



基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测研究进展

周桓^{1,2}, 邵艳娜^{1,3}, 王涓⁴, 吴清平¹, 丁郁^{1,2,3*}

¹广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 广东 广州 510070

²暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632

³暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632

⁴华南农业大学食品学院, 广东 广州 510640

摘要: 由成簇、规则间隔的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统是广泛存在于多数细菌和古细菌中的一种适应性免疫系统。CRISPR/Cas 系统可识别并结合外源入侵的核酸分子, 之后 Cas 蛋白的切割活性被激活, 能够对入侵的核酸分子进行切割使其降解。利用 CRISPR/Cas 系统特异的序列识别及切割活性, 将其应用于核酸检测中, 为提高检测灵敏度及特异性等性能指标提供了一种新思路。本文介绍了 CRISPR/Cas 系统的发展、作用机制等, 对多样化的 Cas 蛋白在核酸检测中的代表性应用研究进行总结, 进一步讨论了 CRISPR/Cas 技术应用于核酸检测中存在的优缺点, 并对未来研究进行了展望, 为基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测方法在病原微生物的检测中提供参考和依据。

关键词: CRISPR/Cas, Cas 蛋白, 切割活性, 核酸检测, 病原微生物

由病原微生物造成的安全问题涉及面广且影响日益严重, 对人类的健康和财产威胁巨大。2017 年中国公共卫生事件报告统计数据显示, 由病原微生物所引起的报告起数、中毒人数及死亡人数均位居首位, 占比分别为 57.47% (200/348),

64.8% (4793/7389)和 64.29% (90/140)^[1]。在短时间内准确快速地对病原微生物进行检测, 从而实现对食品安全的监测至关重要, 同时也是一种巨大的挑战^[2-3]。在全球范围内, 由病原微生物导致的疾病发病率不断攀升, 给卫生系统带来了沉

基金项目: 国家“食品安全重点研发”(2018YFC1602500); 广东省基础与应用基础研究重大项目(2020B0301030005); 国家自然科学基金(31730070); 广东省科学院重点科技计划(2019GDASYL-0201001); 广东省微生物安全与健康重点实验室基金(2020B121201009)

*通信作者。Tel: +86-20-85222379; E-mail: dingyu@jnu.edu.cn

收稿日期: 2021-02-25; 修回日期: 2021-05-14; 网络出版日期: 2021-06-07

重负担，且大大降低了生产力。2002–2003 年，由 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)造成严重急性呼吸综合症的流行，2012 年发现的中东呼吸综合症冠状病毒(MERS-CoV)可引起严重的呼吸道疾病，这些病毒的传播在世界范围内造成了严重影响^[4–7]。2019 年新型冠状病毒 SARS-CoV-2(COVID-19)所引起的疾病在全球肆虐，死亡人数已超过 296 万，并造成极大的经济损失^[8]。随着新型病原微生物的出现、已知病原微生物的突变及细菌抗生素耐药性的增加，传染病的发病率和死亡率日益成为全球公共卫生的重要威胁，给医疗保健系统和社会带来巨大压力，而早期诊断是降低死亡率和医疗成本的有效方法^[9–11]。因此，开发出可快速有效检测病原微生物的新型检测技术是当务之急。

迄今为止，基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的传统核酸检测技术仍是一种重要的分子检测手段，但越来越多的新型核酸检测方法及平台不断诞生与蓬勃发展(图 1)。核酸等温扩增技术、核酸杂交技术及基于 CRISPR/Cas 体系的核酸检测技术，为建立快速有效的检测手段开辟了新方向^[12–17]。其中基于 CRISPR/Cas 体系开发的核酸检测方法已在传染病诊断中被广泛研究，可实现对病原微生物特异、灵敏的现场检测^[18]。如，基于 CRISPR/Cas 技术的副溶血性弧菌检测方法^[19]和基于 CRISPR/Cas 技术的单核增生李斯特菌的快速检测平台^[20]。CRISPR/Cas 技术应用于核酸检测中的前期研究主要集中在 Cas9、Cas12a(Cpf1)以及 Cas13a(C2c2)这 3 种蛋白。Cas9

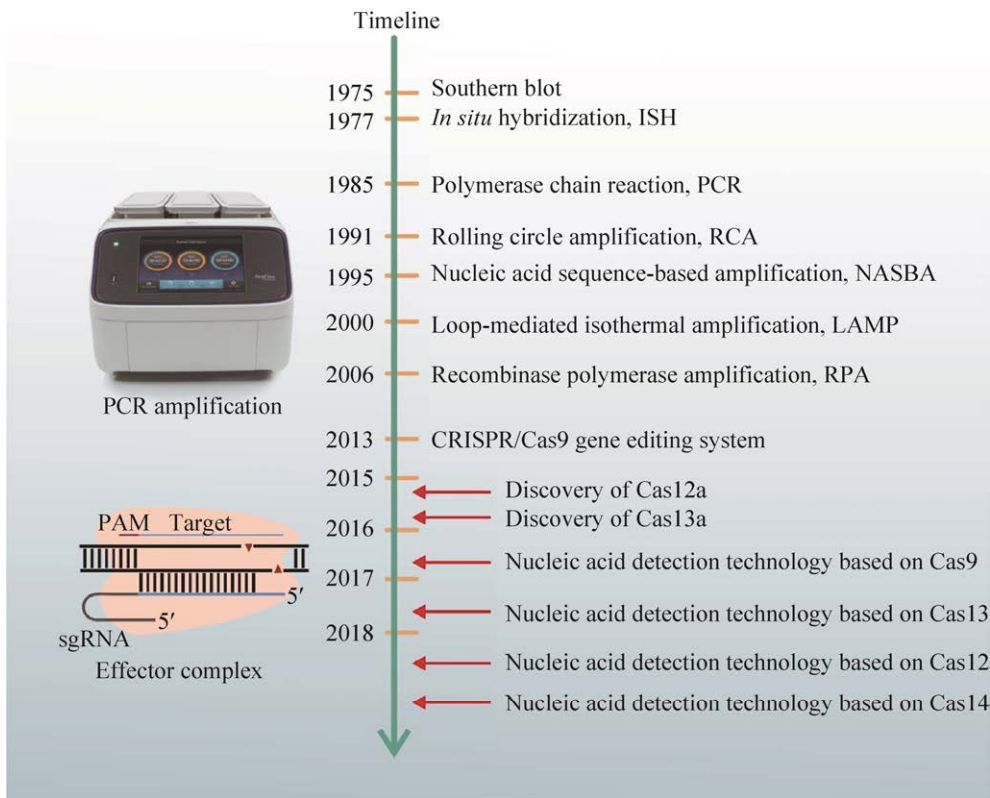


图 1. 核酸检测技术发展^[12–17]

Figure 1. Development of nucleic acid detection technologies^[12–17].

