# CRISPR-Cas12a 在食源性致病菌检测中的应用

卜祥逢<sup>1</sup>,蒋 静<sup>2</sup>,薛俊欣<sup>2</sup>,吴瑜凡<sup>3</sup>,董庆利<sup>1</sup>,王 翔<sup>1\*</sup>

(1. 上海理工大学健康科学与工程学院,上海 200093; 2. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135; 3. 华东理工大学化学与分子工程学院,上海 200237)

**摘 要:** 食源性致病菌快速检测方法对食源性疾病的高效预防和控制具有重要意义。CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)及相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)构成的 CRISPR-Cas 系统是一种强大的基因编辑工具,基于其对靶标核酸的特异性识别及切割活性,应用于食源性致病菌检测中,已成为快速检测方法研究的热点。CRISPR-Cas12a 检测技术具有特异性强、灵敏性高的优点,在食源性致病菌的检测中有着巨大的应用前景。本文主要介绍了 CRISPR-Cas12a 的作用机制,重点综述了 CRISPR-Cas12a 结合多种核酸扩增技术在食源性致病菌检测中的研究进展,进一步讨论了 CRISPR-Cas12a 在致病菌检测中存 在的问题和不足,对未来的研究前景进行了展望,以期为更好地开发准确、快速灵敏的食源性致病菌检测技术 提供参考和依据。

关键词: CRISPR-Cas12a; 核酸检测; 食源性致病菌; Cas 蛋白

# **Application of CRISPR-Cas12a in the detection of foodborne pathogens**

BU Xiang-Feng<sup>1</sup>, JIANG Jing<sup>2</sup>, XUE Jun-Xin<sup>2</sup>, WU Yu-Fan<sup>3</sup>, DONG Qing-Li<sup>1</sup>, WANG Xiang<sup>1\*</sup>

(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Technology Center for Animal Plant and Food Inspection and Qurantine, Shanghai Customs, Shanghai 200135, China; 3. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**ABSTRACT:** Rapid detection methods for foodborne pathogens are important for efficient prevention and control of foodborne diseases. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and its associated proteins constitute the CRISPR-Cas system, a powerful gene editing tool, which has become a hot spot for research on rapid detection methods based on its specific recognition and cleavage activity of target nucleic acids when applied to the detection of foodborne pathogens. CRISPR-Cas12a detection technology has the advantages of high specificity and sensitivity, and has great application in the detection of foodborne pathogens. This paper introduced the mechanism of action of CRISPR-Cas12a, focused on the research progress of CRISPR-Cas12a combined with various nucleic acid amplification techniques in the detection, and provided an outlook on the future research prospects. In order to provide a reference and basis for better development of accurate, rapid and sensitive detection techniques for foodborne pathogens. **KEY WORDS:** CRISPR-Cas12a; nucleic acid detection; foodborne pathogens; Cas protein

基金项目: 上海市科技兴农项目(2022-02-08-00-12-F01089)

Fund: Supported by the Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (2022-02-08-00-12-F01089)

<sup>\*</sup>通信作者:王翔,博士,副教授,主要研究方向为食品微生物安全。E-mail: xiang.wang@usst.edu.cn

<sup>\*</sup>Corresponding author: WANG Xiang, Ph.D, Associate Professor, University of Shanghai for Science and Technology, No.516, Jungong Road, Shanghai 200093, China. E-mail: xiang.wang@usst.edu.cn

# 0 引 言

目前,食品安全问题依然是全球面临的重要挑战之一。其中,以沙门氏菌、致病性大肠埃希氏菌、弯曲菌等 为代表的食源性致病菌严重威胁着消费者的健康,由其引 起的食源性疾病近年来呈上升趋势<sup>[1]</sup>。快速、灵敏且准确 的检测方法对于实现相关食源性疾病的源头控制至关重 要。传统的微生物检测方法需要经过增菌、选择性培养、 纯化、生化反应鉴定等步骤,存在过程烦琐、耗时费力等 不足<sup>[2-3]</sup>,无法满足食源性致病菌快速防控的需要。在过去 几十年中,针对食源性致病菌的快速检测技术发展迅速且 应用广泛,如基于核酸扩增、杂交的分子检测技术,基于 抗原抗体特异性结合的免疫学检测技术,基于光谱学特征 的光谱检测技术<sup>[4-6]</sup>。近些年来核酸扩增结合 CRISPR-Cas 系统的检测方法因其高特异性、高灵敏度、易操作和多功 能性等优点受到广泛关注。

