

# CRISPR/Cas 系统在食品质量安全检测中的应用研究进展

曹 菁<sup>1</sup>, 王梓莹<sup>1</sup>, 汪官墨<sup>1</sup>, 但 琨<sup>2</sup>, 施远国<sup>2</sup>, 魏 波<sup>1</sup>, 何庆华<sup>1\*</sup>

(1. 深圳大学化学与环境工程学院, 深圳 518071;  
2. 深圳市农产品质量安全检验检测中心, 深圳 518055)

**摘 要:** 规律间隔成簇短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated, CRISPR/Cas)是基于细菌和古细菌等原核生物的一种适应性免疫系统, 因其可编程性和易操作的优点已被开发为基因编辑技术, 并且凭借其快速和高效的特点被广泛用于生物、医学等领域。目前, 凭借其灵敏、快速、准确和特异性强的技术优势, CRISPR/Cas 系统已开始应用于基于核酸检测和单核苷酸多态性检测等食品安全检测技术中应用, 发展迅速, 具有广阔的应用前景。本文对 CRISPR/Cas 系统中 Cas9、Cas12a 和 Cas13a 的原理进行综述, 总结其在掺假检测、溯源检测、食源性微生物和动物疫病等食品质量安全检测中的应用进展, 探讨该技术目前存在的问题和局限性, 并对其未来的发展进行展望, 以期对 CRISPR/Cas 系统应用于食品质量安全的现场快速检测提供理论和技术参考。

**关键词:** 规律间隔成簇短回文重复序列; Cas9; Cas12a; Cas13a; 食品安全检测

## Research progress on the application of CRISPR/Cas system in food quality and safety detection

CAO Jing<sup>1</sup>, WANG Zi-Ying<sup>1</sup>, WANG Guan-Zhao<sup>1</sup>, DAN Kun<sup>2</sup>, SHI Yuan-Guo<sup>2</sup>, WEI Bo<sup>1</sup>, HE Qing-Hua<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518071, China;  
2. Agricultural Product Quality Safety Inspection and Testing Center of Shenzhen, Shenzhen 518055, China)

**ABSTRACT:** The clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated (CRISPR/Cas) system is an adaptive immune system based on prokaryotes such as bacteria and archaea, due to its advantages of programmable and easy operation, CRISPR/Cas system has been developed as a gene editing technology, and it has been widely used in biology, medicine and other fields owing to its fast and efficient characteristics. To date, with its technical advantages of sensitivity, speed, accuracy and strong specificity, CRISPR/Cas system has been gradually widely used in nucleic acid detection, single nucleotide polymorphism detection and other food safety detection technologies. It has rapid development and broad application prospects. This paper reviewed the

**基金项目:** 深圳市科技创新委员会基础研究项目(JCYJ20200109114242138、JCYJ20180305125139107)、深圳市市场监督管理局深圳市地方标准制修订计划项目(201904、201905)、深圳大学 2020 年研究生创新发展基金项目(202011)

**Fund:** Supported by the Basic Research Program of Shenzhen Municipal Government (JCYJ20200109114242138, JCYJ20180305125139107), the Food Safety Foundation of Market and Quality Supervision Commission of Shenzhen Municipality (201904, 201905), and the Postgraduate Innovation and Development Fund Project of Shenzhen University in 2020 (202011)

\*通信作者: 何庆华, 博士, 副教授, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: Qinghua.he@szu.edu.cn

\*Corresponding author: HE Qing-Hua, Ph.D, Associated Professor, Department of Food Science and Engineering, College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518071, China. E-mail: Qinghua.he@szu.edu.cn

principles of Cas9, Cas12a, and Cas13a in the CRISPR/Cas system, summarized their application progress in food quality and safety detection, such as adulteration detection, traceability detection, food-borne microorganisms and animal diseases, discussed the current problems and limitations, and prospected the future development was with the aim of providing theoretical and technical reference for the application of CRISPR/Cas system in the field of rapid detection of food quality and safety.