蛋白具有 2 个结构域, 分别为 HNH 和 RuvC, 其依赖的原型间隔序列毗邻基序(Protospacer adjacent motif, PAM)5' 富含 GC, Cas9 在 tracrRNA (Trans-acting CRISPR RNA) 及 crRNA(CRISPR RNA)的引导下作用于靶标 DNA。Cas12a 的催化结构域为 RuvC, 在 crRNA 的引导下作用于靶标双链 DNA(Double-stranded DNA, dsDNA), 其依赖的 PAM 序列 5'富含 AT。Cas13a 蛋白具有 2 个 HEPN 的结构域, 在 crRNA 的引导下作用于靶标 RNA, 其依赖的原间隔子侧翼位点(Protospacer flanking site, PFS)的 3'端必须非 G^[16-17,21-23]。近期发现的 Cas14a 具有 RuvC 的催化结构域, 能够靶向单链 DNA(Single-stranded DNA, ssDNA), 并且不依赖 PAM^[24]。随着不同 Cas 蛋白研究的深入, 它们具有的核酸内切酶活性及附属切割活性逐渐被发现, 并应用于核酸检测技术的研发中, 因此基于 CRISPR/Cas 体系的核酸检测技术是目前乃至未来十分重要的研究方向之一。本文综述了基于 CRISPR/Cas 体系核酸检测方法的研究进展, 重点分析了不同 Cas 蛋白检测靶的特征与案例, 旨在为进一步研发病原微生物的新型检测方法提供可靠依据。

1 CRISPR/Cas 技术及其在核酸检测中的发展

1.1 CRISPR/Cas 系统及其分类

CRISPR/Cas 系统是由成簇、规则间隔的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)组成, 存在于许多的古细菌和细菌中^[25-26]。1987 年, 在大肠杆菌中发现了一组 29 个核苷酸的重复序列, 由不相关、不重复但类似的短序列隔开^[27-28], 2002 年重复间隔序列被命名为 CRISPR^[29]。随后研究发现 CRISPR 间隔区与噬菌体或质粒序列之间的匹配, 暗示了 CRISPR 基因座在防御入侵 DNA 中的作用, 并证明该序列介导了一种适应性免疫途径^[30-34]。2011 年, Makarova 等揭示了 CRISPR/Cas 系统通过适应、表达和干扰 3 个阶段介导的免疫机理(图 2): 在适应阶段, 与病毒或质粒序列同源的短 DNA 片段会被整合到 CRISPR 自身的间隔区; 在表达阶段, CRISPR 基因序列的一级转录本 pre-crRNA 产生, 并被加工成 crRNA, crRNA 与

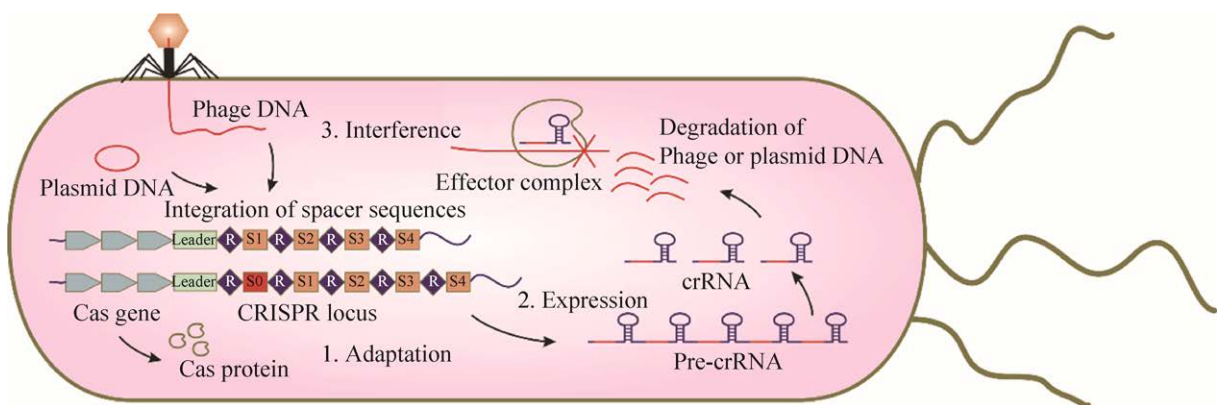


图 2. CRISPR/Cas 系统的组成与功能^[37]

Figure 2. Function and organization of the CRISPR/Cas system^[37].

病毒或质粒的靶序列匹配; 在干扰阶段, crRNA 将 Cas 蛋白引导至与间隔区匹配的病毒或质粒靶序列处形成效应复合物, 并利用 Cas 蛋白切割靶序列^[21-22]。其中, PAM 序列是 crRNA 引导 Cas 蛋白正确识别靶序列的必要条件^[35-36]。

在 CRISPR/Cas 系统中存在着多样化的 Cas 蛋白, 按照 Cas 蛋白的组成可以将 CRISPR/Cas 系统大致分为 2 类: 第一类系统依赖的 Cas 蛋白为多亚基蛋白复合物, 第二类系统依赖的 Cas 蛋白为单一效应蛋白。随着新型 Cas 蛋白的发现, 可进一步根据 Cas 蛋白基因结构及重复间隔序列结构将 CRISPR/Cas 分为 6 类(Type I-VI), 其中 I 型、III型和IV型属于第一类系统, II 型、V 型和VI型属于第二类系统^[22,38]。Cas9 属于 II 型, Cas12a 属于V型, Cas13a 属于VI型, 而这 3 种 Cas 蛋白都是单组分的效应蛋白^[17]。

