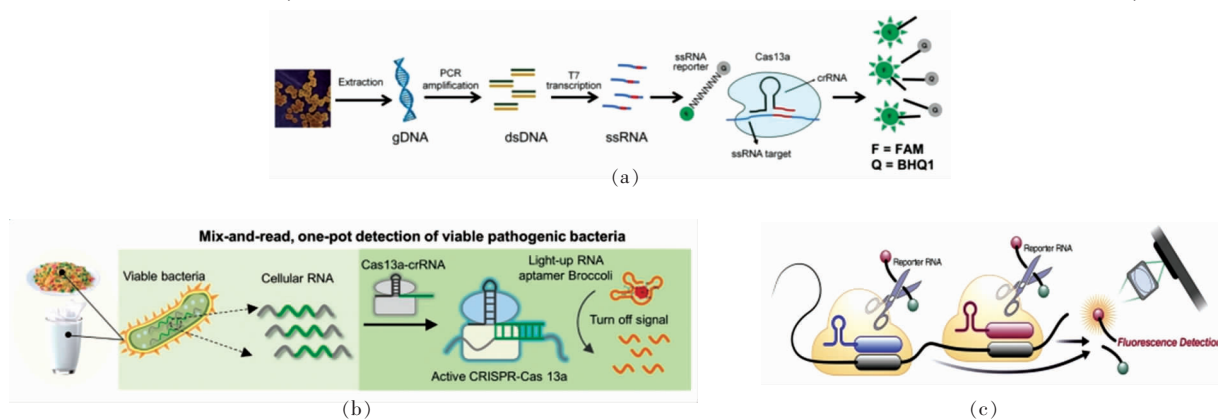


图 4 基于 CRISPR-Cas13 系统的生物传感分析^[81-82,87]

Fig.4 Biosensing assays based on CRISPR-Cas13 system^[81-82,87]

病菌时,大多需进行转录过程,使预处理时间变长,可能在一定程度上无法满足快速检测的需求。

3 结语

自 CRISPR 问世以来,作为基因编辑工具的 Cas 系统被广泛用于各个领域,特别是在基因编辑、基因转录调控、基因分型等方面显现出独一无二的优势。基于 CRISPR/Cas 系统的生物传感器,在检测肿瘤、癌症标记物、病毒等方向有了更加深入的研究与应用。在病原体的检测中,与传统检测方法相比,该方法操作简单,特异性强,灵敏度高,检测快速,使用试剂少,在温和条件下进行,可满足目前对即时检测的需求。在过去的几年里,基于 CRISPR 的生物传感技术在核酸检测方面显示出很大的潜力,然而,仍处于起步阶段,存在一定的局限性,有待改善与提高,如在实际操作中容易发生气溶胶污染,以及 Cas 蛋白对靶序列的识别高度依赖 PAM 区等。未来,研究人员可以进一步挖掘其它的新型 Cas 蛋白,配合适当的扩增方法以更好解决目前存在的不足,应用新技术、新平台,建立更为简单、高效的病原体检测方法。总之,将 CRISPR/Cas 系统与生物传感器技术结合作为检测手段,为食源性病原体的检测提供了新思路、新方法。该技术还可用于控制食品从生产、加工、运输、贮存、口岸通关到销售和消费各个环节的生物性风险检测,提高检测方法的准确性和灵敏度,更大程度地保证食品质量安全。

