# 应用于食品检测领域的分子即时 检测技术研究进展

王 薇<sup>1</sup>, 付 群<sup>2</sup>, 郑艳敏<sup>3</sup>, 王 波<sup>3</sup>, 刘 岩<sup>1</sup>, 刘 佳<sup>1</sup>, 孙万平<sup>1\*</sup>

(1. 苏州大学药学院,苏州 215000; 2. 苏州工业园区食品药品安全稽查大队,苏州 215000;3. 苏州市疾病预防控制中心,苏州 215000)

**摘 要:** 食品安全问题关系人类民生。为有效预防和控制食品安全风险,减少食品安全经济损失,迫切需要开 发出针对食源性病原体、食物掺假、转基因作物的高特异性、高敏感性、快速的核酸检测技术。即时检测 (point-of-care testing, POCT)作为一种新兴的快速检测手段,由于其检测速度快、操作简单、现场检查等特点, 在食品检测领域应用广泛。本文首先介绍了 POCT 技术的发展历史,而后根据食品安全事件的特点,从食源 性致病菌、食物掺假、转基因作物 3 个方向分析了食品检测的主要对象,阐述了分子 POCT 技术在食品检测 领域的应用现状,最后对应用于食品检测领域的分子 POCT 技术存在的问题和解决办法进行了分析总结,对 食品检测分子 POCT 技术的发展方向进行了展望。本文有助于进一步了解分子 POCT 技术在食品检测中的应 用,并为分子 POCT 技术在食品快速检测中的研究和应用提供参考。

关键词: 食品检测; 分子即时检测; 食品安全; 等温扩增技术; 成簇规律间隔短回文重复序列及其相关系统 检测技术

## Research progress of application of molecular point-of-care testing technology in the field of food detection

WANG Wei<sup>1</sup>, FU Qun<sup>2</sup>, ZHENG Yan-Min<sup>3</sup>, WANG Bo<sup>3</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, SUN Wan-Ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215000, China; 2. Suzhou Industrial Park Team of Food and Drug Safety Inspection, Suzhou 215000, China; 3. Suzhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Suzhou 215000, China)

**ABSTRACT:** Food safety is closely related to people's livelihood. In order to effectively prevent and control food safety risks and reduce economic losses of food safety, it is urgent to develop rapid detection technology of nucleic acid with high specificity, high sensitivity for foodborne pathogens, adulterated food and genetically modified crops. Point-of-care testing (POCT), as a new rapid detection method, is widely used in the field of food detection due to its characteristics of fast detection speed, simple operation and on-site inspection. This paper firstly briefly described the development history of POCT technology, and then introduced the main objects of food detection from the 3 directions of foodborne pathogens, adulterated food and genetically modified crops according to the characteristics of food safety events, and described the current application status of molecular POCT technology in the field of food detection, finally

基金项目: 苏州市科技计划项目(2022SS28、SS202043)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan Project of Suzhou (2022SS28, SS202043)

<sup>\*</sup>通信作者:孙万平,博士,副教授,主要研究方向为基因检测。E-mail: sunwanping@suda.edu.cn

<sup>\*</sup>Corresponding author: SUN Wan-Ping, Ph.D, Associate Professor, College of Pharmacy, Soochow University, Dushu Lake Campus Phase II School of Pharmacy, Industrial Park District, Suzhou 215000, China. E-mail: sunwanping@suda.edu.cn

it analyzed and summarized the existing problems and solutions of molecular POCT technology in the field of food detection, and it prospected the direction of the development of POCT technology in the field of food detection. This review will contribute to further understanding of the application of molecular POCT technology in the food detection, and provide a reference for research and application of molecular POCT technology in the rapid detection of food. **KEY WORDS:** food detection; molecular point-of-care testing; food safety; isothermal amplification technology; detection technology of clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems

## 0 引 言

随着全球食品贸易的扩大,食品安全已成为发达国家 和发展中国家共同关注的问题<sup>[1]</sup>。根据世界卫生组织调查 数据显示,全球每年有十分之一的人因食用被微生物或 化学制剂污染的食品而患病,导致6亿人患病,42万人死 亡<sup>[2]</sup>。食源性疾病严重威胁公众健康,造成巨大经济损失。 为了保证食品安全,对食品进行检测,特别是对有害物质 进行快速准确检测意义重大。

随着科学技术的发展与进步,光谱、色谱、免疫学等 检测方法逐步应用到食品检测领域,并得到了快速发展与 完善<sup>[3-4]</sup>。免疫学检测方法适用于食品中微生物产生的黄曲 霉素等毒素的检测,但此方法易出现假阳性结果并对抗体 质量要求很高<sup>[5]</sup>。随着分子生物学技术的迅速发展,基于 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的检测方 法扩增速度快、灵敏度高、特异性强<sup>[6]</sup>,适用于食品检测。 然而,这些技术均为实验室技术,依赖于专业的技术人员 和精密的仪器设备,难以满足现场即时检测(point-of-care testing, POCT)的需求。因此,面对愈来愈复杂的检测要求 和食品安全环境,建立一种高效、快捷、灵敏的 POCT 技 术应用于食品安全检测,对提升市场监管部门监管效率、 降低食品安全风险的发生具有重要意义。

POCT 又称"床旁检测""近患检验",是指在患者附近 或其所在地进行的,其结果可能导致患者的处置发生改变 的检验。目前, 食品领域 POCT 技术主要是基于核酸和免 疫的检测技术。基于免疫的 POCT 技术主要为免疫胶体金 技术,该技术成本低、操作简单、可目视观察结果,但检 测灵敏度较低,且难以实现多通路复用检测<sup>[7]</sup>,基于核酸 的POCT技术主要为等温扩增技术(isothermal amplification technology, IAT)和成簇规律间隔短回文重复序列及其相 关系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems, CRISPR/Cas systems)检 测技术, IAT 因为反应条件简单、对设备要求低、反应速度 快<sup>[8]</sup>,常作为分子 POCT 技术的首选技术手段之一; CRISPR/Cas 技术作为新兴的核酸检测技术,其操作简单、 不需要精密的仪器、检测周期短<sup>[9]</sup>,适用于分子 POCT 产品 的开发。此外, IAT 可以与 CRISPR/Cas 技术结合, 实现检测 信号双重放大,因此二者被认为是分子POCT技术的两大主 要技术路线, 广泛应用在各种核酸快速检测场景中。

本文从分子 POCT 技术发展历史出发,对该技术在食品检测领域的主要检测对象和应用现状进行阐述,并指出 这些检测技术存在的不足与解决办法,以期为进一步建立 现场快速、低成本、高灵敏度、高特异性的食品安全检测 方法提供参考。