CRISPR-Cas 系统由规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)构成, 是细菌和古细菌中发现的一种获得性免疫系统<sup>[7]</sup>。近些年 发现的 Cas12、Cas13 和 Cas14 蛋白在 CRISPR RNA (crRNA) 或向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA)引导下, 具有序列 特异性识别、核酸内切酶活性和靶标激活的反式切割活性。 即这些Cas 蛋白与 crRNA 所形成的复合物在特异性识别靶 标后,可以激活对 ssDNA 或 ssRNA 的反式切割活性。基 于此原理,设计合适的报告探针(如荧光-猝灭基团修饰)即 可用于核酸检测。但由于样本中的靶细菌数量通常较低, CRISPR-Cas 方法常需结合核酸扩增技术实现检测的目的。 结合两者的优点,首先通过核酸预扩增丰富分子靶标,然 后由 RNA 引导的 Cas 蛋白识别并切割扩增子的特定序列 而产生扩增的检测信号。在众多的 CRISPR-Cas 系统中, CRISPR-Cas12a 系统具有精确的核酸靶向和切割功能,可 以较容易地与各种基于核酸扩增的信号放大技术结合,大 大提高了该系统的检测灵敏度和特异性,因而在食源性致 病菌检测中也是使用最广泛的<sup>[8]</sup>。相比之下, Cas9 不具有 反式切割活性,无法产生便捷的检测信号;Cas13的靶标核 酸是 RNA, 多出了 DNA 到 RNA 的转录操作步骤。因此, 本文主要围绕CRISPR-Cas12a结合核酸扩增技术在食源性 致病菌检测中的研究展开综述,并讨论了其在检测中存在 的问题和挑战以及对未来的展望, 以期为食源性致病菌快 速检测技术的研究和应用提供参考。

#### 1 CRISPR-Cas12a 检测原理

在 CRISPR-Cas 系统中, CRISPR 序列被转录为前 CRISPR RNA (pre-crRNA),并进一步加工为成熟的 crRNA, 形成 sgRNA。随后在 sgRNA 的引导下, Cas 蛋白识别靶标

核酸中的前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM),并切割靶标核酸<sup>[9]</sup>。而 CRISPR-Cas12a 系统由成 熟的 crRNA 直接激活,不需要反式激活 crRNA 参与 sgRNA 的合成。含有 RuvC 的核酸酶结构域的 crRNA-Cas12a 二元复合物通过识别富含 T 的 PAM 序列激活并切 割靶标核酸<sup>[10-11]</sup>,虽然复合物对 dsDNA 的识别需要 PAM 位点,但识别 ssDNA 时不受 PAM 位点的限制<sup>[12]</sup>。只有当 crRNA-Cas12a 复合物与使用各种核酸扩增技术产生的靶 标核酸结合时,它才产生强大的非特异性 ssDNA 反式切割 活性<sup>[13]</sup>(图 1)。



图 1 Cas12a 识别靶标 DNA 的过程示意图<sup>[13]</sup> Fig.1 Schematic representation of the process of target DNA recognition by Cas12a<sup>[13]</sup>

## 2 PCR与CRISPR-Cas12a结合

PCR 是一种最为常用的体外核酸扩增技术,以特定的 核酸序列为靶标,在与靶 DNA 互补的一对引物的作用下,经 过变性、退火、延伸3个步骤的重复循环进行扩增<sup>[14]</sup>。使用 靶 DNA 作为激活剂,可以实现基于 CRISPR-Cas12a 的核 酸检测,如果不结合任何核酸扩增技术,最低可检测浓度 为 0.1 nmol/L。然而,当与 PCR 结合使用时,检测的浓度 可低至 10 amol/L<sup>[15]</sup>。近年来, CRISRP-Cas12a 结合 PCR 技 术对常见食源性致病菌的检测已广泛开展(表 1)。

针对食源性致病菌的特异基因片段进行 PCR 扩增, 如金黄色葡萄球菌的 femA 基因、痢疾志贺氏菌的 ipaH 基 因,用扩增的特异 DNA 片段激活 CRISPR-Cas12a 对 ssDNA 的切割活性<sup>[16-17]</sup>。这些 ssDNA 可以连接特殊的标 记,以实现可以观察或检测的信号。最常用的标记方法就 是使用荧光-猝灭基团进行标记。通过荧光检测设备可以观 察信号并判断靶细菌的存在与否。

PCR 扩增后, 在将 DNA 扩增子转移到 CRISPR-Cas12a 系统进行 Cas 蛋白切割的过程中容易发生气溶胶污 染, 使用液体石蜡进行物理隔绝是解决这一问题的常用方 法。LI 等<sup>[18]</sup>用 10 μL 液体石蜡覆盖 PCR 反应溶液。PCR

Table 1         Study of CRISPR-Cas12a combined with PCR in the detection of foodborne pathogens								
目标菌	检出限	信号	检测时间/min	参考文献				
金黄色葡萄球菌	10 <sup>3</sup> CFU/mL	荧光	120	[16]				
痢疾志贺氏菌	10 amol/L	荧光	120	[17]				
单增李斯特菌血清型 4c	$3.37 \times 10^1 \text{ CFU/mL}$	荧光	120	[18]				
副溶血性弧菌	1.02×10 <sup>2</sup> 拷贝/µL	荧光	90	[19]				
沙门氏菌、阪崎克罗诺杆菌	3.1×10 <sup>1</sup> 拷贝/µL	荧光	75	[20]				
大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	3 nmol/L	电化学	90	[21]				
沙门氏菌	1 CFU/mL	比色	60	[22]				

