

基于CRISPR/Cas的生物传感器在食源性病原菌检测中的应用进展

张孝渊^{1,2} 姚志豪² 何开雨² 王洪梅² 徐霞红² 吴祖芳^{*1} 王柳^{*2}

¹(宁波大学食品与药学学院, 宁波 315000)

²(浙江省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 杭州 310021)

摘 要 食源性病原菌严重威胁食品安全及消费者的健康,因此,对食源性病原菌快速、准确的检测方法对保障食品安全尤为重要。规则成簇的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关系统(CRISPR-associated systems, Cas)生物传感器是在引导核糖核酸(RNA)的作用下,使 Cas 蛋白与 RNA 形成 RNA 复合体,并对靶标基因进行特异性识别,从而将靶标信号转化为可检测的物理和化学信号。CRISPR/Cas 生物传感器具有特异性好、可编程以及使用简便等优势,在病原菌检测领域具有广阔的应用前景。本文根据 Cas 蛋白的种类和作用机制不同,分别介绍了不同 CRISPR/Cas 系统的作用原理和特点,概述了基于不同 CRISPR/Cas 的生物传感的信号识别、信号放大、信号输出策略及其在食源性病原菌检测中的应用进展,讨论了基于 CRISPR/Cas 的多重生物传感器的构建原理及其在多病原菌同时检测中的应用,分析了基于 CRISPR/Cas 的生物传感器在病原菌快速检测中面临的挑战及未来的发展趋势。

关键词 食源性病原菌; CRISPR/Cas; 生物传感器; 评述

食源性病原菌是可引起食物中毒或以食品为媒介传播的细菌、病毒和真菌。食源性病原菌通过污染食品原材料(蔬菜、水果、牛奶和肉类等)和水源,或在食品生产、加工、储存和运输等环节对食品造成污染。常见的食源性病原菌主要有沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌、弯曲杆菌和大肠杆菌等^[1]。人类直接食用或因接触被病原菌污染的食品而间接摄入病原菌,可出现腹泻、呕吐、头痛、恶心等症状,严重时甚至可导致死亡^[2]。因此,建立快速、准确和灵敏的食源性病原菌检测方法对保障食品安全和人类健康具有重要意义。

传统的菌落平板计数法结合生化鉴定被认为是检测食源性病原菌的“金标准”。虽然这种方法准确度很高,但检测通常需要 3~5 d,并且难以实现高通量检测^[3]。为了克服检测时间过长的问题,研究者开发了许多方法,如荧光定量聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)和酶联免疫吸附分析(ELISA)等方法^[4]。荧光定量 PCR 方法的灵敏度较高,在病原菌检测过程中被广泛采用。但是,PCR 过程中产生的非特异性扩增可能会导致假阳性结果,限制了 PCR 的应用^[5]。基于抗原和抗体之间的免疫反应的 ELISA 具有操作简单和检测时间短等优势,但是准确性和灵敏度较低^[6]。为满足即时检测食源性病原菌的需求,需要开发特异性好、准确度和灵敏度更高的检测方法。

规则成簇的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关系统(CRISPR-associated systems, Cas)是细菌及古细菌用于抵御病毒入侵的一种自我保护机制,通过引导 RNA 与靶核酸的碱基互补配对原则确保特异性,并借助 Cas 蛋白实现基因剪切与修饰。随着各种功能性 Cas 蛋白的发现和改造,以及越来越多具有可设计和可编程特点的成簇规律间隔短回文重复序列核糖核酸(CRISPR RNA, crRNA)被发现,CRISPR/Cas 系统在分子诊断领域的潜能被逐渐开发,并被广泛应用^[7-11]。将 CRISPR/Cas 系统与不同种类的技术相结合,已构建了多种用于食源性病原菌检测的生物传感器^[12-16]。

2023-09-15 收稿; 2024-02-01 接受

国家自然科学基金项目(No. 32172307)和浙江省基础公益研究计划项目(No. LGN21C200007)资助。

* E-mail: wzfwpf@163.com; wangliually@126.com

CRISPR/Cas 生物传感器是在引导 RNA 的作用下,使 Cas 蛋白与 RNA 形成核糖核酸复合体,对靶标基因进行特异识别,并将分子间的化学反应经信号放大,最后转化为可检测的电信号、光学信号和色相信号等。CRISPR/Cas 由于其设计和使用灵活,在生物传感的信号识别、放大和输出过程中都发挥了重要作用(图 1)。本文介绍了 CRISPR/Cas 系统的分类、作用机制及其在生物传感中的作用,分别阐述了其在食源性病原菌检测中的应用,总结了现有的基于 CRISPR/Cas 的多重食源性病原菌检测方法以及其近年来的研究进展,分析了其在实际应用中面临的挑战,并对基于 CRISPR/Cas 的生物传感器在病原菌检测研究和应用中未来的发展趋势进行了展望。

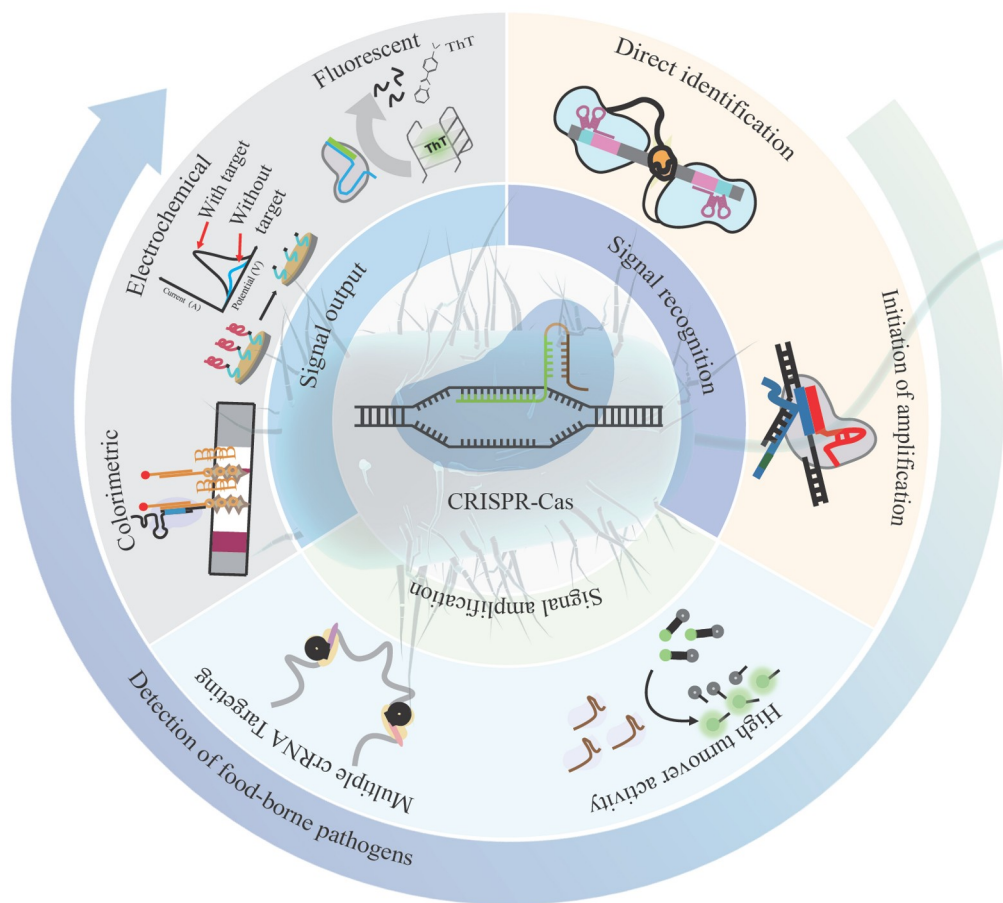


图1 基于 CRISPR/Cas 的食源性病原菌生物传感器

Fig.1 CRISPR/Cas-based biosensor

ThT, 硫黄素 T (Thioflavine T); CRISPR, 规则成簇的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats); Cas, CRISPR 相关系统 (CRISPR-associated systems); crRNA, 成簇规律间隔短回文重复序列核糖核酸 (CRISPR RNA)