## 1 POCT 技术简介

POCT 是指在接近患者治疗处,由未接受临床实验室 科学训练的临床人员或者患者进行自我检测、监测的临床 实验室检验。与传统检测方法相比,POCT 技术可实现快 速、即时诊断,同时,该技术操作简单,对实验人员和实验 环境没有苛刻的要求,尤其在传染病快速防控和感染性疾 病的及时治疗方面具有显著优势<sup>[10]</sup>。

POCT 技术最早应用在血糖、血气分析等少数项目。目前,POCT 技术已用于心脏标志物快速诊断<sup>[11]</sup>、尿液分析<sup>[12]</sup>、 早孕测试<sup>[13]</sup>、食品病原体筛查<sup>[14]</sup>、传染病检测<sup>[15]</sup>等众多项 目,应用场景也由医疗机构转变至家庭保健、事故灾难、 战地医疗等更灵活的场景中。近年来,分子生物学技术和 POCT 技术逐步结和建立的分子 POCT 技术,实现了"提取 -扩增-检测"过程一体化,达到了"样品进-结果出"的效果, 尤其新冠疫情期间,分子 POCT 行业成为体外诊断(*in vitro* diagnosis, IVD)行业发展最快的细分行业之一。

目前,分子 POCT 技术在食品核酸检测领域的应用主要体现在病原微生物检测、食品掺假鉴定、转基因食品鉴别3个方面,主要技术为前置扩增技术结合后续的生物传感器显色,前置扩增技术能大批量富集靶标基因片段,实现检测信号的放大,而后续的生物传感器则将检测信号转化为可视化结果。此外,手机等智能化系统也逐步被设计到分子 POCT 装置中,以实现手机读取检测结果,并通过数据存储与转发实现自我不断监测和结果异地报告<sup>[16]</sup>。

#### 2 食品安全分子检测技术的主要检测对象

食品安全关系人类健康,维护食品安全、杜绝食品安 全隐患、减少食品安全事件的发生对于维护公众健康至关 重要。微生物有害物质是指食物基质上的病原微生物产生 的对人类有害的毒素,由于病原微生物具有一定的传播性, 因此易造成大规模食品安全事件,如 2020 年广西哄抢榴 莲食物中毒事件中,500 多人中毒原因即为食用了被污染 的榴莲而导致了副溶血性弧菌感染<sup>[17]</sup>。病原微生物可通过 基于核酸扩增的方法被检测到,此外,食品掺假、转基因两大食品健康危险因素,也可通过核酸检测的方法被发现。因此,分子检测技术在食品安全领域的应用也主要体现在这3个方面。

## 2.1 病原微生物

食源性疾病是食品安全的主要威胁之一,绝大多数 疾病由病原微生物引起,其中,食源性致病菌主要包括大 肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、沙 门氏菌、志贺氏菌等<sup>[18]</sup>,食源性病毒主要包括诺如病毒、 甲型肝炎病毒等<sup>[19]</sup>。由于不同类型的病原体或其毒素会引 起不同程度的食源性疾病,因此,开发出快速、灵敏、简 便、特异的食源性致病菌检测技术已成为控制食品安全问 题的关键<sup>[20]</sup>。目前,大多数病原菌的鉴定方法仍然是细菌 培养、生化鉴定以及基于 PCR 的核酸检测技术,这些方法 均对实验仪器和操作人员提出较高要求,检测窗口期也较 长,不利于病原体的早发现、早预防。因此,将 POCT 技 术应用于食源性病原体检测,有助于及时发现病原体,以 便疾控及相关部门面对大规模食品安全事件时及时制定并 实施预防和控制措施,保障公众的健康。

#### 2.2 食品掺假

食品掺假也是食品安全的一个重要危险因素,尽管 食品安全事件的监督和处罚力度在不断加大,但食品掺假 事件仍然屡禁不止,如在羊肉制品中掺入廉价的鸭肉,在 阿胶制作过程中掺入廉价的牛皮、猪皮等,不仅损害了消 费者权益,而且可能对消费者的健康造成不良影响。目前 对于掺假食品的检测方法主要包括两大类,一类是光谱及 色谱方法,如液相色谱-质谱法<sup>[21]</sup>、红外分析方法<sup>[22]</sup>、高效 液相色谱法<sup>[23]</sup>等;另一类则是核酸检测方法,如PCR及实 时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)技术<sup>[24]</sup>、测 序技术<sup>[25]</sup>、DNA 条形码方法<sup>[26]</sup>等。如前文所述,这些方法 均依赖于专业技术人员和仪器设备,且检测时间较长,难 以及时遏制掺假食物在市场上的传播和对食品安全造成的 威胁,因此,将 POCT 技术应用于食品掺假鉴定,有助于 为市场监管部门提供市场监管和食品质量安全监管的技术 手段,提高监管效率并及时处理和解决消费者投诉问题。

### 2.3 转基因食物

随着转基因技术的发展,转基因食物在日常生活中 越来越常见。在美国,90%以上的玉米、大豆等农作物均由 转基因品种生产。转基因食物生产过程中引入的外源基因 可能会改变食物的毒性、致敏性<sup>[27]</sup>,而对人体造成伤害, 此外,抗性基因的使用也可能会对人体健康造成不利影 响。转基因食物的安全性一直受到全球的持续关注<sup>[28]</sup>。目 前,转基因产品的主要检测方式为基于 PCR 的方法<sup>[29]</sup>。随 着全世界范围内转基因植物种类和数量的增加,有效地筛 选和鉴别转基因产品需要以更多的目标序列作为鉴别靶点, 传统的 PCR 已经不能满足高通量筛选与鉴别需求。分子 POCT 技术可通过设计微流控装置实现高通量检测,因此 该技术也适用于更高要求的天然和转基因食品鉴定。

## 3 等温扩增技术在食品检测中的应用

IAT 是在恒定温度下进行核酸体外快速扩增的技术, 该技术无需复杂的热循环仪提供循环升降温过程,且反应 速度快,操作简单,因而十分适用于核酸快速检测和诊断, 是分子 POCT 诊断领域的主流技术路线之一。目前,应用 较为广泛的 IAT 主要有依赖核酸序列的扩增(nuclear acid sequence-based amplification, NASBA)、滚环扩增(rolling-circle amplification, RCA)、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)及重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)等技术。这些技术可以与各种生物传感器 联合使用,以适用于各种核酸检测场景,满足分子 POCT 技 术及食品快速检测的需求。表1比较了几种 IAT 技术在食品 检测中的应用实例。