	表 1	CRISPR-Cas12a 结合 PCR 在食源性致病菌中的研究
e 1	Study of CRI	SPR-Cas12a combined with PCR in the detection of foodborne natho

扩增后,将 Cas12a 介导的裂解混合物加入到管壁上,然 后离心到反应溶液中。除了用液体石蜡隔绝 PCR 反应溶 液之外,还可以在试管盖上预装 CRISPR-Cas12a 试剂, 在盖子未关闭的情况下进行 PCR 扩增,扩增后离心混合 试剂<sup>[19]</sup>。然而,这依然需要开管操作。张文娟<sup>[20]</sup>利用海 藻糖提高蛋白质热稳定性、矿物油隔热和 PCR 仪管盖控 温等三重操作,实现了 PCR 扩增反应和 CRISPR-Cas12a 检测的闭管联用。

CRISPR-Cas12a 的加入不仅提高了对 PCR 扩增子的 检测灵敏度和特异性,而且丰富了信号输出模式。在金电 极表面上修饰的 ssDNA 报告探针阻碍了电极和溶液之间 的电子交换, PCR 扩增子激活的 Cas12a 可以切割所修饰 的 ssDNA 报告探针,从而导致电荷的转移电阻降低<sup>[21]</sup>, 使用电化学阻抗法测量 CRISRP-Cas12a 切割前后的阻抗 值变化。MA 等<sup>[22]</sup>报道了一种双信号输出模式的检测方 法,使用 ssDNA 连接两个金纳米颗粒(gold nanoparticle, AuNP)探针对(用 DNA1 和 DNA2 修饰),在 CRISPR-Cas12a 对其切割前后会产生聚集到分散的变化(图 2)。温 和离心后,上清液可以产生更明显的颜色变化,用肉眼 即可以辨别,可使用便携式色度计记录结果。同时用红外 热像仪记录 AuNP 在 808 nm 处的光热效应,以达到交叉 验证的目的。

# 3 等温扩增技术与 CRISPR-Cas12a 结合

虽然 PCR 技术的应用更为成熟,但是对快速热循环和高变性温度的要求限制了 PCR 的非实验室应用。为了摆脱对高端控温设备的依赖,实现检测方法的现场应用,研究者开发了诸多等温核酸扩增方法,包括环介导等温扩增(loop mediated isothermal amplification, LAMP)、滚环等温 扩增(rolling circle amplification, RCA)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)和重组酶介导 等温扩增(recombinase-aided amplification, RAA)等。基于 CRISPR-Cas12a 对靶标的特异性识别,结合不同的等温扩 增技术所开发的食源性致病菌检测方法,展现出更好的灵 敏性和特异性。CRISPR-Cas12a 结合不同的等温扩增技术 检测沙门氏菌、志贺氏菌等常见的食源性致病菌研究广泛 (表 2)。



图 2 CRISPR-Cas12a 生物传感器用于比色法和光热效应检测的 原理<sup>[22]</sup>

Fig.2 Principles of the CRISPR-Cas12a biosensor for colorimetric and photothermal<sup>[22]</sup>

Table	Table 2         Study of CRISPR-Cas12a combined with isothermal amplification in the detection of foodborne pathogens						
扩增法	目标菌株	检出限	信号	检测时间/min	参考文献		
LAMP	沙门氏菌	2 拷贝/μL	荧光	60	[20]		
	志贺氏菌	4 拷贝/μL	荧光	40	[23]		
	大肠杆菌 O157:H7	1.22 CFU/g	荧光	70	[24]		
	空肠弯曲菌	8 CFU/mL	荧光	70	[25]		
	鼠伤寒沙门氏菌	$8 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$	荧光	60	[26]		
	铜绿假单胞菌	1 CFU/mL	比色	50	[27]		
	副溶血性弧菌	30 拷贝/反应	荧光	50	[28]		
	副溶血性弧菌	$6.1 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$	比色	100	[29]		
	单增李斯特菌	10 拷贝/µL	荧光	45	[30]		
	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	1 CFU/mL	荧光	50	[31]		
	单增李斯特菌	10 CFU/mL	荧光	50	[32]		
	沙门氏菌	1 CFU/mL	比色	180	[33]		
RPA	鼠伤寒沙门氏菌	1 CFU/mL	荧光	60	[34]		
	大肠杆菌 O157:H7	$6.5 \times 10^4 \text{ CFU/mL}$	荧光	70	[35]		
	金黄色葡萄球菌	3 amol/L	荧光	20	[36]		
	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	10 拷贝/反应	荧光	20	[37]		
	鼠伤寒沙门氏菌	4 CFU/mL	拉曼	45	[38]		
RAA	单增李斯特菌血清型 4c	$1.35 \times 10^2 \text{ CFU} / \text{mL}$	荧光	60	[18]		
	创伤弧菌	2拷贝/反应	荧光	40	[39]		
	金黄色葡萄球菌	1 CFU/mL	比色	62	[40]		
	金黄色葡萄球菌	$5.4 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$	荧光	70	[41]		
	单增李斯特菌	$2.6 \times 10^1 \text{ CFU/mL}$	电化学	120	[42]		
	副溶血弧菌	10 <sup>3</sup> CFU/mL	荧光	60	[43]		
RCA	大肠杆菌 O157:H7	10 CFU/mL	电化学		[44]		
	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	10 <sup>2</sup> CFU/mL	荧光	80	[45]		
	副溶血性弧菌	3.6 CFU/mL	荧光	65	[46]		