**KEY WORDS:** clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated; Cas9; Cas12a; Cas13a; food safety detection

## 0 引言

规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)是在原核生物(细菌与古细菌)中发现的特殊基因组区域,经非重复间隔区隔开,由大小相似的重复间隔序列组成<sup>[1]</sup>,两侧与 CRISPR 关联基因(CRISPR associated, Cas)相连<sup>[2-3]</sup>。CRISPR/Cas 系统是基于原核生物的一种适应性免疫系统,通过储存过往的感染记忆来提供针对外源遗传物质的特异性保护,从而保护细菌免受病毒入侵<sup>[3]</sup>。CRISPR/Cas 系统的免疫过程包括适应、crRNA (CRISPR-derived RNA)产生和干扰 3 个阶段(图 1)<sup>[4-5]</sup>。在适应阶段,外源遗传物质被选择、处理并整合至 CRISPR 序列中,以形成感染记忆;当 CRISPR 序列被转录生成前体 crRNA 时,前体 crRNA 在重复序列中被 CRISPR 特异性核酸内切酶处理,产生成熟的 crRNA;在随后的干扰阶段,由 crRNA 引导来切割外源核酸中原间隔区的互补序列<sup>[4-5]</sup>。当同一遗传物质再次侵入时,免疫过程将直接绕过适用阶段,从储存的原间隔序列合成 crRNA。CRISPR/Cas 系统的免疫过程主要由 CRISPR 序列两侧 Cas 基因编码的 Cas 蛋白质完成<sup>[5]</sup>,根据效应器设计的原则不同分为两个类别:第一类(Class1)指切割过程中有多个效应器复合体参与,包括I型、III型和VI型;第二类(Class2)效应器仅由单一多结构域蛋白质引导外源核酸的切割,包括II型、V型和VI型<sup>[2,5-7]</sup>。其中,Cas9、Cas12a 和 Cas13a 分别属于 Class2 的II型、V型和VI型<sup>[8]</sup>。

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是核酸检测的最常见方法,但在基层实验室、快检筛查或现场检测中,PCR 法因对仪器和操作人员要求较高而存在局限<sup>[9]</sup>,基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测技术具有快速、准确和对环境、仪器、操作人员要求低的优点,具有良好的前景和发展潜力。CRISPR/Cas 系统通过改变引导 RNA (guide RNA, gRNA)序列,达到易被重新编码以检测目标核酸的目的,并且对外源核酸高度特异,不对内源 DNA 和转录产物造成损害,在室温下即可反应<sup>[10-11]</sup>,已被逐渐应用到识别核酸检测的生物传感器中<sup>[12]</sup>。近年来,关于 CRISPR/Cas 系统的研究逐渐深入,在核酸快速检测的应用研究也越来越多<sup>[13]</sup>,基于此,本文对不同 Cas 蛋白质的

CRISPR/Cas 系统的原理和方法进行总结,并对 CRISPR/Cas 系统在包括掺假、溯源、食源性微生物和动物疫病等食品质量安全检测中的应用进行综述,以期 CRISPR/Cas 系统在食品质量安全检测的应用提供理论和技术参考。

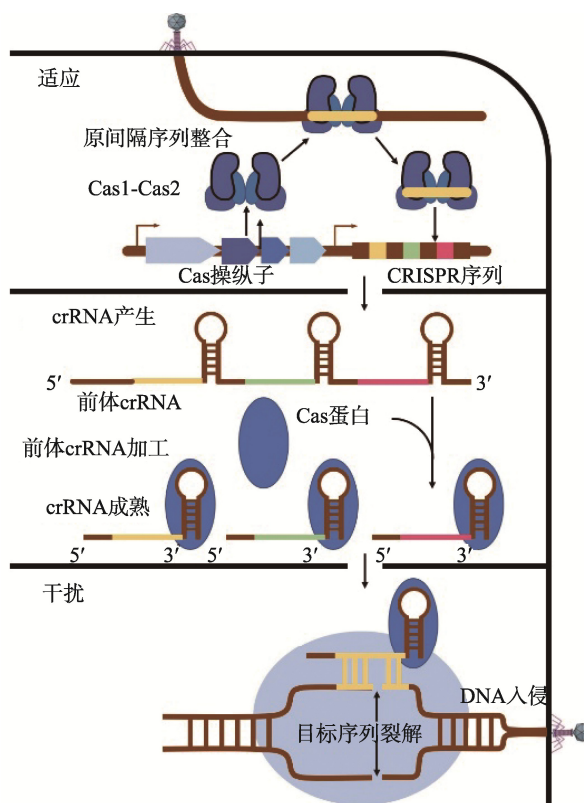


图 1 CRISPR/Cas 系统原理图

Fig.1 Principle of CRISPR/Cas system

## 1 CRISPR/Cas 系统

作为细菌防御系统的 CRISPR/Cas 系统,在进化过程中一直与病毒进行斗争,这导致了 Cas 基因的快速进化和 Cas 蛋白质的多样性,使 Cas 蛋白质具有多样的结构和切割活性。其中,Cas9、Cas12a 和 Cas13a 是被应用于食品质量安全快速检测领域的常见 3 种 Cas 蛋白质,它们的技术原理比较分析如表 1 所示。