1 CRISPR/Cas 系统的分类及作用机制

根据效应蛋白数量的不同, CRISPR/Cas 系统可分为 I 类和 II 类。I 类是由多个亚基组成的效应子模块, II 类是具有多种功能的单个效应蛋白^[17]。II 类 Cas 蛋白具有简单和高效等特点, 被广泛用于分子诊断领域。目前, 基于 CRISPR/Cas 的生物传感器常用的 Cas 效应蛋白包括 Cas9、Cas12 和 Cas13a 等^[18-21], 本文将分别介绍这 3 类 CRISPR/Cas 系统的工作原理。

1.1 CRISPR/Cas9 的作用机制

CRISPR/Cas9 系统的工作原理是通过 crRNA 与具有 crRNA 互补序列的反式激活 RNA (Trans-activating crRNA, tracrRNA) 序列形成 RNA 双链体, Cas9 蛋白在 2 个 RNA 的引导下识别带有原间隔临近基序

(Protospacer adjacent motif, PAM)的(5'-NGG-3')靶双链 DNA(Double strand DNA, dsDNA),在 PAM 位点上游 3 个碱基处切割靶 dsDNA,形成双链切口^[22]。此外, crRNA 和 tracrRNA 可合并为单一导向的 RNA (Single-guide RNA, sgRNA)^[23]。基于碱基互补配对原则, Cas9 会在 sgRNA 引导下与靶 dsDNA 结合。Cas9 蛋白具有 2 个核酸酶结构域 HNH 和 RuvC,其中, HNH 区域引导切割与 sgRNA 互补的模板链, RuvC 区域引导切割与模板链互补的链^[24-26]。除此之外,当 Cas9 的 1 个核酸酶活性区域失活后,会形成 Cas9nickase(Cas9n)^[27],可在 dsDNA 上形成单链缺口^[22]。当 HNH 和 RuvC 都失活后,形成的 Deactivated Cas9(dCas9)不具有核酸内切酶活性,但仍可与靶 DNA 结合^[28-29]。

1.2 CRISPR/Cas12 的作用机制

CRISPR/Cas12 系统在分子诊断领域中使用较广泛的蛋白包括 Cas12a 和 Cas12b 蛋白。与 SpCas9 相比, Cas12a 的分子量更小(约 1274 个氨基酸)。此外, Cas12a 仅需 crRNA 即可激活酶切活性,并且 crRNA 结构比 sgRNA 更简单^[30]。Cas12a/crRNA 复合物可识别 5'末端含有(5'-(T)TTN-3'、5'-TYCV-3'和 5'-TATV-3'等)PAM 位点的靶 dsDNA(不同来源的 Cas12 对 PAM 位点的偏好不同),切割 dsDNA 并产生粘性末端^[31-33]。此外, Cas12a 还可进行反式切割(或被称为“侧切”),能够在 Cas12a/crRNA 复合物与靶 dsDNA 结合后非特异性地切割游离的单链 DNA(Single stranded DNA, ssDNA)^[34]。与 Cas12a 相比, Cas12b(约 1129 个氨基酸)分子量更小,但 Cas12b 需要双 RNA(crRNA 和 tracrRNA)引导,进而识别以 5'-TTN-3'为代表的 PAM 序列。Cas12b 也具备反式切割活性^[35]。通常, Cas12a 的最佳工作温度约为 37 ℃,而 Cas12b 的最佳切割温度为 48 ℃,具备一定的嗜高温特性^[36]。

1.3 CRISPR/Cas13a 的作用机制

与上述两种 CRISPR 系统相比, CRISPR/Cas13a 系统并不具备识别 DNA 的能力,只能识别带有由 A、U 或 G 碱基组成的原间隔侧翼序列(Protospacer flanking sequence, PFS)的 RNA 靶标。Cas13a 可在 crRNA 引导下结合带有 PFS 序列的 RNA,并特异性切割靶 RNA。Cas13a 也具备反式切割非特异性单链 RNA(Single stranded RNA, ssRNA)的能力。crRNA 与靶标之间的单碱基错配对 Cas13a 的活性影响很低,但 2 个或 2 个以上的碱基错配会严重降低蛋白活性^[37-39]。

2 CRISPR/Cas 生物传感的原理及其在食源性病原菌检测中的应用

常规的生物传感过程可分为 3 个环节,即生物信号的识别、放大和输出。CRISPR/Cas 系统在生物传感中可参与不同环节,可辅助生物信号识别、放大和输出。以下分别阐述 Cas9、Cas12 和 Cas13a 系统在生物传感中的应用。

2.1 CRISPR/Cas9 生物传感的原理及其在食源性病原菌检测中的应用

2.1.1 Cas9 辅助信号识别

CRISPR/Cas9 系统参与生物传感的信号识别环节,进而触发下一步的信号放大环节。Zhou 等^[40]开发了一种基于 CRISPR/Cas9 触发识别、切割内切酶介导的链置换扩增(Strand displacement amplification, SDA)方法(CRISDA)。首先,通过 Cas9-sgRNA 识别靶标 DNA 并在非靶标链上形成一个切口,便于引物与切口附近的模板链结合;然后,在聚合酶和切割内切酶辅助下进行 SDA 扩增,生成大量 dsDNA 产物;最后,使用荧光-淬灭基团标记的肽核酸(PNA)侵袭扩增产物,利用终点荧光分析对靶核酸进行定量分析。该方法以人类基因组 9 号染色体为靶标,检出限可低至 2.5 amol/L。

由于 CRISPR/Cas9 系统对 PAM 序列存在高度依赖性,如何对无 PAM 序列的核酸进行检测是较大的挑战。PAM 递呈寡核苷酸(PAM-mer)是一种含有 PAM 区域的短单链 DNA,可使 Cas9 定向结合或切割无 PAM 的靶标。Wang 等^[41]通过引入 PAM-mer 序列“NGG”使 Cas9 切割靶 ssRNA/ssDNA,从而释放特异性片段并触发指数扩增,生成大量富 G 扩增产物,利用 G-四链体与血红素结合后具有类过氧化物酶活性的特性实现可视化检测。该方法以单核细胞增生李斯特菌的 ssDNA 片段为靶标,检出限低至 100 amol/L。

此外,单一的 Cas9 系统也可直接检测靶标 dsDNA。Zhang 等^[42]构建了一种基于 dCas9 检测病原菌的检测系统。如图 2A 所示,在靶标 DNA 上设计 1 对 PAM 位点,可被 2 个不同的 sgRNA 分别识别,并导致 2 个 dCas9 同时结合在同一个靶标上。由于这 2 个 dCas9 分别修饰了分裂的荧光素酶,二者同时结合

靶标使得荧光素酶结构完整,因而可产生生物发光信号。该方法以结核分枝杆菌为检测对象,在没有核酸扩增时灵敏度为 0.01 amol/L,在 35 次 PCR 循环下灵敏度可达到 30 amol/L。

尽管 CRISPR/Cas9 系统在信号识别环节中具有高特异性,但单一的 CRISPR/Cas 系统检测的灵敏度偏低^[43]。利用 Cas9 激活核酸扩增提高灵敏度更适合低浓度的病原菌样本检测。

2.1.2 Cas9 辅助信号输出

在信号输出环节,CRISPR/Cas9 系统通过对靶标进行准确识别将核酸靶标的信号转导为可读取的化学信号,从而减少非特异性靶标的干扰^[44]。Wang 等^[45]开发了一种基于 CRISPR/Cas9 的侧流核酸测定 (CASLFA) 方法。如图 2B 所示,首先设计了聚腺嘌呤标记的金纳米颗粒 (Au nanoparticles, AuNPs)-DNA 探针并预包埋在结合垫上,使用生物素化的引物进行 PCR 扩增或等温扩增,扩增产物与 Cas9/sgrRNA 共同短暂孵育后滴在样品垫上。AuNP-DNA 探针的聚 A 序列会杂交 sgrRNA 茎环,与 Cas9/sgrRNA-生物素化扩增子形成复合物,在 T 线被预包被的链霉亲和素捕获,多余的 AuNP-DNA 探针则被杂交捕获在 C 线上。CASLFA 方法可有效区分核酸扩增过程中产生的非特异信号的干扰,实现目标物信号准确输入。该方法可用于单增李斯特菌、转基因 35S 启动子和非洲猪瘟病毒的鉴定,其中单增李斯特菌的裸眼检出限低至 150 拷贝。