表 2 CRISPR-Cas12a 结合等温扩增技术在食源性致病菌中的研究

#### 3.1 环介导等温扩增

LAMP核酸扩增技术需要链置换 Bst DNA 聚合酶和 4 个 DNA 引物,其允许在恒定温度(60~65°C)下进行自动循 环扩增<sup>[47]</sup>。这种等温扩增技术已经广泛与 CRISPR-Cas12a 方 法 进 行 结 合 ,在 开 发 的 大 多 数 检 测 方 法 中 , CRISPR-Cas12a 主要是用于检测 LAMP 扩增子,从而为该 检测体系提供了更高的灵敏度。SHI 等<sup>[23]</sup>通过 LAMP 和 Cas12a 的偶联,对志贺氏菌的检测可以在 40 min 内达到 4 拷贝/µL 的检出限,其结果在蓝光 LED 下通过肉眼即可观 察。但是在对实际样品的应用过程中,食品基质对整个反 应体系的干扰以及少量的食源性致病菌核酸的难以分离, 导致分子检测的优势无法发挥<sup>[48]</sup>。针对此问题,可以使用 浓缩过滤<sup>[24]</sup>、免疫磁珠捕获<sup>[25]</sup>等方法解决或改善。

LAMP的最适反应温度在 60~65℃, 而 Cas12a 的最适 反应温度在 37℃, 两者相差较大, 不相容的温度很难在同 一体系进行检测。有研究发现海藻糖能够提高 Cas12a 的反 应温度, 同时海藻糖具有的高黏度能够将 CRISPR-Cas12a 试剂固定在管盖内部, 实现了物理隔离两种反应体系的目 的, 通过优化反应温度, 最终选取 54℃作为 LAMP 的反应 温度, 且在此温度下不影响管盖处 Cas 蛋白的活性, 对检 测体系的灵敏度和特异性也没有影响<sup>[20]</sup>。

为了提高 LAMP 结合 CRISPR-Cas12a 检测方法的现场 可使用性, WU 等<sup>[26]</sup>开发了一种可以在家中使用的聚丙烯核 酸检测袋。该袋包含裂解室、洗涤室和扩增/检测室 3 个腔室,可以将核酸检测的整个过程集成在一个封闭的空间内, 检测结果可以在便携式紫外线灯的帮助下用肉眼读取。 MUKAMA 等<sup>[27]</sup>设计了一种便携式层析试纸条,将 LAMP 扩增和 CRISPR-Cas12a 切割后的混合反应液添加到试纸条 进行检测。对于阳性样品是观察不到 T 线的,因为生物素化 的 ssDNA 报告探针已经被靶标激活的 CRISPR-Cas12a 切割, 无法再与 T 线上的捕获探针互补配对。

## 3.2 重组酶聚合酶扩增

RPA 是一种具有高灵敏度、高特异性等特点的代表性 等温扩增技术<sup>[49]</sup>,用重组酶活性打开 DNA 分子的双链, 并利用链置换活性对目标 DNA 进行扩增。在 37~42℃的温 度范围内,可以在 20~30 min 内完成扩增。

RPA和CRISPR-Cas12a的反应温度相近,可以较容易 整合到一个检测系统中。结合 RPA 已经开发了一系列基于 CRISPR-Cas12a 的食源性致病菌检测方法。使用 RPA 对靶 DNA 进行扩增, 然后将 RPA 扩增产物用作激活剂以启动 CRISPR-Cas12a 对所设计的 ssDNA 报告探针进行切割,对 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和单增斯特菌的检测灵敏度为 10 拷贝<sup>[30]</sup>。上述检测方法中 RPA 扩增和 CRISPR-Cas12a 检测是分开操作的,为了避免额外开盖过程造成气溶胶 污染的风险。通过将 RPA 试剂、crRNA 和 ssDNA-FQ 报 告探针整合到单个反应体系中, RPA 扩增之后将将管壁 上的Cas12a离心到反应体系中来启动对报告探针的切割, 该方法的检出限 1 CFU/mL, 优于常用的检测方法<sup>[31]</sup>。 TIAN 等<sup>[32]</sup>也报道了类似的单管检测方法,将 RPA 扩增和 CRISPR-Cas12a 系统整合到由胰岛素注射器和 Eppendorf 管组成的微推进反应器中,由密封膜密封。通过推动注射 器可以将预装在顶部的CRISPR-Cas12a系统与底部的RPA 试剂进行混合。