表 1 基于 CRISPR/Cas 基因编辑检测技术比较分析表  
Table 1 Comparative analysis based on CRISPR/Cas gene editing detection techniques

核酸酶类型	作用对象	作用方式	所用 RNA	大小	PAM/PFS
Cas9 <sup>[14]</sup>	dsDNA	HNH 和 RuvC 结构域共同切割	crRNA 和 tracrRNA	约 1368 个氨基酸残基	3'端富含 G(5'-NGG-3')
Cas12a <sup>[15]</sup>	dsDNA	RuvC 结构域直接切割	crRNA	1200~1300 个氨基酸残基	5'端富含 T(5'-YTN-3', 5'-TTTN-3')
Cas13a <sup>[16]</sup>	ssRNA	2 个 HEPN 结构域组成的切割活性区域	crRNA	1389 个氨基酸残基	3'PFS: 富含 U

注: PAM: protospacer adjacent motif, 前间隔序列邻近基序; PFS: protospacer flanking site, 前间隔序列侧翼位点。

### 1.1 Cas9

Cas9 是第 II 类基因型的标志蛋白质,也是第一个用于基因组编辑的效应器,是基因编辑最常用的核酸内切酶<sup>[17]</sup>。它可以通过与单导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 的互补碱基配对来靶向几乎所有 DNA 序列<sup>[18]</sup>,可识别约 20 nt 的目标序列<sup>[19]</sup>。Cas9 核酸酶结构域切割一条 DNA 链并形成平末端,目前已知的亚型中都含有一个 HNH 结构域,用来切割 gRNA 序列互补的目标 DNA 链(靶链),以及一个切割非互补链(非靶链)的 RuvC 结构域<sup>[20]</sup>。在免疫过程中的干扰阶段,成熟 crRNA 不能单独引导 Cas9 催化的质粒 DNA 切割,而需要添加与 crRNA 重复序列配对并对 crRNA 在该系统中的成熟至关重要的反式激活 RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)<sup>[21]</sup>。目标双链 DNA (double-stranded, dsDNA) 的切割由 tracrRNA 进行,与靶链互补的 DNA 链在前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)上游 3 个碱基对的位点被切割;非互补的 DNA 链则在 PAM 上游 3~8 个碱基对的一个或多个位点被切割,随后被 3'-5'核酸外切酶修饰<sup>[22-23]</sup>。另外,Cas9 酶还有一个高度保守的富含精氨酸的区域,被认为用来介导核酸的结合<sup>[24]</sup>。尽管 Cas9 已经在包括基因编辑、基因敲除等多个研究领域取得众多进展与成果,但因 sgRNA 中存在广泛的脱靶位点而具有脱靶效应。目前已有较多关于 Cas9 脱靶检测技术的研究,包括早期的 Sanger 测序、NGS 测序<sup>[25]</sup>,以及近年来的 Digenome-seq、Circle-seq 等技术<sup>[26]</sup>,但 Cas9 的脱靶效应仍是限制其应用的难题。

### 1.2 Cas12a

Cas12a 又称 Cpf1,是一种包含约 1200~1300 个氨基酸的核酸内切酶,gRNA 结构简单,仅由直接重复序列中的单个茎环组成,使用单个 RuvC 结构域来指导 gRNA 的 dsDNA 切割,并且该结构域与 Cas9 的 RuvC 结构域有同源关系<sup>[27]</sup>。但 Cas12a 缺少 HNH 结构域,可以识别富含胸腺嘧啶 T 的 PAM 序列(5'-TTTN-3'),催化引导 crRNA 成熟,并产生具有交错 5'和 3'PAM 末端致使 dsDNA 断裂<sup>[13]</sup>,形成突出的黏性末端<sup>[28]</sup>。在免疫过程中,Cas12a 采用顺式切