		11	8.			
检测方法	优点	缺点	检测对象	检出限	检测时间	参考文献
实时 NASBA	特异性高、灵敏度好、适用于 RNA 靶标检测、可区分活细胞 和死细胞	需要3种酶使得反应成 本较高	沙门氏菌	0.7 CFU/mL (富集 10 h)	24 h (含富集时间)	[30]
SRCA	操作简单、避免了锁式探针的 设计和合成,降低了反应成本	检测时间较长	志贺氏菌	73 fg/µL	3 h	[31]
LAMP	引物数量多, 特异性好	引物数量多,易形成引 物二聚体或发夹结构	大肠杆菌 0157:H7	100 fg/管	60 min	[32]
LAMP-LFB	可实现自然光下可视化检测	LAMP 可能受抑制剂 影响,出现假阴性结果	产气荚膜梭菌	$10 \text{ pg/}\mu\text{L}$	24 h (含富集时间)	[33]
RPA	反应温度低, 检测速度快, 特 异性高	易出现非特异性扩增	沙门氏菌	3 CFU/mL (富集 6 h)	1 h	[34]
实时 RPA	检测速度快, 加样后无需开 盖, 避免了气溶胶污染	荧光信号依赖于特定 设备读取	猪肉、马肉	59 pg/反应、 5.4 pg/反应	15 min	[35]

表 1 IAT 技术食品检测中的应用 Table 1 Application of IAT technology in food detection

注: SRCA: saltatory rolling circle amplification, 跨越式滚环等温扩增; LFB: lateral flow biosensor, 横向流动生物传感器。

#### 3.1 NASBA 技术在食品检测中的应用

NASBA 技术是由 1 对带有 T7 启动子序列的特异性 引物引导的, 3 种酶催化的, 以单链 RNA 为模板的连续核 酸扩增技术, 该技术适用于 RNA 的检测, 但通过改变反应 过程, 可使得该反应适用于 DNA 的检测<sup>[36]</sup>。朱晓娟等<sup>[37]</sup> 将此技术用于诺如病毒的检测, 灵敏度可达 20 pg/μL。 ZHAI 等<sup>[30]</sup>开发了一种实时 NASBA 技术用于检测食品中 的沙门氏菌, 在富集 10 h 后, 检出限为 0.7 CFU/mL。由于 RNA 在死亡细胞中快速降解, 而 DNA 在无核酸酶条件下 具有很强的降解抵抗力, 未改变反应进程的 NASBA 仅对 单链 RNA 具有扩增作用, 因此该技术可用于区分活细胞 和死细胞, 具有其他核酸检测技术难以取代的优点<sup>[38]</sup>。

## 3.2 RCA 技术在食品检测中的应用

RCA 是以一小段环状寡核苷酸序列为模板, 在具有 链置换活性的 DNA/RNA 聚合酶作用下扩增产生一条长重 复单链 DNA/RNA 的技术。线性 RCA 的扩增效率可达到 10<sup>5</sup>倍,指数 RCA 的扩增效率可达到 10<sup>9</sup>倍,可实现单分子 检测水平<sup>[39-40]</sup>, 传统的 RCA 技术仅能检测单链环状 DNA, 对于线性 DNA 模板, 基于锁式探针的滚环扩增技术通过 设计两端与靶标序列互补的锁式探针序列,可在连接酶作 用下可将线性 DNA 环化, 以实现对线性 DNA 的扩增<sup>[41]</sup>。 如张健<sup>[42]</sup>建立了一种基于锁式探针的检测体系,适用于 4 种食源性致病菌的检测和鉴定, 阳性检出率高于 PCR 方法 和国家标准方法。然而,锁式探针需要较高的合成费用, 且人为环化过程增大了操作的复杂程度[43],限制了在分子 POCT 技术中的使用。SRCA 在强链置换能力的 Bst 聚合酶 作用下,以添加碱基的方式,可在没有模板的情况下合成 DNA, 以连接环状 DNA 上的间隙, 实现对线性 DNA 的扩 增与检测<sup>[44]</sup>。近年来已开发出多种 SRCA 检测技术用于掺 假物<sup>[45]</sup>、食源性致病菌的检测,如 WANG 等<sup>[31]</sup>、YANG 等<sup>[44]</sup>、MILTON等<sup>[46]</sup>分别开发出用于志贺氏菌、金黄色葡 萄球菌、产气荚膜梭菌的 SRCA 检测技术, 检测灵敏度高 于常规和定量 PCR。

## 3.3 LAMP 技术在食品检测中的应用

LAMP 技术利用一种具有高度链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,使用 4 到 6 种引物,可识别 DNA 模板上多 达 8 个特定位置,保证了该检测技术的高度特异性,其应 用范围在 IAT 中最为广泛,在食品检测领域,ZHAO 等<sup>[32]</sup> 开发出了一种基于 LAMP 的方法用于检测大肠杆菌 O157, 检测灵敏度可达 100 fg/管。YAN 等<sup>[47]</sup>建立了一种基于 LAMP 和可切割分子信标(cleavable molecular beacon, CMB)技术的检测方法用于鸡肉掺假的现场检测,检测灵 敏度可达 1.5 pg/µL。SRIDAPAN 等<sup>[33]</sup>将 LAMP 与 LFB 结 合起来,实现了对产气荚膜梭菌的目视检测,且该方法仅 需煮沸法即可粗提得到样本 DNA,但检测灵敏度仍能与 市售实时 PCR 试剂盒相当。然而,由于 LAMP 技术所需引 物数量较多,因此存在引物设计复杂、易形成二级结构等问题。

#### 3.4 RPA 技术在食品检测中的应用

RPA 技术主要依赖于能结合单链核苷酸的重组酶、单链 DNA 结合蛋白和链置换 DNA 聚合酶这 3 种酶或蛋白, 重组酶与引物结合形成蛋白-DNA 复合物,复合物在双链 DNA 中寻找同源序列,发生链交换反应并启动 DNA 合成, 以实现对靶标序列的指数式扩增<sup>[48]</sup>。RPA 可在 37℃下反应, 相较于其他等温扩增技术,有望摆脱对温控设备的依赖, 近年来有研究尝试用人体热量提供反应所需温度,实现真 正的无仪器扩增<sup>[49-50]</sup>。此外,该技术可在 15 min 内获得检测 结果,大大提高了检测速度。在食品检测领域,LI 等<sup>[34]</sup>开 发了一种光敏比色定量 RPA 法用于沙门氏菌的检测,检 出限为 5×10<sup>3</sup> CFU/mL,细菌预富集 6 h 后,检出限可降 至 3 CFU/mL。KISSENKÖTTER 等<sup>[35]</sup>构建了两种实时 RPA 检测方法用于识别肉类掺假,对猪和马的检出限分别可达 59 pg/反应和 5.4 pg/反应。