参 考 文 献

- [1] 周游,王周平.食品危害物及其检测方法研究进展[J].生物加工过程,2018,16(2):24-30.
ZHOU Y, WANG Z P. Food hazards and their detection—a review[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2018, 16(2): 24-30.
- [2] World Health Organization. Food safety [R/OL]. (2020-04-30)[2021-06-02]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- [3] KOOPMANS M, DUIZER E. Foodborne viruses: An emerging problem[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90(1): 23-41.
- [4] 王丹丹,刘鸣畅,杨艳歌,等.食源性致病菌快速检测技术研究进展[J].食品科学,2022,43(3):276-285.
WANG D D, LIU M C, YANG Y G, et al. Recent progress in technologies for rapid detection of foodborne pathogens [J]. Food Science, 2022, 43(3): 276-285.
- [5] 秦智伟,薛亮,高珺珊,等.食源性病毒核酸恒温检测技术研究进展[J].微生物学通报,2021,48(1):266-277.
QIN Z W, XUE L, GAO J S, et al. Advances in nucleic acid isothermal detection technologies for foodborne viruses[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 266-277.
- [6] 张群.食源性病毒分子生物学检测技术研究[J].食品与生物技术学报,2020,39(8):112.
ZHANG Q. Study on molecular biological detection of foodborne virus[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(8): 112.
- [7] RANJBAR S, SHAHROKHIAN S, NURMOHAMMADI F. Nanoporous gold as a suitable substrate for preparation of a new sensitive electrochemical aptasensor for detection of *Salmonella typhimurium* [J]. Sensors and Actuators B Chemical, 2018, 255(2): 1536-1544.
- [8] 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.
- [9] LABRIE S J, SAMSON J E, MOINEAU S. Bacteriophage resistance mechanisms [J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(5): 317-327.
- [10] LEDFORD H, CALLAWAY E. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel [J]. Nature, 2020, 586 (7829): 346-347.
- [11] BRUCH R, BAASKE J, CHATELLE C, et al. CRISPR/Cas13a - powered electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid amplification-free miRNA diagnostics [J]. Advanced Materials, 2019, 31(51): 1-8.
- [12] MOLLA K A, YANG Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: Technical considerations and practical applications [J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(10): 1121-1142.
- [13] CHARPENTIER E, MARRAFFINI L A. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering [J].

- Current Opinion in Microbiology[J]. 2014, 19: 114–119.
- [14] WRIGHT A V, NUÑEZ J K, DOUDNA J A. Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing Nature's Toolbox for genome engineering[J]. Cell, 2016, 164(1/2): 29–44.
- [15] JANSEN R, EMBDEN J D A, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [16] 曾珍, 胡莹. CRISPR/Cas 系统在抗菌治疗领域的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2021, 16(1): 64–67.
- ZENG Z, HU Y. Research progress of CRISPR/Cas system in the field of antibacterial therapy[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2021, 16(1): 64–67.
- [17] CARTE J, WANG R Y, LI H, et al. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes[J]. Genes and Development, 2009, 22(24): 3489–3496.
- [18] 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.
- [19] CHYLINSKI K, RHUN A L, CHARPENTIER E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR–Cas immunity systems[J]. RNA Biology, 2013, 10(5): 726–737.
- [20] ZETSCHKE B, HEIDENREICH M, MOHANRAJU P, et al. Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(1): 31–34.
- [21] 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): 722–736.
- [22] KOONIN E V, MAKAROVA K S, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR–Cas systems[J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 37: 67–78.
- [23] 徐娜, 龚云霞, 邵彦春, 等. CRISPR–Cas 系统及 anti-CRISPR 蛋白在微生物中的研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2172–2191.
- XU N, GONG Y X, SHAO Y C, et al. Research progress of CRISPR–Cas system and anti-CRISPR protein in microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(8): 2172–2191.
- [24] ZHANG Y X, WU Y P, WU Y F, et al. CRISPR–Cas systems: from gene scissors to programmable biosensors[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021, 137: 116210.
- [25] 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.
- [26] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331–338.
- [27] CHEN J S, DOUDNA J A. The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues[J]. Nature Reviews Chemistry, 2017, 1: 0078.
- [28] MOJICA F J M, DIEZ-VILLASENOR C, GARCIA-MARTINEZ J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system[J]. Microbiology, 2009, 155(3): 733–740.
- [29] STERNBERG S H, REDDING S, JINEK M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9[J]. Biophysical Journal, 2014, 106(2): 695.
- [30] DONGEN J E, BERENDSEN J T W, STEENBERGEN R D M, et al. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: Recent advances, challenges and opportunities[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 166: 112445.
- [31] SZCZELKUN M D, TIKHOMIROVA M S, SINKUNAS T, et al. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(27): 9798–9803.
- [32] DEVEAU H, BARRANGOU R, GARNEAU J E, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(4): 1390–1400.
- [33] 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.
- [34] GARCIA-DOVAL C, JINEK M. Molecular architectures and mechanisms of Class 2 CRISPR-associated nucleases[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2017, 47: 157–166.