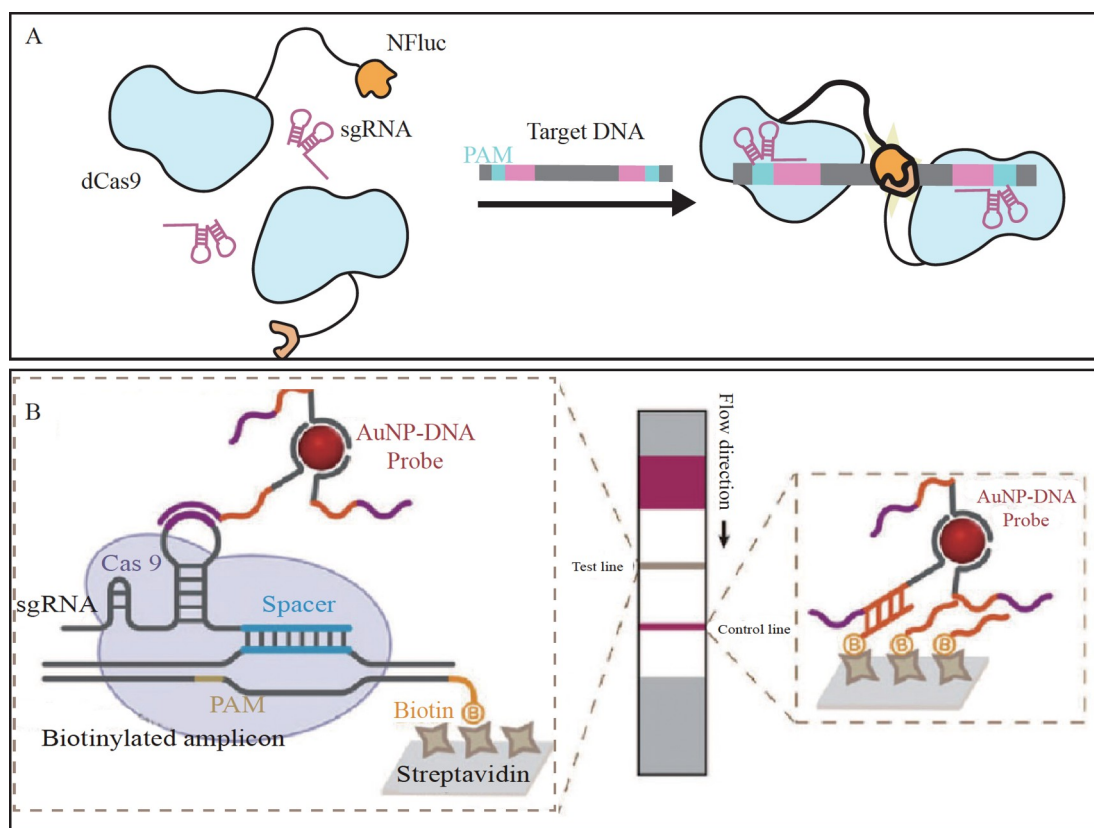


图2 基于 CRISPR/Cas9 的生物传感分析: (A) 基于双 deactivated Cas9 (dCas9) 和分裂荧光素酶的生物传感器^[42]; (B) 基于 CRISPR/Cas9 的试纸条生物传感器^[45]

Fig.2 Biosensing strategies based on CRISPR/Cas9: (A) Biosensors based on dual deactivated Cas9 (dCas9) and firefly luciferase^[42]; (B) Lateral flow assay biosensors based on CRISPR/Cas9^[45]

此外, dCas9 介导的体系颜色变化也可作为输出信号。Bengtson 等^[46]提出了一种 CRISPR/dCas9 介导的等温扩增 DNA 检测策略。从血液/尿液中提取 DNA 后,使用生物素化的引物进行重组酶聚合酶扩增 (Recombinase polymerase amplification, RPA)。dCas9/sgrRNA 与 RPA 产物结合,被链霉亲和素标记的磁珠固定。采用 ssDNA 标记 dCas9 蛋白, ssDNA 与环状引物杂交,在连接酶和聚合酶作用下进行滚环扩增 (Rolling circle amplification, RCA)。RCA 产物折叠形成 G-四链体, G-四链体与血红素基团结合催化显色

反应。该方法无需复杂的设备,室温下即可检测,在15 min内可检测低至10拷贝的DNA。

2.1.3 基于CRISPR/Cas9的生物传感器在食源性病原菌检测中的应用

基于CRISPR/Cas9的生物传感器已初步应用于食源性病原菌检测。Wang等^[47]将Cas9 nickase与等温扩增技术结合开发了基于一锅法的RNA检测方法,将其用于鼠伤寒沙门氏菌的检测,最低可在20 μL 的反应体系中检测到0.99 pmol/L鼠伤寒沙门氏菌基因组DNA,并验证了该体系对靶标序列具有单核苷酸特异性。Wang等^[48]将CRISPR/Cas9和侧流层析试纸条相结合,利用Cas9-gRNA识别靶标DNA使试纸条发生的颜色变化,实现了对金黄色葡萄球菌的检测,检出限为63 CFU/mL。

Cas9的特异性识别可有效减少非特异性靶标的干扰,从而提高方法的特异性,相比于利用Cas12和Cas13a的反式切割活性进行信号输出的方式,简化了切割的步骤^[49-51]。但是,CRISPR/Cas9系统在信号输出过程中形成的复合物较复杂,检测低浓度样品时易出现假阴性现象^[52];此外,sgRNA的合成步骤繁琐,成本较高。

2.2 CRISPR/Cas12生物传感原理及其在食源性病原菌检测中的应用

2.2.1 Cas12辅助信号放大

Cas12a/crRNA的反式切割活性是指Cas12a与靶标核酸特异性结合后具有非特异性切割ssDNA的能力。由于Cas12a具有高周转活性,当其与靶标DNA结合后可依次对荧光-淬灭基团修饰的ssDNA进行多次切割^[53]。

在靶标基因上可以设计多个检测位点,利用多crRNA共同识别同一基因的不同位点能进一步提高识别靶标的概率,放大生物信号。Zeng等^[43]开发了一种无需扩增的多crRNA联用的CRISPR/Cas12a检测方法。与传统的单crRNA检测系统相比,多位点同时识别方法的灵敏度提高了64倍,检出限低至约1 pmol/L^[43]。

2.2.2 Cas12辅助信号输出

通过对ssDNA报告探针进行不同的信号标签修饰,结合Cas12的反式切割活性,可将待测物信号转换为电信号^[54]、荧光信号^[55]和比色信号^[56]等,实现信号的灵活输出。例如,在ssDNA上分别修饰荧光基团和报告基团,当Cas12a或Cas12b在靶基因的存在下被激活并发生反式切割时,可将靶基因信号转化为荧光信号输出^[57-59]。

通过切割荧光基团和淬灭基团双标记的ssDNA进行信号输出的成本较高。Wang等^[12]基于氧化石墨烯可吸附被FAM修饰的长ssDNA(F-ssDNA)并淬灭其荧光的原理开发了一种单荧光基团标记信号探针的方法(图3A)。Cas12a反式切割F-ssDNA使DNA长度变短,导致氧化石墨烯对其的吸附能力降低,荧光淬灭效果变差。相比于双标记ssDNA,该方法可节约65%的成本。以沙门氏菌为检测对象时,检出限低至50拷贝。

除了荧光和比色信号输出的方式,CRISPR/Cas12系统还可将生物分子的信号转化并输出为电信号和表面增强拉曼光谱(SERS)信号,在定性分析的基础上,进一步实现定量检测。Liu等^[60]提出了一种由CRISPR/Cas12a介导的基于SERS的生物传感器的核酸现场检测策略。利用LAMP扩增靶DNA,在电极上修饰ssDNA,其中ssDNA一端带有脂质体包裹的信号分子。Cas12a识别靶DNA后利用反式切割活性切割电极上的ssDNA,使得ssDNA浓度降低。加入表面活性剂后,脂质体破裂释放出信号分子,可用于SERS的检测信号。该方法已成功应用于鸭肉掺假分析,肉眼检出限低至10 pmol/L。Suea-Ngam等^[61]提出了一种耦联银金属化的无扩增电化学CRISPR/Cas生物传感器(E-Si-CRISPR)。此传感器的电极修饰了ssDNA和CRISPR/Cas12a,当存在靶基因时,Cas12a的反式切割活性被激活,ssDNA报告子被裂解,ssDNA表层电极被降解。在Cas12a切割后对电极进行银金属化,银沉积的程度与剩余的ssDNA报告子的量成正比。该方法以MRSA基因为检测对象,检出限为3.5 fmol/L,定量限为10 fmol/L。