#### 4 CRISPR-Cas 检测方法在食品检测中的应用

CRISPR/Cas 系统是原核生物的一种免疫系统,用来 抵抗外源遗传物质的入侵, 如噬菌体病毒和外源质粒, 该 系统可以识别外源 DNA,并将它们切断,以阻止外源基因 的表达。CRISPR/Cas 系统起初用于基因编辑,近年来随着 Cas12、Cas13 反式切割活性的发现<sup>[51-52]</sup>, CRISPR 技术开 始逐步应用于快速检测领域,并成为体外诊断领域的研 究热点。Cas12、Cas13 识别靶标后,除了能特异性切割 靶标 DNA 和 RNA, 还能非特异性切割单链 DNA (single stranded DNA, ssDNA)或非目标 RNA, 这种特性称之为 "反式切割活性"。利用这种反式切割活性,添加发光底物 (含荧光报告基团的 ssDNA 或 RNA)可快速放大并获得检 测信号,显著提高检测效能<sup>[52-53]</sup>。此外,该技术可与前置 扩增技术结合,实现检测信号的双重放大,提高检测的特 异性与灵敏度, 使检测结果更加精准。目前, CRISPR/Cas 检测技术广泛应用于临床诊断[54]、病原微生物检测[55]及食 品安全检测[56]等多种核酸快速检测场景。表2总结了各种 CRISPR-Cas 检测系统的主要特点。

#### 4.1 CRISPR/Cas9 在食品检测中的应用

CRISPR/Cas9 可在 gRNA 作用下识别 PAM 位点而切 割 dsDNA。基于此特点,开发了 NASBACC 技术用于检测 不同亚型的寨卡病毒<sup>[57]</sup>。在食品检测领域,WANG 等<sup>[62]</sup>设 计了一种 CRISPR/Cas9 整合 LFB 的方法用于沙门氏菌的 鉴定,检测灵敏度可达 10<sup>2</sup> CFU/mL,此方法可有效消除引 物二聚体造成的假阳性结果。

此外, dCas9 作为 Cas9 蛋白的突变体, 也可用于基因 检测。dCas9 因 RuvC1 和 HNH 两个核酸酶活性区域同时 发生突变而失去了剪切酶活性, 但仍保留了特异性识别能

Table 2         Characteristics of CRISPR/Cas detection system								
Cas 蛋白	发挥核酸酶活 性的结构域		gRNA 的组分	靶标	顺式切	反式切	具有代表性的	参考
		PAM/PFS			割活性	割活性	检测平台	文献
Cas9	RuvC、HNH	富含 G 碱基	crRNA-tracrRNA	dsDNA	$\checkmark$	-	NASBACC	[57]
dCas9	失活的 RuvC、 HNH	富含G碱基	crRNA-tracrRNA	dsDNA	-	-	CRISPR-Chip	[58]
Cas12a	RuvC	富含 T 碱基	crRNA	ds/ssDNA	$\checkmark$	ssDNA	DETECTR	[52]
Cas12b	RuvC	富含 T 碱基	crRNA-tracrRNA	ds/ssDNA	$\checkmark$	ssDNA	HOLMESv2	[59]
Cas13a	两个 HEPN	PFS	crRNA	RNA	$\checkmark$	RNA	SHERLOCK	[51]
Cas13b	两个 HEPN	PFS	crRNA	RNA	$\checkmark$	RNA	SHERLOCKv2	[60]
Cas14	RuvC	-	crRNA-tracrRNA	ssDNA	$\checkmark$	ssDNA	DETECTR-Cas14	[61]

表 2 各 CRISPR/Cas 检测体系的特点 able 2 Characteristics of CRISPR/Cas detection system

注: PAM: protospacer adjacent motif, 原间隔序列相邻基序; PFS: protospacer flanking site, 原间隔区侧翼位点; gRNA: guide RNA, 向导 RNA; crRNA: CRISPR RNA, CRISPR 反应所需 RNA; tracrRNA: trans-activating crRNA, 反式激活 crRNA; dsDNA: double stranded DNA, 双链 DNA; NASBACC: NASBA-CRISPR cleavage, NASBA 结合 CRISPR 切割活性的检测技术; dCas9: nuclease-deactivated Cas9, 核酸酶失活的 Cas9; CRISPR-Chip: CRISPR 芯片反应; DETECTR: DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter, DNA 内切酶靶向 CRISPR 反式报告子; HOLMESv2: one-hour low-cost multipurpose highly efficient system version 2, 一小时低成本多用途高效系统第二版; SHERLOCK: specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, 特异性高灵敏度酶促解锁报告子; SHERLOCKv2: SHERLOCK version 2, SHERLOCK 第二版; DETECTR-Cas14: DETECTR contained Cas14, Cas14 介导的 DETECTR 反应; √代表存在这种活性; -代表不存在这种活性;

力。基于这种特异性识别能力,开发了成对使用的 dCas9 技术(paired dCas9, PC)、RCA 结合 CRISPR 与辣根过氧化 酶的检测技术(RCA-CRISPR-split-HRP, RCH)分别用于结 核分枝杆菌<sup>[63]</sup>和微小 RNA<sup>[64]</sup>检测。在食品检测领域, JIANG 等<sup>[65]</sup>将 CRISPR/dCas9 与 LAMP 和 LFB 结合起来 用于沙门氏菌检测,此方法利用 dCas9 的特异性识别能 力消除非特异性扩增引起的假阳性结果,可在 40 min 内 对 41 CFU/mL 的沙门氏菌进行现场筛查。

### 4.2 CRISPR/Cas12 在食品检测中的应用

Cas12 蛋白包括 Cas12a 和 Cas12b 两种亚型, 二者均 具有反式切割活性,目前此类蛋白在核酸检测领域应用 最为广泛。例如, CHEN 等<sup>[56]</sup>开发出了一种基于 CRISPR/ Cas12a 的检测方法用于肉类掺假鉴别,在不需要前置扩增 的基础上, 可检测出低至 1.13 ng/µL 的猪肉 DNA。JIANG 等<sup>[66]</sup>开发出一种基于 Cas12a 的阳离子共轭聚噻吩衍生 物(cationic-conjugated polythiophene derivative, PMNT) 有关的可视化检测方法(Cas12a visual PMNT-involved, Cas12aVIP)用于大肠杆菌 O157:H7 的检测, 该方法在 RPA 结合CRISPR的基础上,引入了PMNT(一种可与ssDNA结 合,导致其共轭主链立体构型发生变化,最大吸收波长转 移, 溶液颜色改变的物质)。此方法可在 40 min 内, 在自然 光下检测到结果,且不需要借助任何外部发光仪器。FANG 等<sup>[67]</sup>开发了一种 RPA 结合 CRISPR/Cas12a 的检测方法用 于诺如病毒的分型检测,该体系将逆转录过程与 RPA 过程 整合在一个体系中完成,并通过设计微流控芯片简化了操 作步骤,对诺如病毒 I 型和Ⅱ型检测灵敏度分别可达 10 copies/µL 和 1 copy/µL。