1.2 基于 CRISPR/Cas 系统检测技术的原理

基于 CRISPR/Cas 系统的检测技术主要是利用 CRISPR/Cas 系统原有的适应、表达和干扰 3 个阶段, 进行针对性的改造以实现特异性靶标的检测。通过人工设计向导 RNA (Single-guide RNA, sgRNA), 使其特异性识别靶序列后, Cas 蛋白裂解靶序列从而形成特异性的双链断裂(Double strand breaks, DSB), 而 sgRNA 的结构取决于所用的 Cas 蛋白^[39]。CRISPR/Cas 技术基于 Cas 蛋白的作用, 不同的 Cas 蛋白应用于核酸检测中的机制存在差异, 用于检测的 CRISPR/Cas 系统与 Cas 蛋白也具有不同的特点(表 1)。基于 Cas9 的核酸检测主要依赖于特异性识别靶序列的能力, 针对靶标设计特异性的 sgRNA, 可实现对不同基因型的检测^[39-40]。基于 Cas12、Cas13 及 Cas14 的核酸

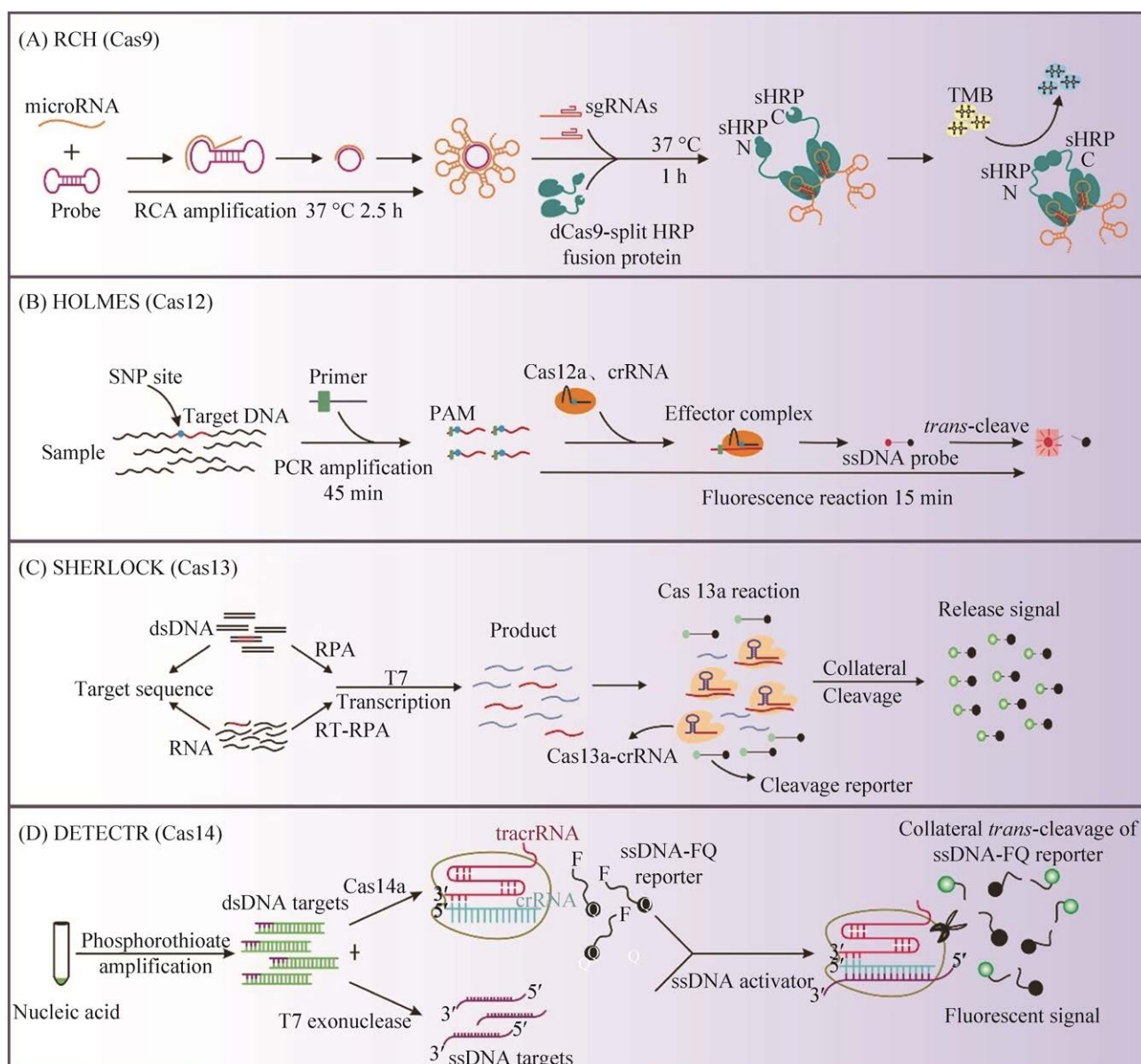
检测方法依赖于 Cas 蛋白的附属切割活性, 其中 Cas13 靶向 ssRNA, Cas14 靶向 ssDNA^[16,24,38-39]。当 Cas 蛋白与 sgRNA、靶序列形成效应复合物时, 其附属切割活性被激活, 对已被标记的 ssRNA 或 ssDNA 报告基因进行切割, 从而释放出信号达到检测效果^[40]。

2 CRISPR/Cas 技术在核酸检测中的应用研究

随着 CRISPR/Cas 系统研究的不断深入, Cas 蛋白的特点及功能活性被逐渐认识并应用。最初对 Cas9 的研究证明, RNA 分子可引导 Cas9 蛋白识别并切割特定的 DNA 序列, 因此, 该系统被运用在基因组编辑中, 从而被作为一种新型生物技术进行了广泛的研究^[23,41-42]。随后更多的 Cas 蛋白被发现, Cas12a、Cas13a 被定义并命名。研究人员发现这些 Cas 蛋白属于第二类 CRISPR/Cas 系统成员, 并具有附属的切割活性^[16-17]。最近的研究发现了 CRISPR/Cas14 系统, Cas14 可识别靶标并触发 ssDNA 分子的非特异性切割^[24]。CRISPR/Cas 系统能够识别并切割核酸序列, 因此被广泛的应用在核酸检测中。针对不同的待检病原微生物, 需要选择不同的 Cas 蛋白。目前已知的病原微生物包括细菌、真菌、病毒等, 而病毒又分为 RNA 病毒和 DNA 病毒, 在已知的 Cas 蛋白中只有 Cas13a 可直接靶向 RNA 病毒。如果实际操作中选择其他类型的 Cas 蛋白, 需要将待检的 RNA 分子反转录为 DNA 后, 才可建立相应的检测方法。本文将基于不同 Cas 蛋白的活性, 分别举例介绍其在核酸检测中的应用(图 3)。