割和反式切割的模式:在 crRNA 的引导下识别 dsDNA 的 PAM 序列来促使其解链,解链后释放出 RuvC 结构域中的活性位点来切割非靶标链,使靶标 DNA 解旋;解旋后的靶标链同样被 RuvC 切割,即为顺式切割。随后 Cas12a 会释放出 PAM 远端的 dsDNA,此时一旦有单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 进入 RuvC 的活性位点,便会被切割,即为反式切割<sup>[29]</sup>。研究表明,在 CRISPR/Cas12a 系统中,Cas12a 和 crRNA 足以介导 DNA 靶向,无需 tracrRNA 即可将 crRNA 加工为核酸酶结构域<sup>[3]</sup>。另外,有研究表明在反应中加入  $Mg^{2+}$  可以产生催化作用,此时 Cas12a 的活性最高<sup>[30]</sup>。CHEN 等<sup>[13]</sup>已经开发出基于 Cas12a 的人乳头瘤病毒快速检测法 DETECTOR,该研究表明 Cas12a 与荧光猝灭法结合后具有快速、特异性强等优势,在分子诊断和检测领域具有极大的应用价值。Cas12a 对 5'-YTN-3', 5'-TTTN-3 序列的有效识别,使得它具有更大的靶向范围。但最近有研究显示该技术存在假阴性的可能性较高<sup>[31]</sup>。

### 1.3 Cas13a

Cas13a 又称 C2c2,是一种属于 VI 基因型的引导 RNA 的核糖核酸内切酶,具有“双瓣叶”球状蛋白质结构,可以使用 crRNA 重新编码,为特异性 RNA 检测提供途径<sup>[32]</sup>。据已有数据库显示,其与任何已知蛋白质之间均不存在显著的序列相似性,但存在高等真核生物和原核生物核苷酸结合(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding, HEPN)结构域特有的 2 个保守 R(N)xxxH 序列,以实现 crRNA 引导的 ssRNA 切割活性<sup>[8,33]</sup>。由于 VI 型 CRISPR 基因座缺乏 tracrRNA,故 Cas13a 本身可能具有前体 crRNA 的处理活性<sup>[34]</sup>。在免疫过程中,Cas13a 与前体 crRNA 结合后,Cas13a 在前体 crRNA 序列中裂解,形成成熟的 Cas13a-crRNA 复合物;与 crRNA 互补的 RNA 靶标结合后,Cas13a 通过激活酶的 HEPN 区域非特异性地切割 RNA,形成单一的符合 RNA 酶活性位点<sup>[35]</sup>。这种由 HEPN 激活的 Cas13a 构象是一种通用的核酸内切酶,既可以裂解被它激活的 RNA 分子(顺式裂解),也可以裂解它遇到的任何其他 RNA 分子(反式裂解),这种侧枝切割活性同 Cas12a 相似。

除 Cas13a 外, 目前发现的所有 Cas13 蛋白质都表现出这样的特性<sup>[36]</sup>。在实际应用中, GOOTENBERG 等<sup>[32]</sup>已建立基于 Cas13a 的快速核酸检测方法, 即特异性高灵敏度酶促解锁 (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, SHERLOCK), 该方法可以进一步用于包括多重核酸检测在内的生物分子检测中。EAST-SELETSKY 等<sup>[37]</sup>证明 Cas13a 在核酸精准检测上具有广阔的前景。

## 2 CRISPR/Cas 系统在食品质量安全检测中的应用进展

可编程的 Cas 蛋白质具有进化多样性, 为快速、准确、灵敏、简便和低成本检测提供了可能<sup>[12]</sup>。与基因操控不同, CRISPR/Cas 系统往往结合多种扩增方法, 对遗传物质进行体外检测与鉴定, 从而评价食品质量安全。目前, CRISPR/Cas 系统作为新兴基因编辑技术在核酸检测和单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 检测等方面具有良好的应用前景, 已应用于掺假检测、溯源检测、食源性微生物和动物疫病等食品质量安全方面的检测。