Cas12b 来源于嗜酸耐热菌,最佳反应温度高于其他 Cas蛋白,因此与 LAMP 更兼容<sup>[68]</sup>。与 Cas12a 蛋白相比, Cas12b 是双 RNA 导向,此蛋白对靶标的识别依赖于 crRNA 和 tracrRNA,因此基于 Cas12b 的检测技术具有更 高的特异性<sup>[69]</sup>。在食品检测领域,WU 等<sup>[70]</sup>建立了一种 LAMP 结合 CRISPR/Cas12b 的检测体系用于副溶血性弧菌 的检测,该方法引入了尿嘧啶 DNA 糖苷酶用以消化含尿 嘧啶的扩增子,以消除阳性扩增反应中出现的污染。

#### 4.3 CRISPR/Cas13 在食品检测的应用

Cas13 有 4 种亚型,该类蛋白同样具有反式切割活性, 与 Cas12 不同的是,该类蛋白的识别靶标为 RNA,并且反 式切割活性主要是对单链 RNA 进行非特异性切割。此外, Cas13 蛋白的特异性识别不依赖于 PAM 位点,而依赖于 PFS<sup>[71]</sup>。在食品检测领域,XIANG 等<sup>[72]</sup>建立了一种将重组 酶 辅 助 扩 增 (recombinase aided amplification, RAA)和 CRISPR/Cas13a 整合在微流控芯片上的检测体系,可同时 检测 4 种李斯特菌,检测灵敏度均低于 1 amol/L。

#### 4.4 CRISPR/Cas14 在食品检测的应用

Cas14是Cas蛋白家族已报道的最小的核酸酶,此蛋白可在不需要PAM位点的情况下对靶标 ssDNA进行识别,从而激活反式切割活性<sup>[55]</sup>。此外,Cas14a对 ssDNA的识别能力也高于 Cas12a,且此蛋白能够实现高保真单核苷酸多态性基因分型<sup>[61]</sup>。目前,Cas14 在食品检测领域的研究较少,WANG等<sup>[73]</sup>和ZHOU等<sup>[74]</sup>分别建立了CRRISP/Cas14a的检测平台,有望用于食品检测,但具体应用还未得到进一步证实。基于 Cas14 的高度特异性,未来有望开发更多基于CRRISP/Cas14 的检测技术用于食品检测。表 3 比较分析了各型Cas蛋白在食品检测领域的应用实例。

Table 3 Application of CRISPR/Cas detection technology in food detection								
检测方法名称	靶标	Cas 蛋白	前置扩增技术	信号判读	检出限	检测时间	参考文献	
Cas9-LFS	沙门氏菌	Cas9	PCR	LFB	10 <sup>2</sup> CFU/mL	-	[62]	
CALL	沙门氏菌	dCas9	LAMP	LFB	41 CFU/mL	40 min	[65]	
Cas12aVIP	大肠杆菌 O157:H7	Cas12a	RPA	颜色变化	-	40 min	[66]	
UDG-LAMP- CRISPR/Cas12b	副溶血性弧菌	Cas12b	LAMP	荧光	$1 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$	40 min	[70]	
hMC-CRISPR	李斯特菌	Cas13a	RAA	荧光	<1 amol/L	60 min	[72]	

表 3 CRISPR/Cas 检测技术食品检测中的应用 Fable 3 Application of CRISPR/Cas detection technology in food detection

注: LFS: lateral flow strip, 横向流动测试条; CALL: dCas9-assisted LAMP-based LFB, 基于 LFB 显色的 dCas9 协助 LAMP 检测方法; UDG: uracil-DNA glycosylase, 尿嘧啶脱氧核糖核酸糖苷酶; hMC-CRISPR: one-step detection method based on RAA and CRISPR on a high-throughput microfluidic chip, 基于 RAA 和 CRISPR 的高通量微流控芯片一步检测方法; -表示原文未提及此问题。

#### 5 食品检测 POCT 技术存在问题及改进方法

#### 5.1 灵敏度低与特异性差

IAT 和 CRISPR 系统的结合能够提高检测灵敏度,但 此过程中存在的扩增产物转移步骤易产成气溶胶污染,致 使检测特异性降低,造成假阳性结果。一锅法检测体系能 够很好解决这个问题,但又会带来灵敏度降低的新问题。 为解决这一问题,TIAN 等<sup>[75]</sup>构建了一种封闭的推进式反 应器,在反应器中先进行 RPA 预反应,而后推进 CRSIPR 组分,在封闭的单个系统中实现两步反应。LIN 等<sup>[76]</sup>则建 立了一种甘油增强 RPA 结合 CRISPR 一锅法检测的技术, 通过添加甘油实现 RPA 组分和 CRISPR 组分的相分离,避 免了 CRISPR 组分对 RPA 扩增的影响。

此外,电化学和光学等生物传感器也可提高 CRISPR 检测技术灵敏度,例如,MA 等<sup>[77]</sup>开发了一种变色和光热 效应双重测定法用于沙门氏菌的检测,该研究中添加了金 纳米颗粒标记的单链 DNA,可通过颜色变化和温度变化 分别实现比色检测和定量检测,检出限可达 1 CFU/mL。LI 等<sup>[78]</sup>建立了一种基于 RAA 的电化学 CRISPR 生物传感器 用于单核细胞增生李斯特菌的检测,该方法将切割活性转 化为可检测的电化学信号,检测灵敏度可达 0.68 amol/L, 提高了检测灵敏度。

#### 5.2 样品前处理

分子 POCT 技术主要检测对象为样本的核酸,在正式 扩增前,需要进行核酸提取等前处理步骤。实验室条件下, 该过程涉及待检测样本富集、生物体破裂、遗传物质释放、 核酸提取与纯化等复杂步骤,不仅耗时耗力,而且也达不到 POCT 技术的要求。近年来全自动核酸提取技术发展已趋于 成熟,但一个完整的核酸提取周期仍需 30 min以上,且依赖 于实验室的大型仪器,不利于现场检测。煮沸裂解法作为一 种传统的核酸粗提手段,因其操作简单、成本低,在核酸检 测中一直应用广泛,MYHRVOLD等<sup>[79]</sup>开发的加热未提取的 诊 断 样 品 以 消 除 核 酸 酶 (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases, HUDSON)方法,采用加热和 化学法使病毒裂解并使核糖核酸酶失活,大大缩短了检测 时间,检测灵敏度仍可达单拷贝。此外,浓缩富集、免疫磁 珠吸附等方法也可富集样本和核酸,提高核酸浓度,如 LI 等<sup>[80]</sup>建立了一种免疫捕获磁珠增强 LAMP-CRISPR/ Cas12a 的方法用于快速、目视检测空肠梭菌。该方法不仅通过加热 快速提取基因组 DNA,而且还通过免疫磁珠捕获空肠梭菌, 使菌体可以富集,核酸产量得以提高,整个过程可在 70 min 内完成,检测深度可达 8 CFU/mL。