表 1. 用于检测的 CRISPR/Cas 系统与 Cas 蛋白特点^[16-17,21-24]Table 1. Characteristics of CRISPR/Cas system and Cas protein used for detection^[16-17,21-24]

Classification	Cas protein	Domain	Target	Collateral cleavage activity	PAM/PFS
CRISPR/Cas9	Cas9	HNH and RuvC	DNA	No	3' GC-rich PAM
CRISPR/Cas12	Cas12	RuvC	DNA	Yes	5' AT-rich PAM
CRISPR/Cas13	Cas13	HEPN	RNA	Yes	3' PFS: non-G
CRISPR/Cas14	Cas14	RuvC	DNA	Yes	No

图 3. 不同 CRISPR/Cas 检测系统原理图^[43-46]Figure 3. Schematic mechanism of different CRISPR/Cas detection systems^[43-46].

2.1 Cas9 在核酸检测中的应用

2016年, Collins等首次将CRISPR/Cas技术应用于核酸检测中, 成功地将NASBA (Nuclear acid sequence-based amplification)与Cas9效应蛋白整合在一起, 开发了检测寨卡病毒的纸基传感器(NASBA/CRISPR cleavage, NASBACC), 实现了对不同寨卡病毒亚型的有效区分^[47]。该方法首先对目标RNA进行扩增, 将扩增产物添加至纸质传感器上打开夹结构, LacZ合成被激活发生生化反应, 进而产生黄色到紫色的颜色变化, 肉眼即可进行观察。随后根据CRISPR/Cas9系统对PAM序列优异的识别能力, 该检测平台设计了一个特异的sgRNA, 其特异性识别所依赖的PAM序列只存在于美国寨卡病毒基因组中但不存在于非洲寨卡病毒基因组中, 因此Cas9对不同的基因型表现出不同的切割活性, 可对寨卡病毒的不同亚型进行精确区分。该系统可进行单碱基的识别, 并在3h内得到检测结果。

对Cas9的2个核酸酶结构域进行突变, 得到了失去剪切能力的dCas9(Nuclease-deactivated Cas9)^[48-49]。利用dCas9对序列的识别作用, 一种基于荧光素酶修饰dCas9蛋白的核酸检测方法被开发, 实现了对结核分枝杆菌的检测^[50]。该方法将荧光素酶分为2个部分(N端部分与C端部分), 分别与2个dCas9蛋白融合。通过设计特异的二重体sgRNA, 当2个dCas9同时识别并结合靶标时, 使荧光素酶两个部分的距离拉近, 恢复其催化活性从而发光以达到检测效果。目前miRNA检测中存在程序复杂、成本高和灵敏度低等问题, 为此研究人员建立了一种基于CRISPR/Cas9的RCA-CRISPR-HRP(RCH)检测方法(图3A), 以实现低成本和高效率的检测^[43]。该方法不仅成本

低(每次检测费用低至1.727美元), 还可实现fM级和单碱基差异miRNA的检测, 整个检测流程可在4h内完成。

2.2 Cas12 在核酸检测中的应用

Cas12a蛋白又被称为Cpf1蛋白, 属于第二大类CRISPR/Cas的V型系统^[16]。在RNA的引导下, 该蛋白能够特异性结合并切割外源DNA。2018年, Chen等研究发现, 当CRISPR/Cas12a蛋白以序列特异性的方式切割dsDNA时, 会诱发强烈的、非特异性ssDNA的反式切割。作者利用Cas12a这一附属切割活性开发了一种准确快速的检测方法。该检测方法将Cas12a与等温扩增相结合, 命名为DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter), 并实现患者样品中人乳头瘤病毒(HPV)高灵敏检测^[51]。从肛门拭子中提取HPV的dsDNA, 通过重组酶聚合酶等温扩增技术(Recombinase polymerase amplification, RPA)进行扩增, 再将Cas12a-crRNA复合物和可进行荧光淬灭的ssDNA探针加入反应体系。Cas12a-crRNA复合物结合并切割目标HPV的dsDNA, 而激活Cas12a的反式切割, 即对ssDNA探针进行切割, ssDNA的荧光报告基因在切割后产生荧光信号。DETECTR实现了从多种不同的人乳头瘤病毒亚型中准确检测出HPV16和HPV18, 具有高特异性。后续研究中为提高检测灵敏度与特异性, 并减少检测时间及反应过程中的污染, 在DETECTR的基础上提出了1种称为Cas12aVDet的检测方法。该检测方法通过将RPA与Cas12a切割活性进行整合在一个系统中反应, 将检测时长从2个小时缩短至半个小时内^[52]。

基于Cas12a对非靶向ssDNA的反式切割活性, Li等采用荧光淬灭ssDNA报告基因作为探针开发了

HOLMES (An one-hour low-cost multipurpose highly efficient system), 能够用于快速检测目标 DNA 和 RNA^[44]。利用 PCR 或其他等温扩增技术对靶 DNA 进行扩增, 并以靶 DNA 为目标设计对应的 crRNA 向导序列。当存在目标 DNA 时, Cas12a-crRNA 与靶标结合形成 Cas12a 复合物, 其反式切割活性被激活, ssDNA 报告基因被切割释放荧光信号。通过对目标 DNA 序列(包括 PAM 序列和向导序列)的不同位置进行点突变, 观察荧光信号输出强度的变化, 证明了该方法可以区分单碱基差异, 实现了人类基因型中 SNP 的高效检测(图 3-B)。HOLMES 用于检测 DNA 病毒和 RNA 病毒, 检测限可以低至 1-10 aM, 可实现单分子检测, 且不需要昂贵的试剂和专业仪器, 成本低廉。

Cas12b(C2c1)源自 VB 型的 CRISPR/Cas 系统, 研究人员基于 Cas12b 开发了 HOLMESv2 系统, 该系统可区分 SNP, 检测 RNA 病毒、人类细胞 mRNA 和环状 RNA, 并定量目标 DNA 及其在不同人类细胞系中的甲基化程度^[53]。此外, 研究人员还开发了一种 Cas12b 介导的 DNA 检测方法(Cdetection), 通过结合优化的向导 RNA 可以实现单碱基水平的差异区分。与基于 Cas12a 的检测平台相比, 该策略对被检测的靶标显示出了更高的灵敏度^[54]。