### 2.1 掺假检测

CRISPR/Cas 系统已成功应用到掺假检测中, 比如上等可可粉 (Arriba) 风味和颜色独特且强烈, 而可可粉克隆体 CCN-51 香气较弱, 苦味和涩味更强, 口味和品质较差、价格低廉, 在优质可可粉加工过程中可能出现为了增加利润而将 CCN-51 掺入 Arriba 的乱象, 确定优质可可粉是否掺入 CCN-51 是常见的掺假检测项目。SNP 是由于单核苷酸变异引起的序列多态性, Cas9 作为可编程限制性核酸内切酶可以成为单核苷酸多态性的有效检测工具, SCHARF 等<sup>[38]</sup>基于 CRISPR/Cas9 系统, 利用毛细管凝胶电泳分离 DNA 片段来对可可粉和可可粉混合物进行定量分析, 方法灵敏度为可鉴定含量为 10% 的 CCN-51, 可以实现对掺假的劣质可可粉混合物的有效检测。在肉类掺假检测中, 向昂贵的牛肉中掺入相对便宜的鸭肉或猪肉等是比较常见的掺假方式。LIU 等<sup>[39]</sup>利用 Cas12a 的非特异性 ssDNA 切割特性, 结合重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA), 建立牛肉、猪肉和鸭肉的 RPA-Cas12a-FS 检测方法, 结合特异性的 crRNA 和荧光探针可以实现核酸水平的高特异性和高灵敏度物种鉴别, 该方法对牛肉和鸭肉的检测灵敏度达到 10 个拷贝数, 满足现有肉类掺假问题的需求, 且检测时间在 45 min 内, 与常规 PCR 方法相比具有简便、快捷的优点, 适用于进行肉类掺假鉴定的高通量检测。以上研究表明, CRISPR/Cas 系统中 Cas 蛋白质的多样性可满足针对不同掺假成分的特异性检测, 再结合 RPA、环介导等温扩增反应 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等快速扩增方法即可达到快速、

高效的检测目的。

### 2.2 溯源检测

食品安全溯源指在食物链的各个阶段或环节中鉴别、验证产品身份的过程。以微生物溯源为例, 对于广泛存在于整个食品供应链中的微生物, 根据其来源、生物学作用、对产品质量和安全性及消费者健康的影响, 对其进行明确、准确和高分辨率的鉴定和分型十分重要。细菌间 CRISPR 位点的高度变异性为分型提供了理想位点<sup>[40]</sup>, 新兴的基于 CRISPR 的分型方法为微生物高分辨率分型开辟了新途径与新方法。目前食源性疾病爆发调查主要使用脉冲场凝胶电泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 进行菌株鉴定和溯源, CRISPR 可作为传统分型方法的补充<sup>[41]</sup>。如在沙门氏菌的检测中, 传统分型方法需要专业操作人员及耗时的血清学实验<sup>[42]</sup>, 错误的血清学结果可能会低估某些食源性疾病爆发时沙门氏菌血清变异的发生率, 从而耽误治疗。而沙门氏菌的每种血清型都具有独特的 CRISPR 序列, MONTE 等<sup>[43]</sup>根据 CRISPR 序列比对可以确定该序列中主要的 Cas 操纵子, 达到精准鉴定血清型的目的。对微生物的精确鉴定分型可以在生产中快速高效地控制产品质量、保持产品安全, 也可以在食源性疾病爆发时快速采取合适的治疗方法, 达到高效治疗的目的。

### 2.3 食源性微生物检测

食源微生物对全球食品安全和公共健康构成了威胁, 准确而及时地检测食品中病原微生物对于防止疾病爆发具有重要意义。目前广泛使用的检测方法往往基于 PCR 仪, 并不适用于现场检测, 而已开发的适合现场检测的等温扩增方法也存在结果假阳性、引物设计复杂等局限性<sup>[44]</sup>。结合 CRISPR/Cas 系统和链置换扩增术 (strand displacement amplification, SDA) 的优点, WANG 等<sup>[45]</sup>建立了一种基于 Cas9 的等温扩增反应 (Cas9 nickase-based amplification reaction, Cas9nAR), 该方法表现出对任意核酸长度的扩增能力、单分子敏感性、SNP 特异性的优点。快速、便携且低成本的生物传感器—横向流动条带与 Cas9nAR 相结合的双重食源性病原体检测法能够对核酸靶标进行快速方便的检测, 且可以检测多重目标, 适用于分析不止一种病原体的污染食品检测中。此方法检测限可达 100 CFU/mL, 且无需仪器来扩增 DNA, 可达到快速、简便的目的。

荧光检测常与 Cas12a 结合用于食品安全检测中。Cas12a 的侧枝切割特性可以非特异性地切割非靶链, 允许 Cas12a 使用包含 ssDNA 连接的荧光团猝灭剂 (fluorophore quencher, FQ) 来检测核酸。在 CRISPR/Cas12a 结合荧光检测法中, 使用紫外投射器或荧光板阅读器来检测阳性样本中未猝灭的荧光信号, 即可判断是否有目标致病菌或病毒残留<sup>[13,46]</sup>。另外, Cas12a 具有很强的 DNA 靶向特异性, 利用其反式切割活性并结合荧光检测制作生物传感器, 可高