2.2.3 基于CRISPR/Cas12的生物传感器在食源性病原菌检测中的应用

将CRISPR/Cas12体系与等温扩增联用,利用Cas12的反式切割活性对ssDNA进行切割,结合荧光信号变化或免疫层析试纸条等信号读取方式实现对目标物的检测,在食源性病原菌检测领域中已有较多应用^[62-67]。Cas12a除了对ssDNA具有反式切割活性外,还可以切割具有高级结构的DNA,如G-四链体DNA^[68]。Wang等^[69]利用G-四链体增强特异性配体的荧光发射,而Cas12a反式切割使G-四链体的高级

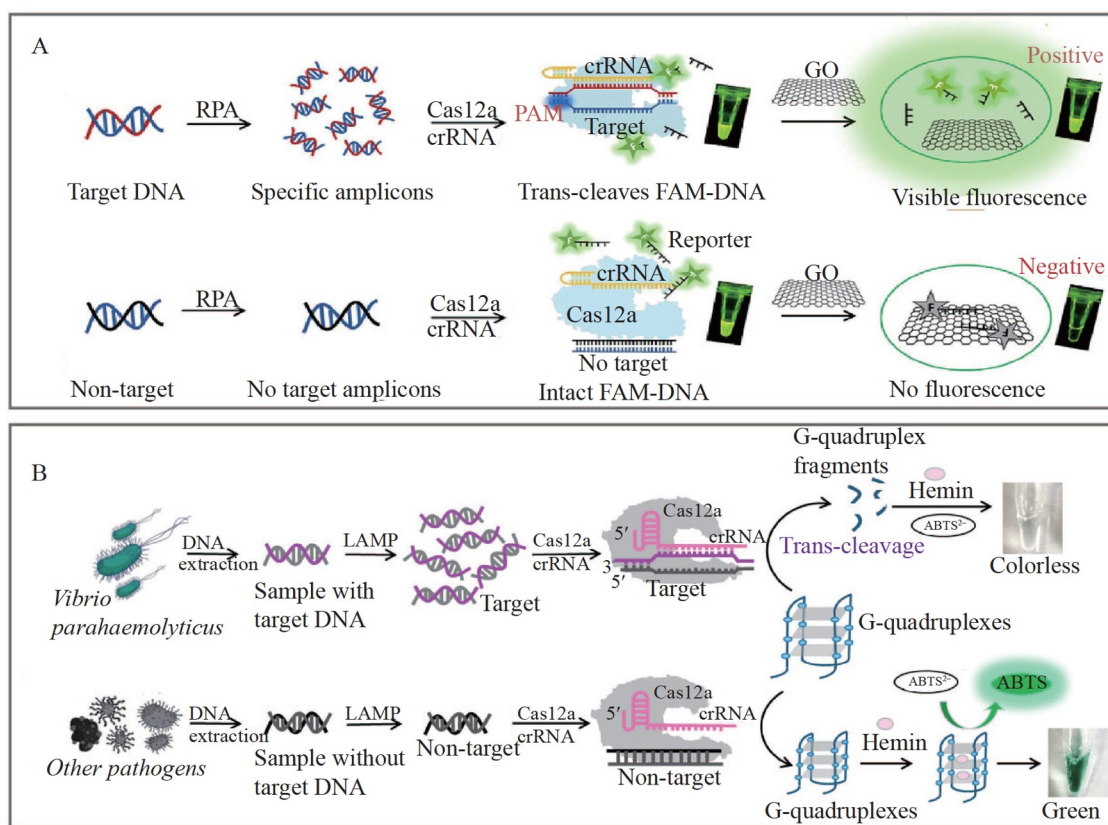


图3 基于 CRISPR/Cas12 的生物传感分析: (A) 基于 CRISPR/Cas12a 和氧化石墨烯的沙门氏菌检测方法^[12]; (B) 基于 CRISPR/Cas12a 和 G-四链体的无标记的比色生物传感器^[21]

Fig.3 Biosensing based on CRISPR/Cas12: (A) Detection method for *Salmonella* based on CRISPR/Cas12a and graphene oxide^[12]; (B) Label-free colorimetric biosensors based on CRISPR/Cas12a and G-quadruplexes^[21]

结构被破坏,从而无法增强荧光配体的发射信号,基于此构建了免标记的荧光检测方法,对副溶血弧菌的检出限低至 136 拷贝。除此以外, G-四链体 DNA 与血红素结合的复合物具有类过氧化物酶活性,可催化显色底物发生氧化反应并产生颜色变化。当 Cas12a 的反式切割造成 G 四链体结构破坏时,该催化活性丧失,无法发生颜色变化(图 3B)^[21]。该方法可以检测每反应 9.8 CFU 的副溶血性弧菌。

由于 Cas12 对 DNA 的靶向识别,使其能与大多数核酸扩增方法结合,其反式切割活性可进一步提高灵敏度,并实现信号的灵活转换与输出,因此已成为分子检测领域中应用最普遍的一种 Cas 蛋白。

2.3 CRISPR/Cas13a 生物传感原理及在食源性病原菌检测中的应用

2.3.1 Cas13a 辅助信号放大

与 Cas12 类似,利用 Cas13a 的反式切割活性可以放大生物信号,提高灵敏度。多个 Cas13a/crRNA 共同识别可以增强信号放大能力,进一步提高灵敏度,检测到丰度更低的靶标^[70]。Li 等^[71]在还原氧化石墨烯-场效应晶体管(rGO-FET)芯片上通过 ssRNA 修饰 AuNPs,利用多组串联的 Cas13a/crRNA 同时识别靶标 RNA 并激发反式切割活性,使 rGO-FET 芯片表面修饰的 AuNPs-RNA 报告子被 Cas13a 裂解,引起电流信号变化,实现了靶标 RNA 的检测。该方法检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的检出限为 1.56 amol/L。SARS-CoV-2 主要通过气溶胶传播,但新冠病毒疫情爆发时在食品中也检出 SARS-CoV-2。Lopez-Valls 等^[72]利用 Cas13a-crRNA 识别靶标 RNA,触发 Cas13a 反式切割,裂解与 AuNPs 偶联的 ssRNA,诱导胶体金聚集,实现可视化检测(图 4A); 将其与等温扩增级联,可在 30 min 内完成 SARS-CoV-2 的检测。

2.3.2 Cas13a 辅助信号输出

Cas13a 可以通过反式切割荧光-淬灭基团修饰的 ssRNA 辅助信号输出,将生物信号转化成易检测的荧光信号。Gootenberg 等^[7]开发了 SHERLOCK 平台,利用 Cas13a 识别 RPA 扩增产物,反式切割报告子

释放的荧光信号(图4B),在1 h内即可完成检测。该方法可用于寨卡病毒、登革热病毒和大肠杆菌等目标菌的检测,以寨卡病毒为例,检出限低至20 amol/L。此外,An等^[73]将RPA与CRISPR/Cas13a联用,建立了针对沙门氏菌的检测方法。将Cas13a试剂与RPA试剂混合,Cas13a识别扩增产物,反式切割荧光报告子,释放荧光信号。单管RPA-Cas13a法的检测时间少于20 min,检出限为 10^2 拷贝,与PCR法相当。为满足现场检测的需求,研究人员开发了一些自动化的检测装置。Chandrasekaran等^[74]研发了一种DISCoVER(一种无RNA提取、CRISPR/Cas13a介导的微流体检测平台)检测平台。样品在裂解缓冲液中热失活后,加入重力微流体盒中,在对靶标LAMP扩增后进行T7转录,Cas13a非特异性切割荧光报告子,DISCoVER可在60 min内自动运行测定和读取荧光,对SARS-CoV-2的灵敏度为40 copy/ μ L。

