



基于 CRISPR/Cas 系统的病原微生物检测体系构建研究进展

陈欢^{1,2}, 王宇^{1,2}, 黄钰^{1,2}, 焦新安^{1,2}, 张云增^{1,2*}

1 江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州大学, 江苏 扬州 225009

2 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏 扬州 225009

陈欢, 王宇, 黄钰, 焦新安, 张云增. 基于 CRISPR/Cas 系统的病原微生物检测体系构建研究进展. 微生物学报, 2022, 62(9): 3271–3288.

Chen Huan, Wang Yu, Huang Yu, Jiao Xin'an, Zhang Yunzeng. Research progress in construction of pathogenic microorganism detection system based on CRISPR/Cas system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3271–3288.

摘要: 规律成簇间隔短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas)自发现以来, 其应用范围在不断拓宽。除在基因编辑方面出色的应用能力外, 近年来 Cas12、Cas13 等蛋白反式切割活性的发现, 使其在病原微生物快速检测方面也显现出巨大的应用潜力。基于 CRISPR/Cas 系统建立的病原微生物检测技术具有灵敏度高、特异性强、操作简单等特点, 通过设计不同靶向的引导 RNA 能够对不同的目标进行快速检测, 是一种极具应用潜力的检测技术。本文对基于 CRISPR/Cas 开发的部分代表性病原微生物检测技术类型进行总结。由于引导 RNA 在 CRISPR/Cas 系统中具有重要作用, 但目前鲜见相关总结文章, 本文对部分 Cas 蛋白引导 RNA 特点以及特异性靶标的获取也进行了重点阐述, 以期能为开发基于 CRISPR/Cas 系统新型病原微生物检测技术提供参考和依据。

关键词: CRISPR/Cas; 病原微生物; 检测技术; 引导 RNA; 特异性靶标设计

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20180911)

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20180911)

*Corresponding author. E-mail: yzzzhang@yzu.edu.cn

Received: 11 January 2022; Revised: 4 June 2022; Published online: 10 June 2022

Research progress in construction of pathogenic microorganism detection system based on CRISPR/Cas system

CHEN Huan^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, HUANG Yu^{1,2}, JIAO Xin'an^{1,2}, ZHANG Yunzeng^{1,2*}

1 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: The clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas) has been applied in increasing fields since its discovery. Beyond gene editing, certain Cas proteins such as Cas12 and Cas13 have shown great application potential in rapid detection of pathogenic microorganisms since the discovery of their trans-cleavage activity. The CRISPR/Cas-based pathogenic microorganism detection technology is characterized by high sensitivity, high specificity, and simple operation. The presence/absence of targeted microorganisms can be quickly determined with help of the specific guide RNAs designed by bioinformatic analysis. This review introduces the representative CRISPR/Cas-based pathogenic microorganism detection technologies. Further, we expound the characteristics of guide RNAs required by different CRISPR/Cas complexes and provide guidance on how to design the guide RNAs used in the CRISPR/Cas-based pathogenic microorganism detection systems, given the importance of guide RNA in the CRISPR/Cas-based detection system and the lack of comprehensive summarization in this topic. This review aims to contribute to the development of CRISPR/Cas-based pathogenic microorganism detection system.

Keywords: CRISPR/Cas; pathogenic microorganism; detection technology; guide RNA; specific target design

规律成簇间隔短回文重复序列及其相关蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas) 系统是一种广泛存在于细菌和古生菌中的免疫防御系统, 近年来, 得益其对核酸靶标的精准识别与切割能力, CRISPR/Cas 系统在病原微生物快速检测方面显现出巨大潜力。基于 CRISPR/Cas 系统开发的病原微生物检测技术较之传统分子检测技术, 往往更具特异性和灵敏度或者与其相当。通过与重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)、环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等核酸扩增技术结合, 这类病原微生物检测技