为了满足现场检测的需要,一种可以通过智能手机 读取检测结果的方法被设计出来<sup>[33]</sup>。靶标不存在时,设计 的富含鸟嘌呤序列的 ssDNA 是完整的。加入钾离子可以使 其形成稳定的 G-四链体 DNAzyme。在氯化血红素存在时, 这种 DNAzyme 可以催化 TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的反应,产生颜色变 化和 454 nm 处吸光度增加,这种变化可以很容易地被肉 眼和智能手机识别出来。对沙门氏菌展现出良好的灵敏性, 唯一的缺点是耗时偏长(表 2)。

## 3.3 重组酶介导等温扩增

重组酶辅助等温扩增主要依赖 3 种酶:单链 DNA 结合 蛋白(single-stranded DNA-binding protein, SSB)、具有独立置 换能力的 DNA 聚合酶和重组酶。重组酶与引物形成重组酶 -引物复合物,可以识别 dsDNA 中与该引物同源的序列片 段。一旦识别,就会发生链置换反应启动 DNA 的合成。SSB 与被置换的单链结合,防止其重新杂交成 dsDNA<sup>[50]</sup>。 另外, Cas12a 对 ssDNA 的反式切割活性, 使得致病菌 检测中不同应用的信号输出模式成为了可能。选择荧光-猝灭基团标记的 ssDNA 作为报告探针是最为常用的一种 方法。LI 等<sup>[18]</sup>结合 RAA 和 CRISPR-Cas12a 开发了一种荧 光检测方法。在管底的 RAA 扩增之后,将管盖内的 CRISPR-Cas12a 试剂离心到管底以激活 Cas12a 对 ssDNA 报告探针的切割, 从而释放出荧光信号。XIAO 等<sup>[39]</sup>开发 的荧光检测方法,其结果借助紫外手电筒即可肉眼观察, 检测灵敏度与 qPCR 相当。

为了实现检测方法的现场应用,研究人员对 CRISPR-Cas12a 结合 RAA 的方法进行了诸多尝试。基于 纸张的横向流动检测为食源性致病菌的快速自我检查提供 了一种易于操作的便携式工具。QIAN 等<sup>[40]</sup>结合 RAA 报道 了一种基于 CRISPR-Cas12a 的横向流动检测方法, 使用 RAA 扩增子激活 Cas12a 的对 ssDNA 探针的切割。设计的 FAM-ssDNA-Biotin 探针在靶 DNA 不存在时是完整的,可 以与结合垫上修饰有胶体金的抗 FAM 抗体结合, 随后在 C 线被捕获,因胶体金聚集而呈现红色。而当靶 DNA 存在时, ssDNA 报告探针被 CRISPR-Cas12a 切割, 分别产生 FAM 和Biotin修饰的两个部分。FAM-ssDNA在结合垫与抗FAM 抗体结合后流入T线,并被抗lgG抗体捕获,使T线变红。 同样是基于纸张的横向流动检测金黄色葡萄球菌,与之不 同的是金纳米颗粒被具有更高荧光和更稳定性的功能化量 子点(quantum dot, QD)所取代<sup>[41]</sup>。在靶标不存在的情况下, QDs-SA-Biotin-ssDNA 报告探针在 T线上被 ssDNA 捕获探 针捕获。然后通过 Biotin-BSA 在 C 线上捕获过量的 QDs-SA,并且通过肉眼和荧光读数仪可以检测到T线和C 线上的信号。靶标存在的情况下, QDs-SA-Biotin-ssDNA 报 告探针被切割无法在 T 线上产生任何信号的积累, 而 C 线 产生明显的荧光信号。由于快速、准确、灵敏和高特异性, 电 化学信号输出很适合应用于 CRISPR-Cas12a 的检测中。将 亚甲蓝(methylene blue, MB)标记的 ssDNA 报告探针拴在金 电极表面上<sup>[42]</sup>。靶标存在时会激活 Cas12a 的反式切割活性, MB-ssDNA 报告探针被切割后会释放出 MB, 从而产生低电 化学电流。靶标不存在时, MB-ssDNA 报告探针是完整的, 保持着高电化学电流。在这个过程中,通过方波伏安法可获 得目标核酸进入该检测体系前后的电化学信号。