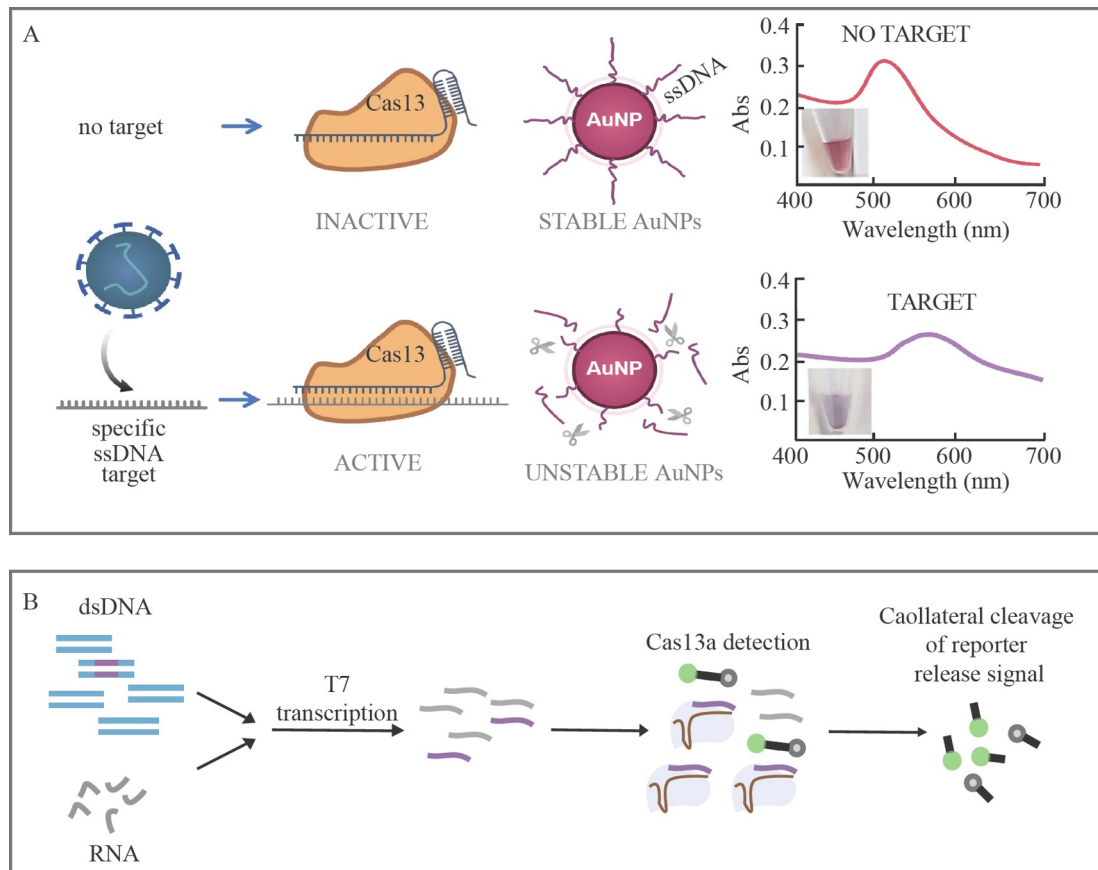


图4 基于CRISPR/Cas13a的生物传感分析:(A)基于Cas13a和金纳米颗粒的生物传感器^[72];(B)基于重组酶聚合酶扩增和CRISPR/Cas13a的分子诊断平台^[7]

Fig.4 Biosensing based on CRISPR/Cas13a: (A) Biosensors based on Cas13a and gold nanoparticles^[72]; (B) Molecular diagnostic platform based on recombinase polymerase amplification and CRISPR/Cas13a^[7]

2.3.3 基于CRISPR/Cas13a的生物传感器在食源性病原菌检测中的应用

将CRISPR/Cas13a与核酸扩增联用,利用T7 RNA聚合酶将核酸扩增生成的DNA产物转录成RNA,结合Cas13a对RNA的靶向识别功能,也可用于食源性病原菌的检测。Liu等^[75]开发了基于PCR-Cas13a的生物传感器,用于检测食源性病原菌,对金黄色葡萄球菌的检出限低至1.5 copy/ μ L。该传感器被用于水样和牛奶样品中金黄色葡萄球菌的检测,准确率分别为99.44%和99.00%,检测成本(0.497美元)低于实时荧光定量PCR方法(0.670美元)。与该传感器类似,Zhou等^[76]设计的基于CRISPR/Cas13a的细菌检测平台可在4 h内检出低至1 CFU/mL的金黄色葡萄球菌。相比于实时荧光定量PCR方法,该方法的灵敏度更高;与菌落平板计数法相比,检测时间更短。

Cas13a系统能直接识别RNA,在病毒检测方面具有很大优势。但是,将Cas13a用于DNA检测时需通过T7RNA聚合酶将DNA转录成RNA,步骤更繁琐,并且作为信号报告子的RNA的合成和修饰成本远

高于 DNA,因而 Cas13a 的使用相较于 Cas12 更少。

3 基于CRISPR/Cas的多重生物传感器及其在食源性病原菌检测中的应用

目前 CRISPR/Cas 用于单个种类病原菌检测的应用较多,但食品中常存在多病原菌混合污染的情况,而单重检测方法难以满足多病原菌同时分析的需求。通过多重检测的方案对食品中混合污染的病原菌进行检测,可有效提高检测效率,节省人工和试剂成本。由于 Cas12 和 Cas13a 的反式切割活性不具有核酸序列选择性,因此采用单一的 Cas 蛋白在单一反应管中进行多目标同时检测面临较大的困难。为了解决该难题,研究人员进行了诸多尝试,主要解决方案包括两类。(1)利用不同 Cas 蛋白对序列切割的选择性偏好同时检测不同靶标 Su 等^[77]开发了基于 RPA 和 Cas12a、Cas13a 双通道正交检测的方法(图 5A)。利用 Cas12a 和 Cas13a 分别识别和切割 DNA 和 RNA 靶标,通过对 RNA 和 DNA 报告探针进行不同的抗体修饰使其被试纸条上相应的抗体捕获,从而实现双靶标同时检测。利用该方法检测 SARS-CoV-2 基因组的 ORF1ab 和 N 基因,检出限为 10 拷贝。(2)单一的 Cas 蛋白结合微流体、机器学习和空间编码等技术实现不同信号区分 Bruch 等^[78]开发了 CRISPR/Cas13a 介导的微流体多重电化学传感器。靶 RNA 存在时会激活 Cas13a/crRNA 的反式切割活性,裂解报告 RNA 链。通过在微流体上设计多个通道实现不同靶标的区分,从而实现多重检测。该方法可用于检测 miR-19b 和 miR-20a,检出限均为 10 nmol/L。Ackerman 等^[79]开发了用于核酸多重评估的组合阵列反应(CARMEN)。CARMEN 将针对不同靶标的 CRISPR 试剂分别包封在不同的纳升液滴内,然后分散在微孔阵列中。当多重核酸扩增产物加入到微阵列中时,对应相同靶标的 CRISPR 试剂与扩增产物发生匹配,使 Cas13a 切割报告子 RNA,产生荧光信号。CARMEN 可同时区分 169 种人类相关病毒,还能对甲型流感毒株全面分型。除此之外,利用空间编码的水凝胶微粒(HMP)和机器学习技术也能构建多重检测系统(Cas-loaded annotated micro-particles, CLAMP)^[80]。如图 5B 所示,首先将 Cas 蛋白固定在空间编码的 HMP 中,将每个 HMP 变成可用于核酸检测的离散容器。每种带有空间代码的 HMP 都对应唯一的靶标,在识别预期的核酸靶标后, Cas12a/crRNA 复合物切割 ssDNA-FQ 探针,释放 HMP 内部的荧光信号,在单个反应罐中实现多重核酸检测。