术能够达到更高的灵敏度, 甚至实现单碱基差异的区分。依赖于可编程的引导 RNA, CRISPR/Cas 系统能够实现对不同的目标进行检测。因此基于 CRISPR/Cas 系统开发病原微生物快速检测技术是目前乃至未来检测技术开发的一个重要方向。本文对近年来基于 CRISPR/Cas 系统建立的代表性快速检测技术类型进行梳理总结。此外基于引导 RNA 的设计在创建新型 CRISPR/Cas 检测技术中的重要性, 本文对部分 Cas 蛋白引导 RNA 的特点、设计规则以及特异性靶标序列的获取进行了重点讨论, 以期能够为开发基于 CRISPR/Cas 系统新型病原微生物快速检测技术提供一定的参考和依据。

1 基于 CRISPR/Cas 的病原微生物检测系统

1.1 基于 CRISPR/Cas 的核酸检测技术的工作原理

CRISPR/Cas 系统是一种细菌与古细菌的免疫防御系统, 由 CRISPR 序列和 Cas 基因组成。CRISPR 序列包含上游的前导序列、间隔序列以及重复序列, 其中间隔序列为 CRISPR/Cas 系统靶向目标的特异性序列, 是 CRISPR/Cas 系统实现对靶标序列精准切割的关键^[1]。CRISPR 序列能够通过一系列加工与修饰成为靶向特定序列的引导 RNA。Cas 蛋白由 *cas* 基因编码, 成熟的 Cas 蛋白效应器为单个蛋白或者为多个蛋白形成的复合物, 具有靶向切割功能^[2]。Cas 蛋白能够在其引导 RNA 的带领下, 首先对目标进行前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM)/前间隔序列侧翼位点 (protospacer flanking site, PFS) 的识别, 识别完成后, Cas 蛋白会在与引导 RNA 中间隔序列互补的序列处进行切割, 这一行为被称为顺式切割。基于此原理, 将部分 Cas 蛋白例如 Cas9 与其他生物传感方式相连接, 就能够通过识别某一病原微生物的特异性核酸序列来实现对它的快速检测。目前已经鉴定的 CRISPR/Cas 系统按照其蛋白效应物的作用结构可分为 2 大类, 第一类 CRISPR/Cas 系统包含多种执行单一功能的 Cas 效应蛋白, 需要这

些 Cas 蛋白相互协作来完成靶标序列的识别和切割过程; 第二类 CRISPR/Cas 系统则是使用单个多功能的 Cas 蛋白来识别和切割靶标序列^[3], Cas9、Cas12、Cas13 等均属于第二类 Cas 蛋白。随着研究不断深入, 研究者发现除顺式切割活性以外, Cas12、Cas13 以及 Cas14 蛋白还具有反式切割活性, 即当 Cas 蛋白与引导 RNA、靶标序列形成三元复合物后, Cas 蛋白的反式切割活性会被激活, 从而能够对反应体系中游离的核酸序列进行无差别切割^[4]。不同 Cas 蛋白顺式切割与反式切割偏好的底物存在差异(表 1)。针对不同病原微生物, 设计相应的引导 RNA, 在引导 RNA 的引导下, 利用 Cas 蛋白顺式切割活性对靶标序列进行切割, 再将反式切割活性与各种信号读取方式结合来放大检测结果从而实现结果的快速读取, 这是目前基于 CRISPR/Cas 系统核酸检测技术的基本工作原理与流程(图 1)。

1.2 基于 CRISPR/Cas 的核酸检测技术的信号读取方法

利用 Cas 蛋白反式切割活性来切割反应体系中游离的荧光探针, 进而通过荧光的强弱来进行结果的判定是最为常见的一种 CRISPR/Cas 检测技术类型。Cas 蛋白反式切割活性还能与电化学信号、侧向流动试纸等信号读取方式结合, 来实现目标核酸的快速检测。此外, CRISPR/Cas 检测技术与 LAMP、RPA 等核酸扩增技术结合, 能够有效富集检测目标, 提高检测的灵敏度与