- [35] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(39): 2579-2586.
- [36] XU W, JIN T, DAI Y F, et al. Surpassing the detection limit and accuracy of the electrochemical DNA sensor through the application of CRISPR Cas systems[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 155: 112100.
- [37] EBRAHIMI V, HASHEMI A. Challenges of *in vitro* genome editing with CRISPR/Cas9 and possible solutions: A review[J]. Gene, 2020, 753: 144813.
- [38] RAN F A, HSU P D, LIN C-Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. Cell, 2013, 154(6): 1380-1389.
- [39] 毛金燕, 翟惠, 王洁, 等. CRISPR/Cas 技术及其作用机理[J]. 分子植物育种, 2022, 20(7): 2310-2319.
- MAO J Y, ZHAI H, WANG J, et al. CRISPR/Cas technology and its action mechanisms[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(7): 2310-2319.
- [40] KOO B, KIM D E, KWEON J, et al. CRISPR/dCas9-mediated biosensor for detection of tick-borne diseases[J]. Sensors and Actuators B Chemical, 2018, 273: 316-321.
- [41] 公少华, 李娜, 唐波. 调控 CRISPR-Cas9 系统用于基因编辑的研究进展[J]. 化学学报, 2020, 78(7): 634-641.
- GONG S H, LI N, TANG B. Recent progress in regulating CRISPR-Cas9 system for gene editing[J]. Acta Chimica Sinica, 2020, 78(7): 634-641.
- [42] AMAN R, MAHAS A, MAHFOUZ M. Nucleic Acid Detection Using CRISPR/Cas Bio-sensing Technologies[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(6): 1226-1233.
- [43] LIU L, CHEN P, WANG M, et al. C2c1-sgRNA complex structure reveals RNA-guided DNA cleavage mechanism[J]. Molecular Cell, 2017, 65(2): 310-322.
- [44] MURUGAN K, SEETHARAM A S, SEVERIN A J, et al. CRISPR-Cas12a has widespread off-target and dsDNA-nicking effects [J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(17): 5538-5553.
- [45] 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.
- [46] PAUL B, MONTOYA G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications[J]. Biomedical Journal, 2020, 43(1): 8-17.
- [47] SWARTS D C, VAN DER OOST J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a [J]. Molecular Cell, 2017, 66(2): 221-233.
- [48] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. Cell Discovery, 2018, 4(1): 1-4.
- [49] LI S Y, CHENG Q X, LIU J K, et al. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA [J]. Cell Research, 2018, 28(4): 491-493.
- [50] 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.
- [51] VEILLET F, DURAND M, KROJ T, et al. Precision breeding made real with CRISPR: Illustration through genetic resistance to pathogens [J]. Plant Communications, 2020, 1(5): 100102.
- [52] TENG F, CUI T T, GAO Q Q, et al. Artificial sgRNAs engineered for genome editing with new Cas12b orthologs [J]. Cell Discovery, 2019, 5(1): 23.
- [53] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMAN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. Science, 2016, 353(6299): 5573.
- [54] 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.
- [55] LIU L, LI X Y, WANG J Y, et al. Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities [J]. Cell, 2017, 68(1/2): 121-134.
- [56] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL M R, KNIGHT S C, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. Nature, 2016, 538(7624): 270-273.
- [57] LIU L, LI X, MA J, et al. The molecular archi-