#### 5.3 多通路复用检测

复杂的食品检测环境需要高通量检测技术,在一个 样本中检测多个靶标是目前 POCT 技术需探索的一个新的 难题。GOOTENBERG 等<sup>[60]</sup>开发的 SHERLOCKv2 技术发 现不同家族的 Cas13 蛋白具有不同的切割偏好性,在此基 础上开发了一种使用不同正交 Cas 蛋白(PsmCas13b、 LwaCas13a、CcaCas13b 和 AsCas12a)的多通道检测平台, 可同时切割 DNA 和 RNA,实现一个样本 4 种分析。虽然 此方法可实现多重检测且互不干扰,但随着检测通路的增 多,新的 Cas 蛋白和探针难以选择和设计,限制了多通路 复用检测的发展<sup>[81]</sup>。

微流控芯片可在一个芯片上实现多重反应,且彼此 之间互不干扰,因此也成为了多通路 POCT 技术的重点突 破方向<sup>[82]</sup>。例如,SUN 等<sup>[83]</sup>开发了一种 8 室芯片实验室系 统,用于快速定量检测食品中的沙门氏菌,可在 30 min 内 同时检测 8 个样本。SHANG 等<sup>[14]</sup>建立了一个集 DNA 提取、 RPA 扩增和信号读取为一体的微平台,可同时检测 8 种食 源性致病菌,并可通过手机程序读取检测信号。

## 6 结束语

食品检测对于确保食品安全十分重要,有助于减 少及杜绝人们食用污染或有害物质。本文系统比较分析 了分子 POCT 技术在食品检测中的应用实例,IAT 和 CRISPR/Cas 检测系统由于其检测速度快、操作简单、灵敏 度高等特点,十分适用于食品快速检测。在IAT技术中,由于RPA和LAMP具有更快的检测速度,因此更适用于食品快速检测;在CRISPR/Cas检测技术中,由于Cas12a可以对靶标 dsDNA 进行特异性识别并激发反式切割活性,因此更适用于真核生物基因检测,在食品检测领域的研究也更为广泛。此外,IAT技术可以与CRISPR/Cas检测技术结合起来,对检测靶标实现双重信号放大,大大提高检测特异性和灵敏度。

虽然分子 POCT 技术近些年来在食品检测领域应用 广泛, 但实际应用情况仍然存在一些问题, 值得研究人员 去优化和解决。例如,目前此方法检测结果的主流判读方 法主要依赖于特定光源显色,这不仅加大了仪器设计的复 杂程度,还对使用人员的判别能力提出了更高要求,因此 自然光下可视化检测成为该技术一个新的优化方向。此外, IAT 技术和 CRISPR/Cas 技术结合的一锅法检测体系在实 验室条件下得到了探究和验证, 但实际应用情况仍需要进 一步证实; 分子 POCT 过程仍需要依赖小型化温控仪器, 这限制了在资源匮乏环境下的使用。显然,现阶段的食品 检测分子 POCT 技术仍处于实验室阶段, 其实际应用和推 广仍存在一些问题值得探究和解决, 但基于 IAT 和 CRISPR/Cas 技术的检测方法仍然是目前食品领域最有发 展前景的分子 POCT 技术。随着分子 POCT 技术的不断发 展,未来有望开发小型化、智能化、高特异性和高灵敏度 的检测方法及仪器用于食品安全检测。

#### 参考文献

- KING T, COLE M, FARBER JM, *et al.* Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety [J]. Trends Food Sci Technol, 2017, 68: 160–175.
- [2] HAVELAAR AH, KIRK MK, TORGERSON PR, et al. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010 [J]. PLoS Med, 2015, 12(12): e1001923.
- [3] GIVANOUDI S, HEYNDRICKX M, DEPUYDT T, et al. A review on bioand chemosensors for the detection of biogenic amines in food safety applications: The status in 2022 [J]. Sensors-Basel, 2023, 23(2): 613.
- [4] MEI JH, ZHAO FY, XU RQ, et al. A review on the application of spectroscopy to the condiments detection: From safety to authenticity [J]. Crit Rev Food Sci, 2022, 62(23): 6374–6389.
- [5] WANG ZL, CAI R, GAO ZP, et al. Immunomagnetic separation: An effective pretreatment technology for isolation and enrichment in food microorganisms detection [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2020, 19(6): 3802–3824.
- [6] MA B, LI JL, CHEN K, et al. Multiplex recombinase polymerase amplification assay for the simultaneous detection of three foodborne pathogens in seafood [J]. Foods, 2020, 9(3): 278.
- [7] 钱佳婕,黄迪,徐颖华,等. 食源性致病微生物检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 4775–4785.
  QIAN JJ, HUANG D, XU YH, *et al.* Research progress of detection technologies for foodborne pathogens [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(12): 4775–4785.
- [8] LI X, ZHANG XL, SHI XL, et al. Review in isothermal amplification

technology in food microbiological detection [J]. Food Sci Biotechnol, 2022, 31(12): 1501–1511.

- [9] YUAN MZ, DING RH, CHEN SY, et al. Advances in field detection based on CRISPR/Cas system [J]. ACS Synth Biol, 2021, 10(11): 2824–2832.
- [10] WIENCEK J, NICHOLS J. Issues in the practical implementation of POCT: Overcoming challenges [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2016, 16(4): 415–422.
- [11] COLLINSON P, AAKRE KM, SAENGER A, et al. Cardiac troponin measurement at the point of care: Educational recommendations on analytical and clinical aspects by the IFCC committee on clinical applications of cardiac bio-markers (IFCC C-CB) [J]. Clin Chem Lab Med, 2023, 61(6): 989–998.
- [12] MÜLLER N, SCHNEIDER L, BREUER J, et al. Evaluation of the Roche point of care system for determination of NT-proBNP in urine samples [J]. Clin Chim Acta, 2022, 537: 107–111.
- [13] MOHAMED RM, EL-SHEIKH SM, KADI MW, et al. A novel test device and quantitative colorimetric method for the detection of human chorionic gonadotropin (hCG) based on Au@Zn-salen MOF for POCT applications [J]. RSC Adv, 2023, 13(17): 11751–11761.
- [14] SHANG YT, XING GW, LIN HF, et al. Development of nucleic acid extraction and real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay integrated microfluidic biosensor for multiplex detection of foodborne bacteria [J]. Food Control, 2024, 155: 110047.
- [15] HOCKING L, GEORGE J, BROBERG EK, et al. Point of care testing for infectious disease in Europe: A scoping review and survey study [J]. Front Public Health, 2021, 9: 722943.
- [16] JIA KY, XIAO RH, LIN QJ, et al. RNase H2 triggered visual loop-mediated isothermal amplification combining smartphone assisted all-in-one aptamer magnetic enrichment device for ultrasensitive cultureindependent detection of *Salmonella typhimurium* in chicken meat [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2023, 380: 133399.
- [17] 澎湃新闻. 广西查明"523 人捡食榴莲中毒": 感染副溶血性弧菌
  [EB/OL]. [2020-09-02]. https://www.thepaper.cn/newsDetail\_forward\_
  8991351?spm=C73544894212. P99790479609.0.0 [2023-12-07].
  Thepaper. cn. Guangxi identified "523 people with durian poisoning":
  Infected with Vibrio parahaemolyticus [EB/OL]. [2020-09-02].
  https://www.thepaper.cn/newsDetail\_forward\_8991351?spm=C735448942
  12. P99790479609.0.0 [2023-12-07].
- [18] LAW JW, AB MUTALIB NS, CHAN KG, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations [J]. Front Microbiol, 2014, 5: 770.
- [19] BOSCH A, PINTÓ RM, GUIX S. Foodborne viruses [J]. Curr Opin Food Sci, 2016, 8: 110–119.
- [20] CHENG X, WANG CC, LIU A, et al. Simultaneous detection of foodborne pathogenic bacteria in milk by fluorescence immunoassay [J]. Spectrochim Acta B, 2023, 285: 121830.
- [21] ZHU XY, GU SQ, GUO DH, et al. Determination of porcine derived components in gelatin and gelatin-containing foods by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Hydrocolloid, 2023, 134: 107978.
- [22] AUGUSTO DCFP, CHEN Y, CAVIN C, et al. Mid-infrared spectroscopy: Screening method for analysis of food adulterants in reconstituted skimmed milk powder [J]. Food Control, 2022, 136: 10884.
- [23] MOHAMED SH, SALIM AI, ISSA YM, et al. Detection and identification