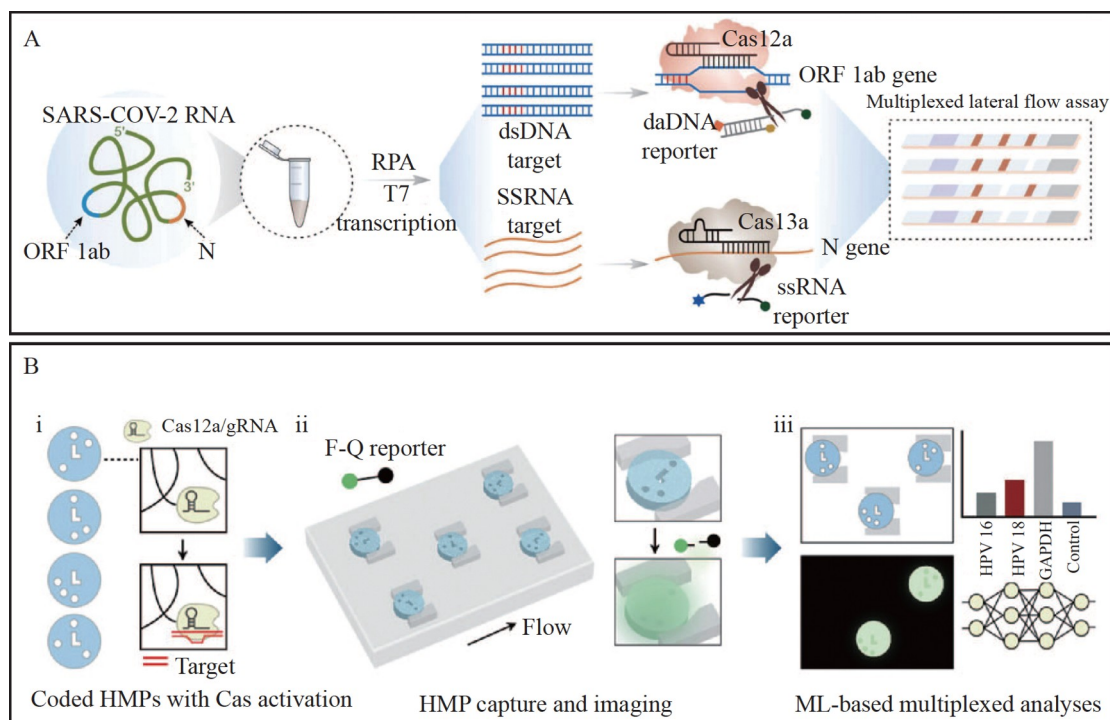


图5 基于 CRISPR/Cas 的多重生物传感器: (A)基于 Cas12a 和 Cas13a 双效应蛋白协同作用的多重检测方法^[77]; (B)基于空间编码的多重检测方法^[80]

Fig.5 Multiple-biosensor based on CRISPR/Cas: (A) Multiplexed detection method based on synergistic effect of Cas12a and Cas13a double-effect proteins^[77]; (B) Multiplexed detection methods based on spatial coding^[80]

将 CRISPR/Cas 用于多种食源性病原菌的同时检测已经有了初步的尝试。Qian 等^[81]研发了一种基于 Cas12a 的滑阀辅助微流控芯片。将设计的 Cas12a 检测试剂分装于两个检测室中,利用滑阀和注射器将双重 LAMP 扩增子与 CRISPR/Cas12a 检测体系混合,在紫外灯照射下可肉眼观察结果。该方法最低可检出 20 拷贝的沙门氏菌 DNA 和 30 拷贝的副溶血弧菌 DNA。Xing 等^[82]开发了一种手指驱动的微流体传感器,在不同检测室中置入针对不同病原菌的 CRISPR/Cas12a 试剂,通过手指按压使得扩增产物进入检测室,靶标存在时对应的检测室即可显出荧光。该方法可同时检测 7 种食源性病原菌,检出限低至 500 CFU/mL。

总体而言,由于 CRISPR/Cas 多重传感器的构建具有较大困难,在多种食源性病原菌同时检测中的应用还不成熟,但是,CRISPR/Cas 传感器在其它靶标中的应用可为食源性病原菌多重检测提供思路和参考。

4 总结与展望

基于 CRISPR/Cas 的生物传感器具有良好的通用性和可编程性,可用于检测多种食源性病原菌。经过巧妙的设计,许多 CRISPR/Cas 耦联核酸扩增的方法可检出低至 amol/L 的靶标核酸,具有极高的灵敏度。将 CRISPR/Cas 与 SERS、侧流免疫层析、显色和荧光等信号输出方式结合,可在不使用专门仪器的条件下实现食源性病原菌的检测,便于现场测定^[83]。

然而,基于 CRISPR/Cas 的检测技术仍然存在一些挑战。(1)Cas 效应子对 PAM 或 PFS 的识别要求使某些序列检测受到限制^[84]。尽管已开发了无需 PAM 序列的检测方法,但这些方法的灵敏度和特异性较差,需进一步研究 Cas 蛋白的作用机制,获取一些人工改造的 Cas 蛋白,增加 Cas 蛋白的种类或其 PAM 序列的选择性,使其能用于非传统 PAM 序列依赖的核酸序列检测。(2)虽然优化的 crRNA 可减少 CRISPR/Cas 测定中的脱靶效应,但脱靶现象在实际测定中难以避免,并且可能导致结果误判。因此,加强计算机算法对脱靶效应的评估以及 crRNA 序列设计,提高 CRISPR/Cas 的靶向识别作用,将是一个重要的研究方向。(3)Cas 蛋白的非特异性反式切割能力使得多重检测中不同靶标的信号难以区分,多重检测仍面临较大挑战。开发并普及微流控芯片,降低芯片和仪器成本,将极大地促进多重检测方法的推广应用。(4)目前,核酸扩增与 CRISPR/Cas 结合只可定性分析病原菌,定量检测性能仍需提高。探究核酸扩增和 CRISPR/Cas 切割反应过程的动力学机理,研究二者的互作机制,减少 CRISPR/Cas 与核酸扩增的相互抑制,是实现定量检测的重要途径。(5)上述部分检测方法还未拓展应用于检测食源性致病菌,但对开发食源性致病菌传感器具有借鉴意义。

综上,CRISPR/Cas 检测技术目前还不能取代荧光定量 qPCR 在病原菌检测领域的地位。另外,关于 CRISPR/Cas 传感器的使用标准与技术规范仍需要大力完善。随着各种相关技术的发展与进步,基于 CRISPR/Cas 的生物传感器在食源性病原菌现场检测中将发挥越来越重要的作用。

References

- [1] ZHAO J, GUO Y, MA X, LIU S, SUN C, CAI M, CHI Y, XU K. *Foods*, 2023, 12(22): 4067.
- [2] LARYEA E B, GYIMAH C G. *Int. J. Epidemiol.*, 2021, 50(1): dyab168.052.
- [3] ZENG D, CHEN Z, JIANG Y, XUE F, LI B. *Front. Microbiol.*, 2016, 7: 1833.
- [4] LV X, HUANG Y, LIU D, LIU C, SHAN S, LI G, DUAN M, LAI W. *J. Agric. Food Chem.*, 2019, 67(33): 9390-9398.
- [5] SANTOS E A, ICHINOSE R M, ALMEIDA R T. *Biotechniques*, 2019, 67(6): 271-275.
- [6] ALY N S M, KIM H S, MAREI Y M, ELHAMSHARY A S, BAYOUMI I R, OMAR R E, MOHAMMED D A, MIYOSHI S I, RASHED G A. *Int. J. Nanomed.*, 2023, 18: 1335-1345.
- [7] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, ESSLETZBICHLER P, DY A J, JOUNG J, VERDINE V, DONGHIA N, DARINGER N M, FREIJE C A, MYHRVOLD C, BHATTACHARYA R P, LIVNY J, REGEV A, KOONIN E V, HUNG D T, SABETI P C, COLLINS J J, ZHANG F. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [8] CHEN Y, XU X, WANG J, ZHANG Y, ZENG W, LIU Y, ZHANG X. *Anal. Chem.*, 2022, 94(27): 9724-9731.
- [9] KARLIKOW M, AMALFITANO E, YANG X, DOUCET J, CHAPMAN A, MOUSAVI P S, HOMME P, SUTYRINA P, CHAN W, LEMAK S, YAKUNIN A F, DOLEZAL A G, KELLEY S, FOSTER L J, HARPUR B A, PARDEE K. *Nat. Commun.*, 2023, 14(1): 1505.