### 3.4 滚环等温扩增

滚环等温扩增技术是一种简单、高效的分子扩增技术。在 RCA 过程中,引物与环状 ssDNA 模板进行互补配对,在 DNA 聚合酶的作用下,引物的 3'端沿着模板 DNA 延伸,沿模板 DNA 旋转一周后到达引物的 5'端,在链置换聚合酶的作用下使 5'端翘起,继续沿着模板 DNA 延伸,短时间内可以产生具有数十至数百个串联重复序列的长 ssDNA<sup>[51-53]</sup>。Cas12a 的反式切割活性可以被 dsDNA 和

ssDNA 激活,通过使用 CRSPIR-Cas12a 检测 RCA 的单链 产物,可以构建高灵敏度和特异性的致病菌检测方法。

与前面所述扩增致病菌的特定核酸以产生激活 Cas12a-crRNA 复合物的 dsDNA 不同。CRISPR-Cas12a 结 合 RCA 是根据自己的设计,扩增出包含靶菌适配子的 ssDNA,或者设计的适配子能在与靶菌结合后启动RCA扩 增,同时引入免疫磁珠以形成三明治复合物。例如,使用 RCA 生成具有大肠杆菌 O157:H7 特异性适配子和靶向重 复序列的长 ssDNA,允许识别和结合大肠杆菌 O157:H7 以 及 crRNA-Cas12a 复合物。被激活的 Cas12a 会切割金电极 表面 MB 标记的 ssDNA 发夹探针,改变峰值电流<sup>[44]</sup>。而 XU 等<sup>[45]</sup>则设计了两种功能性适配子(Apt-A 和 Apt-B),用 链霉素亲和素磁珠修饰的 Apt-A,用于捕获和富集耐甲氧 西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)。用短链 DNA(阻滞剂)与 Apt-B 杂交,它可 以在 Apt-B 与 MRSA 结合后释放。释放的短链 DNA 可以 启动 RCA 扩增,产生激活 Cas12a 反式切割活性的 ssDNA。

#### 4 结束语

除了强大的基因编辑能力外, CRISPR-Cas12a 在食源 性致病菌的检测中也展现出了广阔的应用前景。结合各种 核酸扩增技术不仅提高了检测方法的灵敏度、特异性,而 且扩展了其应用范围,使其从实验室到现场成为了可能。 虽然基于CRISPR-Cas12a的致病菌检测方法已经广泛应用, 但依然存在一些不足之处。(1)虽然结合核酸扩增技术能够 提高检测的灵敏度,但是将核酸扩增子加入到Cas12a介导 的切割体系中,开盖操作很容易造成气溶胶的污染。因此, 开发闭管的一体化检测方法可以有效避免这种状况的发 生。(2)在实际样品中病原菌的检测灵敏度往往要低于在纯 培养中的检测。不排除是食品基质的干扰,复杂多样的食 品组分,很有可能会对Cas12a识别靶标以及附带的切割活 性产生影响,从而导致假阴或假阳性结果的出现。所以, 选择合理有效的前处理操作是非常有必要的,可以降低假 阴或假阳性。(3)由于 CRISPR-Cas12a 系统的高灵敏度, 很 难量化相对较高浓度的靶标, 检测信号容易达到饱和。所 开发的现场检测方法仅仅只是定性检测,通过肉眼观察就 能判定结果。那么,如何实现致病菌的现场快速定量检测, 也是未来值得深入研究的方向。(4)尽管食源性致病菌的检 测取得了实质性进展,但大多数基于 CRISPR-Cas12a 的技 术都需要扩增核酸序列以改善信号读取。无论是 PCR 还是 各种等温扩增技术都需要额外的操作步骤,并且引物的设 计和所需的试剂都需要一定的成本。因此, 未来应该考虑 如何充分利用Cas12a的反式切割活性,为了克服检测方法 的局限性, 以减少或简化核酸扩增步骤, 并进一步提升检 测信号识别的灵敏度。总体而言, CRISPR-Cas12a 检测技术 在食源性致病菌检测方面体现的优越性使其值的更深入的