of adulteration in vinegar samples based on reversed-phase highperformance liquid chromatographic (RP-HPLC) strategies [J]. ACS Food Sci Technol, 2021, 2(1): 21–30.

- [24] WU XY, NA Q, HAO SQ, et al. Detection of ovine or bovine milk components in commercial camel milk powder using a PCR-based method [J]. Molecules, 2022, 27(9): 3017.
- [25] GIUSTI A, ARMANI A, SOTELO CG. Advances in the analysis of complex food matrices: Species identification in surimi-based products using next generation sequencing technologies [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0185586.
- [26] BANSAL S, THAKUR S, MANGAL M, et al. DNA barcoding for specific and sensitive detection of *Cuminum cyminum* adulteration in *Bunium persicum* [J]. Phytomedicine, 2018, 50: 178–183.
- [27] HERMAN EM. Genetically modified soybeans and food allergies [J]. J Exp Bot, 2003, 54(386): 1317–1319.
- [28] LOO JF, BUT GW, KWOK HC, et al. A rapid sample-to-answer analytical detection of genetically modified papaya using loop-mediated isothermal amplification assay on lab-on-a-disc for field use [J]. Food Chem, 2019, 274: 822–830.
- [29] KIM JH, PARK SB, ROH HJ, et al. Event-specific qualitative and quantitative detection of five genetically modified rice events using a single standard reference molecule [J]. Food Chem, 2017, 226: 187–192.
- [30] ZHAI LG, LIU HX, CHEN QM, et al. Development of a real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for the rapid detection of *Salmonella* spp. from food [J]. Braz J Microbiol, 2018, 50(1): 255–261.
- [31] WANG ZY, YANG Q, ZHANG YZ, et al. Saltatory rolling circle amplification (SRCA): A novel nucleic acid isothermal amplification technique applied for rapid detection of *Shigella* spp. in vegetable salad [J]. Food Anal Method, 2017, 11(2): 504–513.
- [32] ZHAO XH, LI YM, WANG L, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples [J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(5): 2183–2188.
- [33] SRIDAPAN T, TANGKAWSAKUL W, JANVILISRI T, et al. Rapid detection of *Clostridium perfringens* in food by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow biosensor [J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0245144.
- [34] LI XM, ZHENG T, XIE YN, *et al.* Recombinase polymerase amplification coupled with a photosensitization colorimetric aassay for fast *Salmonella* spp. testing [J]. Anal Chem, 2021, 93(16): 6559–6566.
- [35] KISSENKÖTTER J, BÖHLKEN-FASCHER S, FORREST MS, et al. Recombinase polymerase amplification assays for the identification of pork and horsemeat [J]. Food Chem, 2020, 322: 126759.
- [36] DEIMAN B, VAN AARLE P, SILLEKENS P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [J]. Mol Biotechnol, 2002, 20(2): 163–179.
- [37] 朱晓娟, 徐德顺, 陈莉萍, 等. 依赖核酸序列的扩增技术在诺如病毒基因检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(5): 697–699.
  ZHU XJ, XU DS, CHEN LP, *et al.* Application of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in norovirus fast detection [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(5): 697–699.
- [38] XUE T, LU Y, YANG H, et al. Isothermal RNA amplification for the detection of viable pathogenic bacteria to estimate the Salmonella virulence for causing enteritis [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(5): 1670–1678.

- [39] LIZARDI PM, HUANG XH, ZHU ZR, et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification [J]. Nat Genet, 1998, 19(3): 225–232.
- [40] GUSEV Y, SPARKOWSKI J, RAGHUNATHAN A, et al. Rolling circle amplification: A new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry [J]. Am J Pathol, 2001, 159(1): 63–69.
- [41] 刘倩,李蓓,文景芝,等. 基于锁式探针的滚环扩增技术在植物病原检测中的应用[J]. 植物检疫, 2009, 23(3): 38–41.
  LIU Q, LI B, WEN JZ, *et al.* Application of rolling circle amplification (RCA) based on padlock probes in plant pathogen detection [J]. Plant Quarant, 2009, 23(3): 38–41.
- [42] 张健.利用滚环扩增技术检测食源性致病微生物的研究与应用[D].青岛:中国海洋大学,2014.
   ZHANG J. Detection of food-borne pathogens with rolling circle amplification technique [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [43] 李韦霖, 郭威, 梁梓薇, 等. 跨越式滚环等温扩增可视化检测羊肉中鸭 肉源成分[J]. 食品科技, 2022, 47(3): 311–317.
  LI WL, GUO W, LIANG ZW, *et al.* Visual detection of duck-derived components in mutton by saltatory rolling circle isothermal amplification [J]. Food Sci Technol, 2022, 47(3): 311–317.
- [44] YANG Q, ZHANG YZ, LI S, et al. Saltatory rolling circle amplification for sensitive visual detection of *Staphylococcus aureus* in milk [J]. J Dairy Sci, 2019, 102(11): 9702–9710.
- [45] 杨浩. 跨越式滚环等温扩增(SRCA)鉴别蜂蜜掺伪大米糖浆成分的研究[D]. 保定:河北农业大学,2022.
   YANG H. Identification of honey adulterated rice syrup components by saltatory rolling circle amplification (SRCA) [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2022.
- [46] MILTON AAP, MOMIN KM, PRIYA GB, et al. A novel in situ methodology for visual detection of *Clostridium perfringens* in pork harnessing saltatory rolling circle amplification [J]. Anaerobe, 2021, 69: 102324.
- [47] YAN S, LAN HZ, WU Z, et al. Cleavable molecular beacon-based loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of adulterated chicken in meat [J]. Anal Bioanal Chem, 2022, 414(28): 8081–8091.
- [48] PIEPENBURG O, WILLIAMS CH, STEMPLE DL, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): e204.
- [49] WANG R, ZHANG F, WANG L, et al. Instant, visual, and instrument-free method for on-site screening of GTS 40-3-2 soybean based on body-heat triggered recombinase polymerase amplification [J]. Anal Chem, 2017, 89(8): 4413–4418.
- [50] KONG MQ, LI ZH, WU J, et al. A wearable microfluidic device for rapid detection of HIV-1 DNA using recombinase polymerase amplification [J]. Talanta, 2019, 205: 120155.
- [51] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, LEE JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. Science, 2017, 356(6336): 438–442.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] DU YC, WANG SY, WANG YX, et al. Terminal deoxynucleotidyl