表 1 部分代表性 Cas 蛋白的特点

Table 1 Characteristics of several representative Cas proteins

Cas protein	Target	sgRNA	PAM/PFS	Collateral cleavage activity
Cas9	dsDNA	sgRNA (crRNA-tracrNA)	NGG	No
Cas12a	dsDNA/ssDNA	crRNA	(T)TTN	Yes
Cas12b	dsDNA	sgRNA (crRNA-tracrNA)	TTN	Yes
Cas13a	RNA	crRNA	PFS: non-G	Yes
Cas14	ssDNA/dsDNA	crRNA	-	Yes

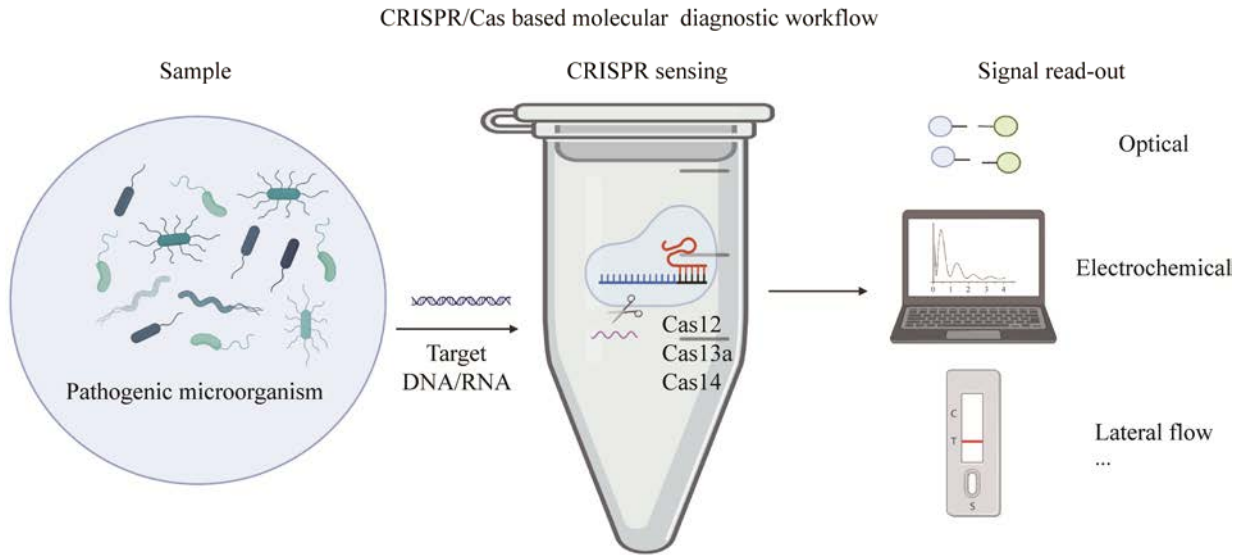


图 1 基于 CRISPR/Cas 系统的分子诊断流程

Figure 1 Workflow of CRISPR/Cas based molecular diagnostic technology.

特异性,进一步拓宽检测范围。在基于 CRISPR/Cas 的核酸检测技术中,构建简单直观的信号读取方式至关重要,因此本文对常见应用于 CRISPR/Cas 检测技术中的信号读取方式进行了总结。

1.2.1 光学信号读取

通过将反式切割信号转换为更易于观察的光学信号是构建基于 CRISPR/Cas 系统病原微生物检测技术最常见的方法之一。如上部分所述, Cas12、Cas13 以及 Cas14 蛋白具有反式切割活性,能够将反应体系中的游离 DNA/RNA 进行切割,因此可以将 DNA/RNA 设置成双端带有荧光基团和荧光猝灭基团的探针。在对靶标进行切割后, Cas 蛋白反式切割活性被激活并对荧光探针进行切割,导致荧光基团和荧光猝灭基团分离,从而发出荧光,通过特定光源的照射,可以肉眼观察到检测结果(图 2)。荧光探针法是目前最为常见的 CRISPR/Cas 检测系统的信号读取方式。例如 Gootenberg 等^[5]报道的 SHERLOCK 系统正是基于此原理,在反应