灵敏度和高特异性地快速响应外部致病菌。PENG 等<sup>[47]</sup>将 Cas12a 系统结合荧光标记应用到金黄色葡萄球菌的检测中, Cas12a 能够在非靶 ssDNA 上进行反式切割, 在试管中额外添加 ssDNA 可以增强反式切割刺激, 形成 Cas12a-crRNA-dsDNA 复合物, 提高荧光输出的强度, 方法检测限可达  $10^3$  CFU/mL, 动态范围达  $10^3\sim 10^7$  CFU/mL, 并在检测大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌时得到验证。

WOO 等<sup>[48]</sup>已证明 Cas13a 允许通过 RNA 序列对目标 RNA 作用和激活, 通过直接分析 RNA 序列进行病原菌核酸的检测。ZHANG 等<sup>[49]</sup>将 RNA 适配体 Broccoli 作为检测 Cas13a 激活状态的荧光探针, RNA 适配体/DFHMI-1T 复合物的荧光可以指示细菌 RNA 的存在。Cas13a 和发光 RNA 适配体的结合有助于无逆转、无核酸扩增、无标记的 RNA 分析, 从而允许快速检测活病原菌, 方法能够检测低至 10 CFU 的蜡样芽胞杆菌, 并精确定量  $10^5$  CFU 内 0~100% 范围内的活菌。Cas 蛋白质的多样性使得其可以满足 DNA、RNA 等多种核酸的检测, 灵敏度高且特异性好, 与荧光检测相结合使结果更加直观, 在对食源性微生物的食品安全检测中具有良好的应用前景。

## 2.4 动物疫病检测

动物疫病是食品安全的重要检测目标之一, 疫病病毒的检测是保障动物性食品养殖生产和食用安全的前提。比如, 白斑综合症病毒(white spot baculovirus, WSSV)会造成虾类感染发生病变, 严重病例中会导致虾类死亡。CHAIJARASPHONG 等<sup>[46]</sup>将 CRISPR/Cas12a 系统结合荧光检测可以检测 WSSV 扩增子, 检测限达到 200 个拷贝数。尽管常规 PCR 检测限可达 10 个拷贝数, 但在疫病爆发的早期检测中, 由于设备复杂、耗时等原因, 常规 PCR 并不适用。此时, CRISPR/Cas12a 系统将提供一种简便、快速的筛查方法, 便于快速响应采取措施。

非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)对养猪业造成了毁灭性的打击, 导致猪肉价格飙升和消费者恐慌<sup>[50]</sup>, 目前 ASFV 的诊断方法主要为实时聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR), 但仪器昂贵及操作人员的专业性限制了检测效率。HE 等<sup>[51]</sup>利用 CRISPR/Cas 系统为 ASFV 的快速检测提供了新方法, 切割单链 DNA 探针后, 使用小型荧光传感装置和一次性试剂盒检测荧光信号, 可以在 24 h 快速检测和定量, 操作简便且灵敏度高, 检测限可达  $10^{-13}$  mol/L。另外, 在 ASFV 的检测中, Cas12a 可与核酸扩增技术相结合, 提高检测的敏感性。TAO 等<sup>[52]</sup>利用 Cas12a 结合 LAMP 法缩短检测时间至 1 h, 满足方便、即时、可靠的目的, 且优于常规 PCR 的检测限, 灵敏度与 qPCR 法具有一致性, 可达 2 拷贝数/ $\mu$ L(含 p72 基因)。在动物疫病的检测中, CRISPR/Cas 系统的快速、简便往往可达到避免疫病迅速传播的目的从而使

损失降至最低, 目前已得到越来越广泛的应用与研究。

## 3 结论与展望

综上所述, CRISPR/Cas 系统的可编程性, 为核酸的快速检测提供了全新的思路和方法, 将其用于掺假检测、溯源检测、食源性微生物和动物疫病等的检测, 为食品安全检测提供了新的解决方案。目前已开发出的基于 Cas12a 的 DETECTOR 法<sup>[13]</sup>、基于 Cas13a 的 SHERLOCK 法<sup>[32]</sup>等核酸检测方法成功建立并逐步市场化, 证明其在检测领域具有巨大的潜力。由于 CRISPR/Cas 系统具有仪器简单、快速、灵敏度高、特异性强等优点, 更适用于如机场、海关的现场检测、快速检测、早期检测等场景, 在便携试剂盒的研发方面具有广阔的应用前景。尽管如此, 关于 CRISPR/Cas 技术的操作人员的培训度与专业度仍然不足, 这可能限制其进一步的推广。另外, 不同 Cas 蛋白质结构不同, 特点各异, 在建立检测方法时, 应当根据使用环境、目的等选择合适的 Cas 蛋白质及扩增方法, 如何找到最佳的组合需要结合 Cas 蛋白质结构与特征进行大量的探索与创新。