transferase combined CRISPR-Cas12a amplification strategy for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase with zero background [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 171: 112734.

- [55] GE XL, MENG T, TAN X, et al. Cas14a1-mediated nucleic acid detectifon platform for pathogens [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 189: 113350.
- [56] CHEN YJ, YANG TY, QIAN SWJ, et al. Multiple crRNAs-assisted CRISPR/Cas12a assay targeting cytochrome b gene for amplification-free detection of meat adulteration [J]. Anal Chim Acta, 2022, 1231: 340417.
- [57] PARDEE K, GREEN AA, TAKAHASHI MK, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components [J]. Cell, 2016, 165(5): 1255–1266.
- [58] HAJIAN R, BALDERSTON S, TRAN T, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor [J]. Nat Biomed Eng, 2019, 3(6): 427–437.
- [59] LI LX, LI SY, WU N, et al. HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(10): 2228–2237.
- [60] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, KELLNER MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. Science, 2018, 360(6387): 439–444.
- [61] HARRINGTON LB, BURSTEIN D, CHEN JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes [J]. Science, 2018, 362(6416): 839–842.
- [62] WANG HY, WU Q, ZHOU MY, et al. Development of a CRISPR/ Cas9-integrated lateral flow strip for rapid and accurate detection of Salmonella [J]. Food Control, 2022, 142: 109203.
- [63] ZHANG YH, QIAN L, WEI WJ, et al. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains [J]. ACS Synth Biol, 2017, 6(2): 211–216.
- [64] QIU XY, ZHU LY, ZHU CS, et al. Highly effective and low-cost microRNA detection with CRISPR-Cas9 [J]. ACS Synth Biol, 2018, 7(3): 807–813.
- [65] JIANG H, WU Q, ZHAO QH, et al. Using dCas9 as an intermediate bridge of loop-mediated isothermal amplification-based lateral flow colorimetric biosensor for point-of-care Salmonella detection [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2023, 396: 134581.
- [66] JIANG W, HE C, BAI L, et al. A rapid and visual method for nucleic acid detection of *Escherichia coli* 0157:H7 based on CRISPR/Cas12a-PMNT [J]. Foods, 2023, 12(2): 236.
- [67] FANG TF, ZHANG L, DING W, et al. Point-of-care testing for norovirus typing using CRISPR/Cas12a combined with reverse transcription recombinase polymerase amplification [J]. Bioconjugate Chem, 2023, 34(6): 1147–1156.
- [68] ZHANG YQ, QUAN XY, LI YC, *et al.* Visual detection of SARS-CoV-2 with a CRISPR/Cas12b-based platform [J]. Talanta, 2023, 253: 124093.
- [69] TIAN Y, LIU RR, XIAN WD, et al. A novel thermal Cas12b from a hot spring bacterium with high target mismatch tolerance and robust DNA cleavage efficiency [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 147: 376–384.
- [70] WU F, LU C, HU WH, et al. Rapid visual detection of Vibrio parahaemolyticus by combining LAMP-CRISPR/Cas12b with heat-labile uracil-DNA glycosylase to eliminate carry-over contamination [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2023, 24(8): 749–754.
- [71] ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR

effector [J]. Science, 2016, 353(6299): aaf5573.

- [72] XIANG XR, LI F, YE QH, et al. High-throughput microfluidic strategy based on RAA-CRISPR/Cas13a dual signal amplification for accurate identification of pathogenic *Listeria* [J]. Sensor Actuators B Chem, 2022, 358: 131517.
- [73] WANG QW, REN YH, MENG T, et al. Cas14a1-advanced LAMP for ultrasensitive and visual pathogen diagnostic [J]. Talanta, 2023, 269: 125458.
- [74] ZHOU B, YANG RL, SOHAIL M, et al. CRISPR/Cas14 provides a promising platform in facile and versatile aptasensing with improved sensitivity [J]. Talanta, 2023, 254: 124120.
- [75] TIAN YC, 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.
- [76] LIN M, YUE HH, TIAN T, et al. Glycerol additive boosts 100-fold sensitivity enhancement for one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay [J]. Anal Chem, 2022, 94(23): 8277–8284.
- [77] MA L, PENG L, YIN LJ, 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.
- [78] LI F, YE QH, CHEN MT, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 179: 113073.
- [79] MYHRVOLD C, FREIJE CA, GOOTENBERG JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. Science, 2018, 360(6387): 444–448.
- [80] LI C, CHEN X, WEN RQ, et al. Immunocapture magnetic beads enhanced the LAMP-CRISPR/Cas12a method for the sensitive, specific, and visual detection of *Campylobacter jejuni* [J]. Biosensors-Basel, 2022, 12(3): 154.
- [81] TANG YN, GAO L, FENG W, et al. The CRISPR-Cas toolbox for analytical and diagnostic assay development [J]. Chem Soc Rev, 2021, 50(21): 11844–11869.
- [82] SACKMANN EK, FULTON AL, BEEBE DJ. The present and future role of microfluidics in biomedical research [J]. Nature, 2014, 507(7491): 181–189.
- [83] SUN Y, QUYEN TL, HUNG TQ, et al. A lab-on-a-chip system with integrated sample preparation and loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative detection of *Salmonella* spp. in food samples [J]. Lab Chip, 2015, 15(8): 1898–1904.

(责任编辑:张晓寒 郑 丽)





王 薇,硕士研究生,主要研究方向 为核酸检测技术的开发和应用。 E-mail: 1918128792@qq.com



孙万平,博士,副教授,主要研究方向
 为基因检测。
 E-mail: sunwanping@suda.edu.cn