- [10] XIAO Y, REN H, HU P, WANG Y, WANG H, LI Y, FENG K, WANG C, CAO Q, GUO Y, LIU Z, LU S. *Foods*, 2022, 11(14): 2160.
- [11] ZHONG Y M, LIU M, DING Y, WU Q P, ZHANG J M, MA G X, XU T X, WANG Z M, CHEN M T, XUE L, YE Q H, WANG J. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2023, 175: 114500.
- [12] WANG L, BAI L, WANG H, HE K, WANG R, WANG Q, ZHANG F, XU X. *Microchem. J.*, 2023, 191: 108870.
- [13] BAO Q, SUN J, FU X, SHENG L, YE Y, JI J, ZHANG Y, WANG J, PING J, SUN X. *Small*, 2023, 19(29): 2207343.
- [14] WANG H, WU Q, ZHOU M, LI C, YAN C, HUANG L, QIN P. *Food Control*, 2022, 142: 109203.
- [15] ZHANG J X, XU J H, YUAN B, WANG X D, MAO X H, WANG J L, ZHANG X L L, YUAN Y. *Front. Public Health*, 2023, 11: 1153352.
- [16] ZHANG D, RAYKAR S, NG K. *Syn. Biol.*, 2022, 10(21): 513145.
- [17] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, SHMAKOV S A, ALKHNBASHI O S, BROUNS S J J, CHARPENTIER E, CHENG D, HAFT D H, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA F J M, SCOTT D, SHAH S A, SIKSNYS V, TERNS M P, VENCLOVAS Č, WHITE M F, YAKUNIN A F, YAN W, ZHANG F, GARRETT R A, BACKOFEN R, VAN DER OOST J, BARRANGOU R, KOONIN E V. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, 18(2): 67-83.
- [18] GUK K, YI S, KIM H, BAE Y, YONG D, KIM S, LEE K S, LIM E K, KANG T, JUNG J. *Biosens. Bioelectron.*, 2023, 219: 114819.
- [19] ASADBEIGI A, NOROUZI M, VAFAEI SADI M S, SAFFARI M, BAKHTIARIZADEH M R. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10: 957131.
- [20] BAI L, WANG L, HUANG S, BAI R, LV X, SUN L, ZHANG F, XU X. *J. Agric. Food Chem.*, 2022, 70(7): 2401-2409.
- [21] CHEN X, WANG L, HE F, CHEN G, BAI L, HE K, ZHANG F, XU X. *Anal. Chem.*, 2021, 93(42): 14300-14306.
- [22] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA J A, CHARPENTIER E. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [23] MALI P, AACH J, STRANGES P B, ESVELT K M, MOOSBURNER M, KOSURI S, YANG L, CHURCH G M. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(9): 833-838.
- [24] STERNBERG S H, LAFRANCE B, KAPLAN M, DOUDNA J A. *Nature*, 2015, 527(7576): 110-113.
- [25] JIANG F, TAYLOR D W, CHEN J S, KORNFELD J E, ZHOU K, THOMPSON A J, NOGALES E, DOUDNA J A. *Science*, 2016, 351(6275): 867-871.
- [26] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, KONERMANN S, SHEHATA S I, DOHMAE N, ISHITANI R, ZHANG F, NUREKI O. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
- [27] TREVINO A E, ZHANG F. *Methods Enzymol.*, 2014, 546: 161-174.
- [28] KOO B, KIM D E, KWEON J, JIN C E, KIM S H, KIM Y, SHIN Y. *Sens. Actuators, B*, 2018, 273: 316-321.
- [29] LEE H, CHOI J, JEONG E, BAEK S, KIM H C, CHAE J H, KOH Y, SEO S W, KIM J S, KIM S J. *Nano Lett.*, 2018, 18(12): 7642-7650.
- [30] FONFARA I, RICHTER H, BRATOVIČ M, LE RHUN A, CHARPENTIER E. *Nature*, 2016, 532(7600): 517-521.
- [31] YAMANO T, ZETSCHKE B, ISHITANI R, ZHANG F, NISHIMASU H, NUREKI O. *Mol. Cell*, 2017, 67(4): 633-645.e3.
- [32] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, SLAYMAKER I M, MAKAROVA K S, ESSLETZBICHLER P, VOLZ S E, JOUNG J, VAN DER OOST J, REGEV A, KOONIN E V, ZHANG F. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [33] STELLA S, MESA P, THOMSEN J, PAUL B, ALCÓN P, JENSEN S B, SALIGRAM B, MOSES M E, HATZAKIS N S, MONTOYA G. *Cell*, 2018, 175(7): 1856-1871.e21.
- [34] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, DA COSTA M, TIAN X, PALEFSKY J M, DOUDNA J A. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [35] YANG H, GAO P, RAJASHANKAR K R, PATEL D J. *Cell*, 2016, 167(7): 1814-1828.e12.
- [36] SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, WOLF Y I, GOOTENBERG J S, SEMENOVA E, MINAKHIN L, JOUNG J, KONERMANN S, SEVERINOV K, ZHANG F, KOONIN E V. *Mol. Cell*, 2015, 60(3): 385-397.
- [37] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL M R, KNIGHT S C, BURSTEIN D, CATE J H D, TJIAN R, DOUDNA J A. *Nature*, 2016, 538(7624): 270-273.
- [38] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, ZHANG F. *Nat. Protoc.*, 2019, 14(10): 2986-3012.
- [39] ZHAO L, QIU M, LI X, YANG J, LI J. *Front. Microbiol.*, 2022, 13: 1060947.
- [40] ZHOU W, HU L, YING L, ZHAO Z, CHU P K, YU X F. *Nat. Commun.*, 2018, 9: 5012.
- [41] WANG X, CHEN X, CHU C, DENG Y, YANG M, HUO D, XU F, HOU C, LV J. *Talanta*, 2021, 233: 122554.
- [42] ZHANG Y, WANG Y, XU L, LOU C, OUYANG Q, QIAN L. *Methods*, 2022, 203: 70-77.
- [43] ZENG M, KE Y, ZHUANG Z, QIN C, LI L Y, SHENG G, LI Z, MENG H, DING X. *Anal. Chem.*, 2022, 94(30): 10805-10812.
- [44] ZAGHLOUL H, EL-SHAHAT M. *World J. Hepatol.*, 2014, 6(12): 916-922.
- [45] WANG X, XIONG E, TIAN T, CHENG M, LIN W, WANG H, ZHANG G, SUN J, ZHOU X. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2497-2508.