## 参考文献

- [1] JANSEN R, EMBDEN JDAV, GAASTRA W, *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [2] KLOMPE SE, STERNBERG SH. Harnessing "A billion years of experimentation": The ongoing exploration and exploitation of CRISPR-Cas immune systems [J]. *CRISPR J*, 2018, 1(2): 141–158.
- [3] MAKAROVA KS, WOLF YI, ALKHNABASHI OS, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722–736.
- [4] HILLE F, RICHTER H, WONG SP, *et al.* The biology of CRISPR-Cas: Backward and forward [J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239–1259.
- [5] WRIGHT AV, NUNEZ JK, DOUDNA JA. Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature's toolbox for genome engineering [J]. *Cell*, 2016, 164(1-2): 29–44.
- [6] KOONIN EV, MAKAROVA KS, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 67–78.
- [7] ZHANG Y, WU Y, WU Y, *et al.* CRISPR-Cas systems: From gene scissors to programmable biosensors [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2021, 137: 116210
- [8] SHMAKOV S, ABUDAYYEH OO, MAKAROVA KS, *et al.* Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(3): 385–397.
- [9] HATOUM-ASLAN A. CRISPR methods for nucleic acid detection herald the future of molecular diagnostics [J]. *Clin Chem*, 2018, 64(12): 1681–1683.
- [10] CHEN M, CALIN GA, MENG QH. Circulating micro-RNAs as promising tumor biomarkers [J]. *Adv Clin Chem*, 2014, 67: 189–214.

- [11] FINOTTI A, FABBRI E, LAMPONTI I, *et al.* Micro-RNAs and long non-coding RNAs in genetic diseases [J]. *Mol Diagn Ther*, 2019, 23(2): 155–171.
- [12] 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]. *J Pharm Biomed*, 2021, 192: 113645.
- [13] CHEN JS, MA E, HARRINGTON LB, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436–439.
- [14] MALIK A, GUL A, MUNIR F, *et al.* Evaluating the cleavage efficacy of CRISPR-Cas9 sgRNAs targeting ineffective regions of *Arabidopsis thaliana* genome [J]. *Peer J*, 2021, 9: e11409.
- [15] KIM D, HAGER M, BRANT E, *et al.* Efficient genome editing in wheat using Cas9 and Cpf1 (AsCpf1 and LbCpf1) nucleases [J]. *Funct Integr Genomic*, 2021,
- [16] LIU L, LI X, MA J, *et al.* The molecular architecture for RNA-Guided RNA cleavage by Cas13a [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 714–726.
- [17] KNOTT GJ, DOUDNA JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering [J]. *Science*, 2018, 361(6405): 866–869.
- [18] KUNDERT K, LUCAS JE, WATTERS KE, *et al.* Controlling CRISPR-Cas9 with ligand-activated and ligand-deactivated sgRNAs [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2127.
- [19] KLUESNER M, LAHR W, LONETREE CL, *et al.* CRISPR-Cas9 cytidine and adenosine base editing of splice-sites mediates highly-efficient disruption of proteins in primary cells [EB/OL]. [2021-04-18]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.16.045336v1> [2021-06-04].
- [20] JINEK M, JIANG F, TAYLOR DW, *et al.* Structures of Cas9 Endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation [J]. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997.
- [21] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA CM, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [22] GARNEAU JE, DUPUIS ME, VILLION M, *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71.
- [23] 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.
- [24] SAMPSON TR, SAROJ SD, LLEWELLYN AC, *et al.* A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence [J]. *Nature*, 2013, 497(7448): 254–257.
- [25] HENDEL A, FINE EJ, BAO G, *et al.* Quantifying on- and off-target genome editing [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(2): 132–140.
- [26] KIM HS, HWANG GH, LEE HK, *et al.* CRISPR-Cas9: A highly accurate and multiplexable method for genome-wide mapping of lentiviral integration sites [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 20: 792–800.
- [27] ZETSCHKE B, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771.
- [28] MCALLISTER KN, SORG JA. CRISPR genome editing systems in the genus *Clostridium*: A timely advancement [J]. *J Bacteriol*, 2019, 201(16): e00219–00219.
- [29] SWARTS DC, JINEK M. Mechanistic insights into the cis- and trans-acting DNase activities of Cas12a [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(3): 589–600.
- [30] 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.
- [31] BROUGHTON JP, DENG X, YU G, *et al.* CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 870–874.
- [32] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, LEE JW, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438–442.
- [33] LI Y, LI S, WANG J, *et al.* CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(7): 730–743.
- [34] MAKAROVA S, ZHANG F, KOONIN EV. Snapshot: Class 1 CRISPR-Cas systems [J]. *Cell*, 2017, 168(5): 941–946.
- [35] QIN P, PARK M, ALFSON K J, *et al.* Rapid and fully microfluidic Ebola virus detection with CRISPR-Cas13a [J]. *ACS Sens*, 2019, 4(4): 1048–1054.
- [36] TAMBE A, EAST-SELETSKY A, KNOTT GJ, *et al.* RNA binding and HEPN-Nuclease activation are decoupled in CRISPR-Cas13a [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(4): 1025–1036.
- [37] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL MR, KNIGHT SC, *et al.* Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. *Nature*, 2016, 538(7624): 270–273.
- [38] SCHARF A, LANG C, FISCHER M. Genetic authentication: Differentiation of fine and bulk cocoa (*Theobroma cacao* L.) by a new CRISPR/Cas9-based *in vitro* method [J]. *Food Control*, 2020, 114. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107219
- [39] LIU H, WANG J, ZENG H, *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 Chem*, 2021, 334: 127608.
- [40] BOOTH D, KING N. Genome editing enables reverse genetics of multicellular development in the choanoflagellate *Salpingoeca rosetta* [EB/OL]. [2020-06-04]. <https://elifesciences.org/articles/56193> [2021-06-04].
- [41] BARRANGOU R, DUDLEY EG. CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2016, 7(1): 395–411.
- [42] 陈秀云, 何泳媚, 许雪荷, 等. 3 种食品致病菌实时荧光核酸恒温扩增试剂盒方法验证对比研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(3): 1047–1052.
- CHEN XY, HE YM, XU XH, *et al.* Validation comparison analysis of 3 kinds of food pathogens simultaneous amplification and testing kit methods [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(3): 1047–1052.
- [43] MONTE DFM, NETHERY MA, BARRANGOU R, *et al.* Whole-genome