2.3 Cas13 在核酸检测中的应用

Cas13a 蛋白也被称为 C2c2 蛋白, 属于第二大类的 VI 型系统。2005 年, 通过对候选的第二大类的 CRISPR/Cas 系统进行计算和预测, 得到了以 Cas13a 蛋白为代表的新一类 VI 型 CRISPR/Cas 系统^[17]。Cas13a 蛋白在 RNA 的引导下, 形成功能性复合物并与靶标 RNA 识别, 随后激活 Cas13a 的

非特异性反式切割活性, 能够对任意单链 RNA 进行切割。根据 Cas13a 的性质, 研究人员设计了基于 CRISPR/Cas13a 系统的检测平台, 并命名为 SHERLOCK (Specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking)。该检测方法可进行单分子的 RNA 分子检测, 每个测试的成本低至 0.61 美元^[45]。Cas13a 识别的靶标为 RNA, 因此在对 DNA 进行检测时, 需要将 DNA 转录成 RNA 后再进行检测(图 3C)。与 DETECTR 类似, SHERLOCK 将 RPA 和 RNA 引导的 Cas13a 结合在一起, 诱导了非靶标链的反式切割。利用 RPA 等温扩增技术对样品中的靶标进行富集并转录成单链 RNA, 随后加入 Cas13a-crRNA 复合物和荧光 RNA 探针。当 Cas13a-crRNA 结合靶标 RNA 时, Cas13a 的附属切割活性被激活, 会对周围的荧光 RNA 探针进行切割产生荧光信号。在 SHERLOCK 中, 与荧光报告分子偶联的 RNA 被切割, 产生的荧光信号通过酶促活性被放大, 从而增强了检测灵敏度(可实现单分子的核酸检测)。研究人员不仅实现了对寨卡病毒(ZIKV)和登革热病毒(DENV)的检测, 还表示该技术可用于检测感染的病毒和细菌等病原体, 并且能够进行人类基因分型及检测无细胞等位基因 SNP 等^[45]。

2018 年, Myhrvold 等介绍了一种新的方法用于释放和保护来自临床样本的病毒核酸, 避免了在分子诊断中提取核酸的需要, 这种方法被称为 HUDSON (Heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases)。该方法通过加热和化学还原来裂解病毒颗粒, 并使体液中大量的核糖核酸酶(RNase)失活, 从而将核酸释放到溶液中^[55]。作者将 HUDSON 与 SHERLOCK 相结合, 开发了一个灵敏、特异的检测平台, 在有限的样本及设备

要求情况下, 可以直接从体液(尿、唾液、血清、血浆和全血)中检测出 ZIKV 和 DENV, 1–2 h 内即可得到结果。

2.4 Cas12/Cas13 在核酸检测中的组合应用

高度多样化的 Cas 蛋白具有不同的活性, 对于核酸检测和应用是有利的。目前主要研究的 3 种 Cas 蛋白不仅可以单独地应用于核酸检测, 而且基于其靶标底物的不同可以进行组合使用。Gootenberg 等于 2018 年开发了升级版的 SHERLOCK(SHERLOCKv2), 可以实现在单个反应中检测 3 个 ssDNA 靶标和 1 个 dsDNA 靶标^[56]。研究人员对 17 种 CRISPR/Cas13a 和/Cas13b 酶进行了生化鉴定, 选择了 3 种具有不同切割偏好的 Cas13 蛋白(LwaCas13a、PsmCas13b 和 CcaCas13b) 与 Cas12a 和 RPA 结合使用, 每一种扩增的核酸靶标与对应的 Cas-crRNA 相结合, 可激活对应 Cas 蛋白的活性而切割其对应的特异性底物, 从而产生多种不同的荧光响应, 实现对不同靶标的检测。该检测方法可以在 90 min 内通过视觉读数准确检测 ssRNA。通过与 CRISPR 相关酶 Csm6 的结合, SHERLOCKv2 实现检测信号的进一步放大, 极大地提高了检测灵敏度。基于该检测方法进一步设计了检测试纸条, 实现了检测信号的可视化输出, 不需要仪器辅助即可进行检测结果的肉眼观察。

2.5 Cas14 在核酸检测中的应用

近期研究人员发现了 CRISPR/Cas14 系统, 该系统包含的 Cas14a 可以靶向 ssDNA 序列, 并且具有由靶标介导激活的附属活性^[24]。附属活性被激活后, Cas14a 可以靶向附近的其他 ssDNA 分子。研究人员基于 Cas14 开发了一个名为

Cas14-DETECTR 的检测方法(图 3D), 可以对 ssDNA 进行检测, 在无需 PAM 序列的限制下即可对 SNP 进行高保真检测。利用该系统可以实现多重方式靶向不同的 ssDNA, 因此可针对以 ssDNA 作为遗传物质的病毒等开发核酸检测技术及平台, 从而有效应用在分子诊断领域^[46]。

3 基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测存在的优势及局限性

目前, 传统培养方法仍是临床上检测病原微生物的金标准, 通常需要 5–7 d 时间, 且仅限于可培养的病原微生物^[57]。作为分子检测方法广泛使用的实时定量 PCR(Real-time PCR, RT-PCR), 虽然具有快速、经济、灵敏度较高的优势, 但需要专业人员及昂贵的仪器才能获得准确可靠的结果^[58–59]。CRISPR/Cas 技术在核酸检测中主要应用于核酸扩增后信号进一步放大和信号转化及输出, 其中主要利用 Cas 蛋白特异性识别 PCR 扩增产物以激活切割活性, 并作用于设计的底物而将信号以荧光等方式输出达到信号放大的效果。例如, 葡萄红斑病毒是 1 种单链环状 DNA 病毒, 为解决葡萄红斑病毒感染所造成的经济损失, Li 等开发了一种利用 CRISPR/Cas12a 与金纳米等离子体的比色识别法对葡萄红斑病毒进行检测^[60]。该检测方法将 CRISPR/Cas12a 技术应用于检测到目标 DNA 后的信号转化及输出步骤。sgRNA 特异性识别靶标后, Cas12a 对设计的底物 S 进行切割, 直接实现了通过肉眼观察颜色变化来直接判读检测结果。在对新型核酸检测技术的迫切需求下, CRISPR/Cas 技术被更多地应用于核酸检测中, 所建立的检测系统也各有不同(表 2)。