研究和探索,并最终广泛应用于食源性致病菌日常监测工 作当中,为食品安全的保障提供支持。

#### 参考文献

- ABDELHASEIB MU, SINGH AK, BHUNIA AK. Simultaneous detection of Salmonella enterica, Escherichia coli and Listeria monocytogenes in food using a light scattering sensor [J]. J Appl Microbiol, 2019, 126(5): 1496–1507.
- [2] BAI X, CHEN G, WANG Z, et al. Simultaneous detection of Bacillus cereus and Staphylococcus aureus by teicoplanin functionalized magnetic beads combined with triplex PCR [J]. Food Control, 2022, 132: 108531.
- [3] GAO Y, YE Y, XU J, et al. Rapid and easy quantitative identification of Cronobacter spp. in infant formula milk powder by isothermal strand-exchange-amplification based molecular capturing lateral flow strip [J]. Food Control, 2021, 126: 108048.
- [4] LABRADOR M, GIMENEZ-ROTA C, ROTA C. Real-time PCR method combined with a matrix lysis procedure for the quantification of *Listeria monocytogenes* in meat products [J]. Foods, 2021, 10(4): 735.
- [5] LIU S, LI H, HASSAN MM, et al. SERS based artificial peroxidase enzyme regulated multiple signal amplified system for quantitative detection of foodborne pathogens [J]. Food Control, 2021, 123: 107733.
- [6] ZHAO Y, ZENG D, YAN C, et al. Rapid and accurate detection of Escherichia coli O157:H7 in beef using microfluidic wax-printed paper-based ELISA [J]. Analyst, 2020, 145(8): 3106–3115.
- [7] HILLE F, RICHTER H, WONG SP, et al. The biology of CRISPR-Cas: Backward and forward [J]. Cell, 2018, 172(6): 1239–1259.
- [8] MAO Z, CHEN R, WANG X, et al. CRISPR/Cas12a-based technology: A powerful tool for biosensing in food safety [J]. Trends Food Sci Technol, 2022, 122: 211–222.
- [9] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2012, 109(39): 2579–2586.
- [10] LIU JJ, ORLOVA N, OAKES BL, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors [J]. Nature, 2019, 566(7743): 218–223.
- [11] SINGH D, MALLON J, PODDAR A, et al. Real-time observation of DNA target interrogation and product release by the RNA-guided endonuclease CRISPR Cpf1 (Cas12a) [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2018, 115(21): 5444–5449.
- [12] YU P, YANG T, ZHANG D, et al. An all-in-one telomerase assay based on CRISPR-Cas12a trans-cleavage while telomere synthesis [J]. Anal Chim Acta, 2021, 1159: 338404.
- [13] LI SY, CHENG QX, LIU JK, et al. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA [J]. Cell Res, 2018, 28(4): 491–493.
- [14] WAN J, ZHENG L, KONG L, et al. Development of a rapid detection method for real-time fluorescent quantitative PCR of Salmonella spp. and Salmonella enteritidis in ready-to-eat fruits and vegetables [J]. LWT-Food Sci Technol, 2021, 149: 111837.
- [15] LI SY, CHENG QX, WANG JM, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic

acid detection [J]. Cell Discov, 2018, 4: 20.

- [16] 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.
- [17] 刘红. 基于 CRISPR-Cas12a 技术的病原菌检测方法的建立[D]. 海口: 海南大学, 2020.

LIU H. Pathogens diagnostics using CRISPR-Cas12a [D]. Haikou: Hainan University, 2020.

- [18] LI F, YE Q, CHEN M, et al. Cas12aFDet: A CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria* monocytogenes serotype 4c [J]. Anal Chim Acta, 2021, 1151: 338248.
- [19] ZHANG M, LIU C, 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.
- [20] 张文娟. 基于 CRISPR-Cas12a 的食源性致病菌闭管核酸扩增检测方法 研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.
   ZHANG WJ. Study on CRISPR-Cas12a-based closed-tube LAMP/PCR detection method for food-borne pathogenic bacteria [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2021.
- [21] BONINI A, POMA N, VIVALDI F, et al. A label-free impedance biosensing assay based on CRISPR/Cas12a collateral activity for bacterial DNA detection [J]. J Pharmaceut Biomed, 2021, 204: 114268.
- [22] MA L, PENG L, YIN L, et al. CRISPR-Cas12a-powered dual-mode biosensor for ultrasensitive and cross-validating detection of pathogenic bacteria [J]. ACS Sens, 2021, 6(8): 2920–2927.
- [23] SHI Y, KANG L, MU R, et al. CRISPR/Cas12a-enhanced loop-mediated isothermal amplification for the visual detection of *Shigella flexneri* [J]. Front Bioeng Biotech, 2022, 10: 845688.
- [24] LEE SY, OH SW. Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid, sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Talanta, 2022, 241: 123186.
- [25] LI C, CHEN X, WEN R, et al. Immunocapture magnetic beads enhanced the LAMP-CRISPR/Cas12a method for the sensitive, specific, and visual detection of *Campylobacter jejuni* [J]. Biosensors, 2022, 12(3): 154.
- [26] WU H, CHEN YJ, SHI Y, et al. Carrying out pseudo dual nucleic acid detection from sample to visual result in a polypropylene bag with CRISPR/Cas12a [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 178: 113001.
- [27] MUKAMA O, WU J, LI Z, et al. An ultrasensitive and specific point-of-care CRISPR/Cas12 based lateral flow biosensor for the rapid detection of nucleic acids [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 159: 112143.
- [28] WU H, CHEN Y, YANG Q, et al. A reversible valve-assisted chip coupling with integrated sample treatment and CRISPR/Cas12a for visual detection of Vibrio parahaemolyticus [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 188: 113152.
- [29] CHEN XY, 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]. Anal Chem, 2021, 93(42): 14300–14306.
- [30] 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.