- [46] BENGTSON M, BHARADWAJ M, FRANCH O, VAN DER TORRE J, MEERDINK V, SCHALLIG H, DEKKER C. *Nanoscale*, 2022, 14(5): 1885-1895.
- [47] WANG T, WANG Y, CHEN P, YIN B C, YE B C. *Anal. Chem.*, 2022, 94(36): 12461-12471.
- [48] WANG H, WU Q, YAN C, XU J, QIN X, WANG J, CHEN W, YAO L, HUANG L, QIN P. *Sens. Actuators, B*, 2022, 369: 132293.
- [49] ZHU R, JIANG H, LI C, LI Y, PENG M, WANG J, WU Q, YAN C, BO Q, WANG J, SHEN C, QIN P. *Anal. Chim. Acta*, 2023, 1257: 341175.
- [50] ZHOU M, LI X, WEN H, HUANG B, REN J, ZHANG J. *Analyst*, 2023, 148(10): 2308-2315.
- [51] TRAM T T B, HA V T N, TRIEU L P T, ASHTON P M, CRAWFORD E D, THU D A, QUANG N L, THWAITES G E, WALKER T M, ANSCOMBE C, THUONG N T T. *J. Clin. Microbiol.*, 2023, 61(4): 10.1128/jcm.01634-22.
- [52] TSAI S Q, ZHENG Z, NGUYEN N T, LIEBERS M, TOPKAR V V, THAPAR V, WYVEKENS N, KHAYTER C, IAFRATE A J, LE L P, ARYEE M J, JOUNG J K. *Nat. Biotechnol.*, 2015, 33(2): 187-197.
- [53] LI J, YANG S, ZUO C, DAI L, GUO Y, XIE G. *ACS Sens.*, 2020, 5(4): 970-977.
- [54] CUI J, LUO Q, WEI C, DENG X, LIANG H, WEI J, GONG Y, TANG Q, ZHANG K, LIAO X. *Anal. Chim. Acta*, 2024, 1285: 342028.
- [55] HUANG Y, GU D, XUE H, YU J, TANG Y, HUANG J, ZHANG Y, JIAO X. *Front. Microbiol.*, 2021, 12: 649010.
- [56] YUAN J R, WANG L, HUANG L, HE K Y, WANG H M, XU X H, SU B, WANG J. *Anal. Chem.*, 2023, 96(1): 220-228.
- [57] DING X, YIN K, LI Z, LALLA R V, BALLESTEROS E, SFEIR M M, LIU C. *Nat. Commun.*, 2020, 11(1): 4711.
- [58] DING X, YIN K, LI Z, SFEIR M M, LIU C. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 184: 113218.
- [59] ZENG Q, ZHOU M, HU Z, DENG W, LI Z, WU L, LIANG D. *Anal. Chim. Acta*, 2023, 1276: 341622.
- [60] LIU J, CHEN J, WU D, HUANG M, CHEN J, PAN R, WU Y, LI G. *Anal. Chem.*, 2021, 93(29): 10167-10174.
- [61] SUEA-NGAM A, HOWES P D, DEMELLO A J. *Chem. Sci.*, 2021, 12(38): 12733-12743.
- [62] LIN L, ZHA G, WEI H, ZHENG Y, YANG P, LIU Y, LIU M, WANG Z, ZOU X, ZHU H, LUO Q, LI J, LIN M. *Food Control*, 2023, 145: 109505.
- [63] MUKAMA O, WU J, LI Z, LIANG Q, YI Z, LU X, LIU Y, LIU Y, HUSSAIN M, MAKAFE G G, LIU J, XU N, ZENG L. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, 159: 112143.
- [64] LI Y A, SHI Z L, HU A Z, CUI J S, YANG K, LIU Y, DENG G Q, ZHU C C, ZHU L. *Diagnostics*, 2022, 12(4): 829.
- [65] LU P, CHEN J L, LI Z, LI Z P, ZHANG J Y, KAN B, PANG B. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2022, 12: 863435.
- [66] LI C, CHEN X, WEN R, MA P, GU K, LI C, ZHOU C, LEI C, TANG Y, WANG H. *Biosensors*, 2022, 12(3): 154.
- [67] ZHI S, SHEN J, LI X, JIANG Y, XUE J, FANG T, XU J, WANG X, CAO Y, YANG D, YAO Z, YU D. *J. Agric. Food Chem.*, 2022, 70(30): 9557-9566.
- [68] LI Y, LI T, LIU B F, HU R, ZHU J, HE T, ZHOU X, LI C, YANG Y, LIU M. *Chem. Commun.*, 2020, 56(83): 12526-12529.
- [69] WANG L, HE F, CHEN X, HE K, BAI L, WANG Q, ZHANG F, XU X. *Sens. Actuators, B*, 2022, 370: 132368.
- [70] HANG X M, LIU P F, TIAN S, WANG H Y, ZHAO K R, WANG L. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 211: 114393.
- [71] LI J, TANG L, LI T, LI K, ZHANG Y, NI W, XIAO M M, ZHAO Y, ZHANG Z Y, ZHANG G J. *ACS Sens.*, 2022, 7(9): 2680-2690.
- [72] LÓPEZ-VALLS M, ESCALONA-NOGUERO C, RODRÍGUEZ-DÍAZ C, PARDO D, CASTELLANOS M, MILÁN-ROIS P, MARTÍNEZ-GARAY C, COLOMA R, ABREU M, CANTÓN R, GALÁN J C, MIRANDA R, SOMOZA Á, SOT B. *Anal. Chim. Acta*, 2022, 1205: 339749.
- [73] AN B, ZHANG H, SU X, GUO Y, WU T, GE Y, ZHU F, CUI L. *Front. Microbiol.*, 2021, 12: 732426.
- [74] CHANDRASEKARAN S S, AGRAWAL S, FANTON A, JANGID A R, CHARREZ B, ESCAJEDA A M, SON S, MCINTOSH R, TRAN H, BHUIYA A, DERBY M D D, SWITZ N A, ARMSTRONG M, HARRIS A R, PRYWES N, LUKARSKA M, BIERING S B, SMOCK D C J, MOK A, KNOTT G J, DANG Q, VAN DIS E, DUGAN E, KIM S, LIU T N Y, CONSORTIUM I D, MOEHLE E A, KOGUT K, ESKENAZI B, HARRIS E, STANLEY S A, LAREAU L F, TAN M X, FLETCHER D A, DOUDNA J A, SAVAGE D F, HSU P D. *Nat. Biomed. Eng.*, 2022, 6(8): 944-956.
- [75] LIU R, ALI S, HUANG D, ZHANG Y, LU P, CHEN Q. *Food Anal. Methods*, 2023, 16(2): 356-366.
- [76] ZHOU J, YIN L, DONG Y, PENG L, LIU G, MAN S, MA L. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1127: 225-233.
- [77] SU G, ZHU M, LI D, XU M, ZHU Y, ZHANG Y, ZHU H, LI F, YU Y. *Sens. Actuators, B*, 2022, 371: 132537.
- [78] BRUCH R, JOHNSTON M, KLING A, MATTMÜLLER T, BAASKE J, PARTEL S, MADLENER S, WEBER W, URBAN G A, DINCER C. *Biosens. Bioelectron.*, 2021, 177: 112887.
- [79] ACKERMAN C M, MYHRVOLD C, THAKKU S G, FREIJE C A, METSKY H C, YANG D K, YE S H, BOEHM C K, KOSOKO-THORODDSSEN T S F, KEHE J, NGUYEN T G, CARTER A, KULESA A, BARNES J R, DUGAN V G, HUNG D T, BLAINEY P C, SABETH P C. *Nature*, 2020, 582(7811): 277-282.
- [80] ROH Y H, LEE C Y, LEE S, KIM H, LY A, CASTRO C M, CHEON J, LEE J H, LEE H. *Adv. Sci.*, 2023, 10(10): 2206872.

- [81] QIAN S, CHEN Y, PENG C, WANG X, CHE Y, WANG T, WU J, XU J. *Anal. Chim. Acta*, 2023, 1239: 340670.
- [82] XING G, SHANG Y, WANG X, LIN H, CHEN S, PU Q, LIN L. *Biosens. Bioelectron.*, 2023, 220: 114885.
- [83] ZHUANG J, ZHAO Z, LIAN K, YIN L, WANG J, MAN S, LIU G, MA L. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 207: 114167.
- [84] ZHOU J, CHEN P, WANG H, LIU H, LI Y, ZHANG Y, WU Y, PAEK C, SUN Z, LEI J, YIN L. *Mol. Ther.*, 2022, 30(1): 244-255.

Advances of CRISPR/Cas-based Biosensor in Detection of Food-Borne Pathogens

ZHANG Xiao-Yuan^{1,2}, YAO Zhi-Hao², HE Kai-Yu², WANG Hong-Mei², XU Xia-Hong²,
WU Zu-Fang^{*1}, WANG Liu^{*2}

¹(College of Food and Pharmacy, Ningbo University, Ningbo 315000, China)

²(Institute of Agro-product Safety and Nutrition, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences,
Hangzhou 310021, China)

Abstract Rapid and accurate detection methods for food-borne pathogens are essential to ensure food safety and human health. One promising innovation in this area is the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems (CRISPR/Cas) biosensor, which utilizes Cas protein and CRISPR RNA (crRNA) ribonucleo protein to specifically recognize target genes, and converts target signals into detectable physical and chemical signals. The CRISPR/Cas biosensor shows many advantages, such as high specificity, programmability, and ease of use, making it promising to pathogen detection. This paper introduced the principles and characteristics of CRISPR/Cas systems, along with the strategies for signal recognition, amplification, and output based on different CRISPR/Cas biosensors, and their respective applications in food-borne pathogen detection. Furthermore, the construction principles and challenges of multiple biosensors based on CRISPR/Cas were explored, as well as their potential for simultaneous detection of multiple pathogens. Finally, the challenges and future development trends of CRISPR/Cas-based biosensors in rapid pathogen detection were discussed, aiming to provide valuable reference and inspiration for biosensor designers and food safety practitioners.

Keywords Food-borne pathogens; CRISPR/Cas; Biosensor; Review

(Received 2023-09-15; accepted 2024-02-01)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32172307) and the Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province, China (No. LGN21C200007).