表 2. 基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测应用

Table 2. Application of nucleic acid detection based on CRISPR/Cas technology

Detection system	Signal output	Target	Sensitivity	Advantage	Combined technology	References
dCas9	Fluorescence	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	10 CFU/mL	Without PCR amplification or gene purification steps	FISH	[61]
Cas9	Fluorescence	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.82 10 ⁻¹⁸ mol/L	Fast	EXPAR	[62]
HOLMES	Fluorescence	JEV, RPV	10 ⁻¹⁸ mol/L	Single-base mismatch specificity, without transcription	PCR	[44]
DETECTR	Fluorescence	HPV16/18	10 ⁻¹⁸ mol/L	Single-base mismatch specificity, without transcription	RPA	[51]
CDetection	Fluorescence	HPV16/18	10 ⁻¹⁸ mol/L	Single-base mismatch specificity	RPA	[54]
SHERLOCK	Fluorescence	Virus, bacteria, genotype human DNA	10 ⁻¹⁸ mol/L	High sensitivity and single-base mismatch specificity	T7 Transcription and RPA	[45]
SHERLOCKv2	Fluorescence	Virus, bacteria, genotype human DNA	10 ⁻²⁰ mol/L	Multiplexing, visual readout	RPA	[56]
Cas13a	Fluorescence	<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	10 copies of DNA molecule/reaction	Lower cost of enzyme	RAA	[19]

比较已开发的基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测方法, 大多都具有以下优点: 操作简便易于开发, 对单碱基突变有很高的分辨率, 一般能达到 aM 级别的检测限(10⁻¹⁸ mol/L; 如 SHERLOCK 平台可达到单分子检测级别), 不需要专业仪器, 可通过可视化进行信号读取, 能够实现定量检测及多重检测等。如对葡萄红斑病毒设计的比色识别法中, CRISPR/Cas12a 技术与 PCR 扩增技术相结合, 检测限可达 1×10² aM, 且核酸样品经过 2×10³–1×10⁴ 次稀释也能获得准确的检测分析结果^[58]。该方法的检测灵敏度高, 并能克服在样品预处理过程中不可避免的目标 DNA 损失。本团队前期工作研发了基于 CRISPR/Cas12a 技术的荧光和电化学传感器检测平台, 实现了食品样品中对单增李斯特菌的有效检测^[20,63]。而开发的基于 CRISPR/Cas12a 技术的荧光检测平台在检测单增李斯特菌 4c 血清型时, 相较于传统的 RT-PCR

方法具有更高的特异性及灵敏度^[20]。这些核酸检测技术为即时和现场检测提供了可能性, 且当样本量低或者样品未处理时, 基于 CRISPR/Cas 开发的核酸检测技术也能发挥作用, 这使得在资源有限的情况下也可实现高效的核酸检测^[64]。同时, 对 CRISPR/Cas 系统的继续深入研究无疑会发现更多有价值的 Cas 蛋白, 而这些蛋白可进一步用于提高检测的灵敏度和稳定性。毫无疑问, CRISPR/Cas 系统的发展将为核酸检测技术带来更多的创新和可能性。对于不同来源的样品, 基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测技术可快速、灵敏、便捷地鉴定其病原微生物, 从而在不同研究领域实现多种检测应用, 具有巨大的发展潜力^[39]。

虽然基于 CRISPR/Cas 开发的新型核酸检测技术显示出诸多优势, 但同时也存在一定的局限性。crRNA 引导 Cas 蛋白对靶标的识别和切割存在 2 个要求: (1) crRNA 和靶标序列之间的碱基配

对; (2) 需要靶标序列 3'端有合适的 PAM 序列。如, Cas9 所需的 PAM 序列为 NGG(其中 N 代表 A、T、C、G), 这样的 PAM 序列在核酸序列中出现的概率是 $1/4(G)*1/4(G)=1/16^{[65]}$ 。此外, Cas9 识别双链 DNA, 因此在基因组中平均每 8 个碱基对中就会出现一个 NGG 序列。当针对某一基因的识别时, 可从中找到具有合适 PAM 区域的靶标序列。但在基于 SNP 或者其他的短序列的检测时, 存在的选择很少, 对应 Cas 蛋白的特定 PAM 序列要求很难满足。例如, 基于 Cas9 的 NASBACC 的检测方法需要在 PAM 序列中进行突变以精确区分病原微生物基因型^[47]。HOLMES 的检测方法考虑到 SNP 位点附近没有合适的 PAM 序列, 因此专门设计了用于 PCR 扩增的引物以引入 PAM 序列^[44]。同时, 向导序列的长度、靶标结合位点与 PAM 序列的距离对检测中的信噪比也有着显著影响。对于定量检测以及对多种目标物的同步检测技术较少且存在限制, 需要开展更深入的研究, 并探索合适的检测策略。

随着基于 CRISPR/Cas 的核酸检测技术在各个领域的应用, 对样品预处理的方法和全过程进行实时监测需要进行完善^[20,40]。因不同的 Cas 蛋白针对的靶标存在差异, 结合靶标的能力也不同, 因此针对不同目标物的通用型检测平台有待开发。在实验室环境中开发的检测技术, 在改变应用环境时其检测效果有待进一步观察。

基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测为全球的公共卫生带来巨大的影响, 对于实现快速、灵敏、稳定、准确的即时现场检测潜力巨大, 有望为全球各地因病原微生物感染导致的疾病带来更加便捷、高效、成本低且实用的诊断工具^[66]。对于开发基于 CRISPR/Cas 的核酸检测技术时, 针对待检样品的核酸类型, 是否需对不同的 DNA

靶标或 RNA 靶标进行同步检测, 序列中是否存在 PAM 序列, 以及对输出模式和灵敏度等存在不同的需求时, 需要对这些技术中可能存在的优缺点进行综合考虑与评估, 以选择最优的检测策略。