- ture for RNA-Guided RNA cleavage by Cas13a [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 714-726.
- [58] 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.
- [59] SMARGON A A, COX D, PYZOSHA N K, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(4): 618-630.
- [60] 韦涛, 何滋林, 纪庆超, 等. CRISPR/Cas 基因编辑系统研究进展[J]. *生命的化学*, 2019, 39(1): 39-45.
- WEI T, HE Z L, JI Q C, et al. Research progress of CRISPR/Cas gene editing system[J]. *Chemistry of Life*, 2019, 39(1): 39-45.
- [61] BONINI A, POMA N, VIVALDI F, et al. Advances in biosensing: The CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 192: 113645.
- [62] LI Y, LI S Y, WANG J, et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(7): 730-743.
- [63] SUN X, WANG Y, ZHANG L, et al. A CRISPR-Cas9 triggered two-step isothermal amplification method for *E. coli* O157:H7 detection based on metal-organic framework platform[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(4): 3032-3041.
- [64] WANG T, LIU Y, SUN H H, et al. An RNA-guided Cas9 nickase-based method for universal isothermal DNA amplification[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(16): 5382-5386.
- [65] 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 and Bioelectronics*, 2020, 165: 112364.
- [66] MOON J, KWON H J, YONG D, et al. Colorimetric detection of SARS-CoV-2 and drug-resistant pH1N1 using CRISPR/dCas9[J]. *ACS Sensors*, 2020, 5(12): 4017-4026.
- [67] CHATTERJEE P, JAKIMO N, JACOBSON J M. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog [J]. *Science Advances*, 2018, 4(10): eaau0766.
- [68] PATTANAYAK V, LIN S, GUILINGER J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 839-843.
- [69] KLEIN M, ESLAMI-MOSSALLAM B, ARROYO D G, et al. Hybridization kinetics explains CRISPR-Cas off-targeting rules [J]. *Cell Reports*, 2018, 22(6): 1413-1423.
- [70] 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.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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 - ScienceDirect [J]. *Food Chemistry*, 2021, 334: 127608.
- [74] MUKAMA O, WU J H, LI Z Y, et al. An ultrasensitive and specific point-of-care CRISPR/Cas12 based lateral flow biosensor for the rapid detection of nucleic acids [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 159: 112143.
- [75] 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.
- [76] HE Q, YU D M, BAO M D, et al. High-throughput and all-solution phase African Swine Fever Virus (ASFV) detection using CRISPR-Cas12a and fluorescence based point-of-care system [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 154: 112068.
- [77] 彭小唤. 利用 CRISPR-Cas12a 系统检测非洲猪瘟病毒的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- PENG X H. Study on detection of African swine fever virus using CRISPR-Cas12a system [D]. Changchun: Jilin University, 2020.

- [78] GUO L, SUN X H, WANG X G, et al. SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics[J]. Cell Discovery, 2020, 6(1): 34.
- [79] CHEN Y J, SHI Y, CHEN Y, et al. Contamination-free visual detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: A promising method in the point-of-care detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 169: 112642.
- [80] 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.
- [81] ZHANG T, ZHOU W H, LIN X Y, et al. Light-up RNA aptamer signaling-CRISPR-Cas13a-based mix-and-read assays for profiling viable pathogenic bacteria[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 176: 112906.
- [82] 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.
- [83] 葛以跃, 苏璇, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a 结合重组酶介导的扩增快速检测副溶血性弧菌方法的建立[J]. 现代预防医学, 2019, 46(20): 135-139.
- GE Y Y, SU X, ZHANG Q, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by CRISPR-Cas13a combined with recombinase aided amplification(RAA)[J]. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(20): 135-139.
- [84] 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-Cas13a combined with recombinase aided amplification(RAA)[J]. Journal of Pathogen Biology, 2020, 15(3): 253-258.
- [85] 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): 267-277.
- [86] 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): 1-7.
- 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): 1-7.
- [87] FOZOUNI P, SON S, DÍAZ DE LEÓN DERBY M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy[J]. Cell, 2021, 184(2): 323-333.

Research Progress on CRISPR/Cas Biosensors for Detection of Foodborne Pathogens

Huang Luqi¹, Sun Xufei¹, Yuan Ning², Fan Shaohua³, Zhang Wei^{1,4,5*}

¹College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

²College of Science and Technology, Hebei Agricultural University, Cangzhou 061100, Hebei

³Hebei Software Vocational and Technical College, Baoding 071000, Hebei

⁴College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

⁵Hebei Key Laboratory of Analysis and Control of Zoonotic Pathogenic Microorganism, Baoding 071000, Hebei)

Abstract Foodborne diseases caused by foodborne pathogens seriously threaten human health. Sensitive and rapid detection of foodborne pathogens has become an important means to prevent disease occurrence. Biosensors have the advantages of high sensitivity, real-time quantification without enrichment, and easy on-site detection. The combination of CRISPR/Cas system combined with biosensors can improve the sensitivity and accuracy of biosensors detection. This article introduces the classification and mechanism of the CRISPR/Cas system, reviews various biosensors based on CRISPR/Cas for the detection of foodborne pathogens, including fluorescent sensors, electrochemical sensors, and lateral flow strip, and analyzes the advantages and disadvantages of different Cas protein detection, so as to provide reference for the detection of foodborne pathogens.

Keywords CRISPR/Cas; biosensors; foodborne pathogens