- sequencing analysis and CRISPR genotyping of rare antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from food and related sources [J]. Food Microbiol, 2021, 93: 103601.
- [44] DONGEN JE, BERENDSEN JTW, STEENBERGEN RDM, *et al.* Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: Recent advances, challenges and opportunities [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 166: 112445.
- [45] WANG L, SHEN X, WANG T, *et al.* A lateral flow strip combined with Cas9 nickase-triggered amplification reaction for dual food-borne pathogen detection [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 165: 112364.
- [46] CHAIJARASPHONG T, THAMMACHAI T, ITSATHITPHAISARN O, *et al.* Potential application of CRISPR-Cas12a fluorescence assay coupled with rapid nucleic acid amplification for detection of white spot syndrome virus in shrimp [J]. Aquaculture, 2019, 512: 734340.
- [47] PENG L, ZHOU J, YIN L, *et al.* Integration of logic gates to CRISPR/Cas12a system for rapid and sensitive detection of pathogenic bacterial genes [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1125: 162–168.
- [48] WOO C, JANG S, SHIN G, *et al.* Sensitive one-step isothermal detection of pathogen-derived RNAs [EB/OL]. [2020-03-12]. <https://doi.org/10.1101/2020.03.05.20031971> [2021-06-04].
- [49] ZHANG T, ZHOU W, LIN X, *et al.* Light-up RNA aptamer signaling-CRISPR-Cas13a-based mix-and-read assays for profiling viable pathogenic bacteria [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 176: 112906.
- [50] 王梓莹, 但琨, 施远国, 等. 非洲猪瘟病毒的快速检测方法研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 165–170.
- WANG ZY, DAN K, SHI YG, *et al.* Research progress on rapid detection methods of African swine fever virus [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(10): 165–170.
- [51] HE Q, YU D, BAO M, *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]. Biosens Bioelectron, 2020, 154: 112068.
- [52] TAO D, LIU J, NIE X, *et al.* Application of CRISPR-Cas12a enhanced fluorescence assay coupled with nucleic acid amplification for the sensitive detection of african swine fever virus [J]. ACS Synth Biol, 2020, 9(9): 2339–2350.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

### 作者简介



曹青, 硕士, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: [cjing2771@163.com](mailto:cjing2771@163.com)



何庆华, 博士, 副教授, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: [Qinghua.he@szu.edu.cn](mailto:Qinghua.he@szu.edu.cn)