4 总结和展望

CRISPR/Cas 技术在核酸检测中发挥了重要的作用, 无论是从各个性能指标上的提升还是为核酸检测提供的新思路, 都使基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测朝着更快速、准确、便捷、灵敏的方向发展。基于 CRISPR/Cas 的核酸检测技术可以实现病原微生物核酸 aM 级别的检测, 与传统 PCR 的 fM 检测限相比, 具有更高的灵敏度^[45,67]。即时检测鉴定目标病原微生物是实现疾病控制和治疗的关键, 而开发快速、灵敏、准确的现场检测技术与平台将改善病原微生物的检测、鉴定和风险控制。目前, 现场检测仍存在着许多局限, 包括灵敏度、成本以及对设备和专业人员的需求等。基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测技术可提供快速、灵敏、现场、特异的定量分析与多重分析, 通过合理地设计 sgRNA 序列即可实现对不同靶标的检测。同时不需要繁琐的操作处理及昂贵的辅助仪器, 可通过荧光、电化学及可视化等方法进行信号读取。对人体、动植物、食物及环境等各种样本中病原体的检测表现出巨大的发展潜力, 实现高效、低成本、简单且易于读取的即时诊断。CRISPR/Cas 系统更多功能的发现, 将为核酸检测技术的研究提供更多新工具, 对实现病原微生物的精准检测、监测与控制具有重要意义。

目前, 基于 CRISPR/Cas 的核酸检测技术主要包括目标物扩增与 Cas 蛋白介导的信号检测两个部分。在实际过程中, 由于两部分的反应最适温

度不同, 反应体系对酶活力影响较大, 通常采用两步法进行检测平台的搭建。但分步的操作较繁琐且易造成污染, 对于实现检测单分子仍存在隐患。为避免以上问题, 搭建一步法的检测平台是未来的重要发展方向, 其中对于最适温度的选择、如何保持最佳酶活力、减少反应体系对 Cas 蛋白活性的影响等都是研究重点。随着基于 CRISPR/Cas 技术的核酸检测平台的不断发展, 未来在食品安全、疾病诊断等领域将发挥更重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Wang XY, Ren JH, Wang Z, Weng XJ, Wang R. Epidemiological characteristics of food poisoning events in China, 2017. *Disease Surveillance*, 2018, 33(5): 359–364. (in Chinese)
王霄晔, 任婧寰, 王哲, 翁熹君, 王锐. 2017 年全国食物中毒事件流行特征分析. *疾病监测*, 2018, 33(5): 359–364.
- [2] Rubab M, Shahbaz HM, Olaimat AN, Oh DH. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 105: 49–57.
- [3] Umesha S, Manukumar HM. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: current applications and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(1): 84–104.
- [4] Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon LLM, Xie ZH, Chan KH, Li PH, Tan SY, Chang Q, Xie JP, Liu XQ, Xu J, Li DX, Yuen KY, Peiris JSM, Guan Y. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet*, 2003, 362(9393): 1353–1358.
- [5] Guan Y, Peiris JSM, Zheng B, Poon LLM, Chan KH, Zeng FY, Chan CWM, Chan MN, Chen JD, Chow KYC, Hon CC, Hui KH, Li J, Li VYY, Wang Y, Leung SW, Yuen KY, Leung FC. Molecular epidemiology of the novel coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, 2004, 363(9403): 99–104.
- [6] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England Journal of Medicine*, 2012, 367(19): 1814–1820.
- [7] de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(8): 523–534.
- [8] Hosseini A, Pandey R, Osman E, Victorious A, Li F, Didar T, Soleymani L. Roadmap to the bioanalytical testing of COVID-19: from sample collection to disease surveillance. *ACS Sensors*, 2020, 5(11): 3328–3345.
- [9] Zhu XJ, Yan SS, Yuan FH, Wan SG. The applications of nanopore sequencing technology in pathogenic microorganism detection. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020, 2020: 1–8.
- [10] Hershberg R. Antibiotic-independent adaptive effects of antibiotic resistance mutations. *Trends in Genetics*, 2017, 33(8): 521–528.
- [11] Wei TY, Cheng CM. Synthetic biology-based point-of-care diagnostics for infectious disease. *Cell Chemical Biology*, 2016, 23(9): 1056–1066.
- [12] Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 1975, 98(3): 503–517.
- [13] Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA–RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. *Nature*, 1977, 265(5593): 472–473.
- [14] Fire A, Xu SQ. Rolling replication of short DNA circles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(10): 4641–4645.
- [15] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*, 2006, 4(7): e204.
- [16] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771.
- [17] Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Molecular Cell*, 2015, 60(3): 385–397.
- [18] Bhattacharyya RP, Thakku SG, Hung DT. Harnessing CRISPR effectors for infectious disease diagnostics. *ACS Infectious Diseases*, 2018, 4(9): 1278–1282.
- [19] Ge YY, Su X, Zhang Q, Chen Y, Zhao KC, Wu B, Wu T, Zhu XJ, Tang Z, Zhu FC, Cui LB. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by CRISPR-Cas13a combined with recombinase aided amplification(RAA). *Modern Preventive Medicine*, 2019, 46(20): 3777–3781. (in Chinese)

- 葛以跃, 苏璇, 张倩, 陈银, 赵康辰, 吴斌, 吴涛, 朱小娟, 唐震, 朱凤才, 崔仑标. CRISPR-Cas13a 结合重组酶介导的扩增快速检测副溶血性弧菌方法的建立. *现代预防医学*, 2019, 46(20): 3777–3781.
- [20] Li F, Ye QH, Chen MT, Xiang XR, Zhang JM, Pang R, Xue L, Wang J, Gu QH, Lei T, Wei XH, Ding Y, Wu QP. Cas12aFDet: a CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1151: 338248.
- [21] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 467–477.
- [22] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11): 722–736.
- [23] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [24] Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma EB, Witte IP, Cofsky JC, Kyrpides NC, Banfield JF, Doudna JA. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR–Cas14 enzymes. *Science*, 2018, 362(6416): 839–842.
- [25] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 475–493.
- [26] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(3): 181–190.
- [27] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429–5433.
- [28] Nakata A, Amemura M, Makino K. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(6): 3553–3556.
- [29] Jansen R, van Embden JDA, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [30] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology: Reading, England*, 2005, 151(Pt 8): 2551–2561.
- [31] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(2): 174–182.
- [32] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology: Reading, England*, 2005, 151(Pt 3): 653–663.
- [33] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167–170.
- [34] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [35] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology: Reading, England*, 2009, 155(Pt 3): 733–740.
- [36] Leenay RT, Beisel CL. Deciphering, communicating, and engineering the CRISPR PAM. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429(2): 177–191.
- [37] Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature’s toolbox for genome engineering. *Cell*, 2016, 164(1-2): 29–44.
- [38] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DBT, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [39] Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(6): 1226–1233.
- [40] Li Y, Li SY, Wang J, Liu GZ. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(7): 730–743.
- [41] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex

- genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [42] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [43] Qiu XY, Zhu LY, Zhu CS, Ma JX, Hou T, Wu XM, Xie SS, Min L, Tan DA, Zhang DY, Zhu LY. Highly effective and low-cost MicroRNA detection with CRISPR-Cas9. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(3): 807–813.
- [44] Li SY, Cheng QX, Wang JM, Li XY, Zhang ZL, Gao S, Cao RB, Zhao GP, Wang J. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discovery*, 2018, 4: 20.
- [45] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356(6336): 438–442.
- [46] Aquino-Jarquin G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, 18: 428–431.
- [47] Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, Ferrante T, Ma D, Donghia N, Fan M, Daringer NM, Bosch I, Dudley DM, O'Connor DH, Gehrke L, Collins JJ. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016, 165(5): 1255–1266.
- [48] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [49] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu ZR, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442–451.
- [50] Zhang YH, Qian L, Wei WJ, Wang Y, Wang BN, Lin PP, Liu WC, Xu LZ, Li X, Liu DM, Cheng SD, Li JF, Ye YX, Li H, Zhang XH, Dong YM, Zhao XJ, Liu CH, Zhang HQM, Ouyang Q, Lou CB. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(2): 211–216.
- [51] Chen JS, Ma EB, Harrington LB, Da Costa M, Tian XR, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, 360(6387): 436–439.
- [52] Wang B, Wang R, Wang DQ, Wu J, Li JX, Wang J, Liu HH, Wang YM. Cas12aVDeT: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(19): 12156–12161.
- [53] Li LX, Li SY, Wu N, Wu JC, Wang G, Zhao GP, Wang J. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2228–2237.
- [54] Teng F, Guo L, Cui TT, Wang XG, Xu K, Gao QQ, Zhou Q, Li W. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 132.
- [55] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, Kellner MJ, Tan AL, Paul LM, Parham LA, Garcia KF, Barnes KG, Chak B, Mondini A, Nogueira ML, Isern S, Michael SF, Lorenzana I, Yozwiak NL, MacInnis BL, Bosch I, Gehrke L, Zhang F, Sabeti PC. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 2018, 360(6387): 444–448.
- [56] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, 360(6387): 439–444.
- [57] Rajapaksha P, Elbourne A, Gangadoo S, Brown R, Cozzolino D, Chapman J. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *The Analyst*, 2019, 144(2): 396–411.
- [58] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 2005, 39(1): 75–85.
- [59] Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*, 2013, 530: 67–74.
- [60] Li YY, Mansour H, Wang T, Poojari S, Li F. Naked-eye detection of grapevine red-blotch viral infection using a plasmonic CRISPR Cas12a assay. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(18): 11510–11513.
- [61] Guk K, Keem JO, Hwang SG, Kim H, Kang T, Lim EK, Jung J. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 95: 67–71.
- [62] Huang MQ, Zhou XM, Wang HY, Xing D. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(3): 2193–2200.

- [63] Li F, Ye QH, Chen MT, Zhou BQ, Zhang JM, Pang R, Xue L, Wang J, Zeng HY, Wu S, Zhang YX, Ding Y, Wu QP. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 179: 113073.
- [64] Yang H, Gao P, Rajashankar KR, Patel DJ. PAM-dependent target DNA recognition and cleavage by C2c1 CRISPR-Cas endonuclease. *Cell*, 2016, 167(7): 1814–1828.e12.
- [65] Kieper SN, Almendros C, Behler J, McKenzie RE, Nobrega FL, Haagsma AC, Vink JNA, Hess WR, Brouns SJJ. Cas4 facilitates PAM-compatible spacer selection during CRISPR adaptation. *Cell Reports*, 2018, 22(13): 3377–3384.
- [66] Sashital DG. Pathogen detection in the CRISPR-Cas era. *Genome Medicine*, 2018, 10(1): 32.
- [67] Dong J, Chen GY, Wang W, Huang X, Peng HP, Pu QL, Du F, Cui X, Deng Y, Tang Z. Colorimetric PCR-based microRNA detection method based on small organic dye and single enzyme. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(12): 7107–7111.

Research progress of nucleic acid detection based on CRISPR/Cas technology

Huan Zhou^{1,2}, Yanna Shao^{1,3}, Juan Wang⁴, Qingping Wu¹, Yu Ding^{1,2,3*}

¹ Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

² College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

³ Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

⁴ College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China

Abstract: The CRISPR/Cas system, an adaptive immune system widely found in most bacteria and archaea, is composed of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas). The CRISPR/Cas system can recognize and bind foreign invading nucleic acid. Then the cleavage activity of Cas protein is activated that can cleave and degrade the invasive nucleic acid. The specific sequence recognition and cleavage activity of the CRISPR/Cas system is applied to nucleic acid detection that provides a new research idea to improve detection performance such as detection sensitivity and specificity. This study introduces the development of the CRISPR/Cas system, its mechanism of action, etc. In addition, we also summarize the representative applications of diversified Cas proteins in nucleic acid detection. The advantages and disadvantages of CRISPR/Cas technology in nucleic acid detection are discussed, and future research is proposed. In sum, this review aims to provide references for the detection of pathogenic microorganisms by using a nucleic acid detection method based on CRISPR/Cas technology.

Keywords: CRISPR/Cas, Cas protein, cleavage activity, nucleic acid detection, pathogenic microorganism

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key R&D Program of China (2018YFC1602500), by the Guangdong Major Project of Basic and Applied Basic Research (2020B0301030005), by the National Natural Science Foundation of China (31730070), by the Key Science and Technology Planning Project of Guangdong Academy of Sciences (2019GDASYL-0201001) and by the Guangdong Provincial Key Laboratory (2020B121201009)

*Corresponding author. Tel: +86-20-85222379; E-mail: dingyu@jnu.edu.cn

Received: 25 February 2021; Revised: 14 May 2021; Published online: 7 June 2021