- [31] WANG Y, KE Y, LIU W, et al. A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level [J]. ACS Sens, 2020, 5(5): 1427–1435.
- [32] TIAN Y, LIU T, LIU C, et al. An ultrasensitive and contamination-free on-site nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR-Cas12a system combined with recombinase polymerase amplification [J]. LWT-Food Sci Technol, 2021, 152: 112166.
- [33] YIN L, DUAN N, CHEN S, et al. Ultrasensitive pathogenic bacteria detection by a smartphone-read G-quadruplex-based CRISPR-Cas12a bioassay [J]. Sens Actuators B-Chem, 2021, 347: 130586.
- [34] CAI Q, WANG R, QIAO Z, 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.
- [35] WANG SJ, FAN YL, FENG Z, et al. Rapid nucleic acid detection of Escherichia coli O157:H7 based on CRISPR/Cas12a system [J]. Food Control, 2021, 130: 108194.
- [36] JIAO Z, YANG J, LONG X, et al. CRISPR/Cas12a-assisted visual logic-gate detection of pathogenic microorganisms based on water-soluble DNA-binding AIEgens [J]. Front Chem, 2022, 9: 801972.
- [37] LI Y, SHI Z, HU A, et al. Rapid one-tube RPA-CRISPR/Cas12 detection platform for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Diagnostics, 2022, 12(4): 829.
- [38] ZHUANG J, ZHAO Z, LIAN K, et al. SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods [J]. Biosens Bioelectron, 2022, 207: 114167.
- [39] XIAO X, LIN Z, HUANG X, et al. Rapid and sensitive detection of Vibrio vulnificus using CRISPR/Cas12a combined with a recombinase-aided amplification assay [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 767315.
- [40] QIAN J, HUANG D, NI D, et al. A portable CRISPR Cas12a based lateral flow platform for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* with double insurance [J]. Food Control, 2022, 132: 108485.
- [41] ZHOU BQ, YE QH, LI F, et al. CRISPR/Cas12a based fluorescenceenhanced lateral flow biosensor for detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Sens Actuators B-Chem, 2022, 351: 130906.
- [42] LI F, YE Q, CHEN M, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 179: 113073.
- [43] 卢盼,李哲,李臻鹏,等. 基于 CRISPR-Cas12a 蛋白的副溶血弧菌及 tdh 基因检测分析[J]. 疾病监测, 2022, 37(3): 390–395.
  LU P, LI Z, LI ZP, et al. Application of CRISPR-Cas12a system in detection of Vibrio parahaemolyticus and tdh gene [J]. Dis Surveill, 2022, 37(3): 390–395.
- [44] CHEN Z, MA L, BU S, et al. CRISPR/Cas12a and immuno-RCA based electrochemical biosensor for detecting pathogenic bacteria [J]. J Electroanal Chem, 2021, 901: 115755.
- [45] XU L, DAI Q, SHI Z, et al. Accurate MRSA identification through dual-functional aptamer and CRISPR-Cas12a assisted rolling circle amplification [J]. J Microbiol Meth, 2020, 173: 105917.
- [46] 董换哲,苑宁,张蕴哲,等.跨越式滚环等温扩增技术结合 CRISPR/Cas12a 定量检测海产品中的刷溶血性弧菌[J].食品科学: 1-10.

[2021-12-20]. https://kns-cnki-net.webvpn.usst.edu.cn/kcms/detail/11.2206. TS.20211220.1440.012.html.

DONG HZ, YUAN N, ZHANG YZ, *et al.* Saltatory rolling circle amplification combined with CRISPR/Cas12a for qantitative detection *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. Food Sci: 1-10. [2021-12-20]. https://kns-cnki-net.webvpn.usst.edu.cn/kcms/detail/11.2206.TS.20211220 .1440.012.html.

- [47] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects [J]. J Microbiol, 2015, 53(1): 1–5.
- [48] 白亚龙,索玉娟,周昌艳. 食源性致病菌 PCR 检测前处理方法研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 191–196.
  BAI YL, SUO YJ, ZHOU CY. A review of the development in pretreatment methods for PCR detection of food-borne pathogens [J]. Food Mach, 2017, 33(12): 191–196.
- [49] DAHER RK, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clin Chem, 2016, 62(7): 947–958.
- [50] ZHANG X, GUO L, MA R, et al. Rapid detection of Salmonella with recombinase aided amplification [J]. J Microbiol Meth, 2017, 139: 202–204.
- [51] ALI MM, LI F, ZHANG Z, et al. Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine [J]. Chem Soc

Rev, 2014, 43(10): 3324–3341.

- [52] HAO L, GU H, DUAN N, et al. A chemiluminescent aptasensor based on rolling circle amplification and Co<sup>2+</sup>/N-(aminobut3r1)-N-(ethylisolumino1) functional flowerlike gold nanoparticles for Salmonella typhimurium detection [J]. Talanta, 2017, 164: 275–282.
- [53] ZHAO W, ALI MM, BROOK MA, et al. Rolling circle amplification: Applications in nanotechnology and biodetection with functional nucleic acids [J]. Angew Chem Int Ed, 2008, 47(34): 6330–6337.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

## 作者简介



卜祥逢,硕士研究生,主要研究方向
 为食品微生物安全。
 E-mail: bxiangfeng@163.com



王 翔, 博士, 副教授, 主要研究方向 为食品微生物安全。 E-mail: xiang.wang@usst.edu.cn