体系中设置荧光探针,通过前期的扩增步骤,成功实现对寨卡病毒和登革热病毒的检测。将靶标序列与荧光染料结合发出荧光来实现检测是另一种信号转换方式。例如 Guk 等^[6]报道了一种 CRISPR 介导的 DNA-FISH 方法,该方法使用 SYBR Green I 作为荧光染料去定向结合反应体系中的靶标,实现了 30 min 内对耐甲氧西林葡萄球菌的快速检测。比色传感是另一种常见的应用于 CRISPR/Cas 检测技术中的光学信号读取方式。AuNP 是该方法中常见的信号输出媒介。AuNPs 的聚集与分散会影响吸收峰的变化,与此同时溶液会显示出明显的颜色变化。基于这一特性, Zhang 等^[7]设计了 DNA-AuNPs 复合物,当 SARS-CoV-2 靶标被切割后, Cas12a 反式切割活性被激活,导致 AuNPs 上的 DNA 降解从而引起 AuNPs 的聚集。AuNPs 的聚集引起的吸收峰变化以及溶液颜色变化可以通过紫外可见吸收光谱或者肉眼快速直观地观察到。此外 TMB^[8]、ABTS^{2-[9]}等比色染料也已应用于 CRISPR/Cas 检测技术的开发。

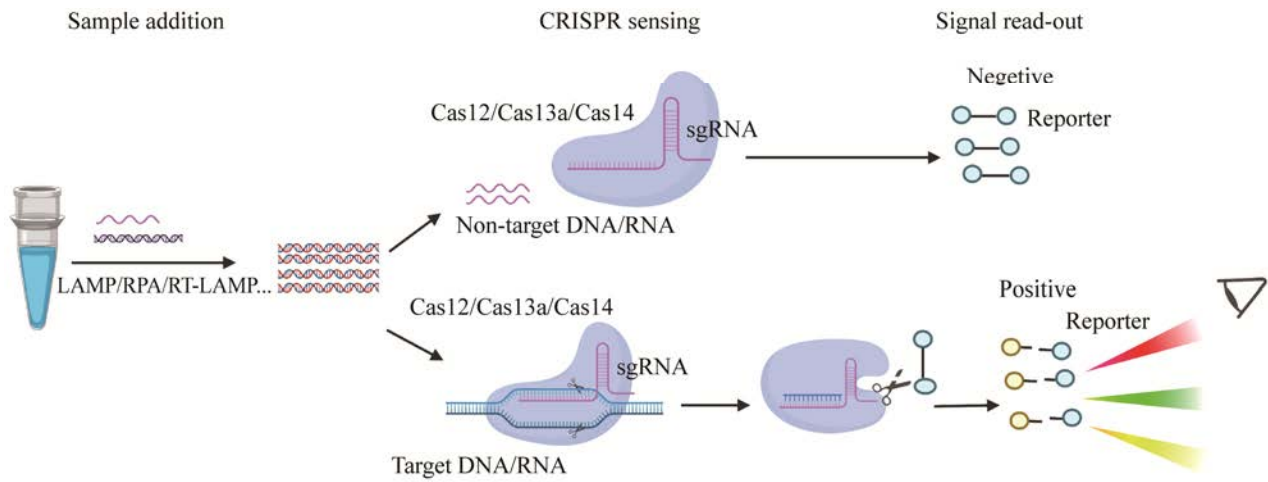


图 2 基于荧光探针法构建 CRISPR/Cas 检测技术

Figure 2 Fluorescence probe-based CRISPR/Cas detection technologies.

1.2.2 电化学信号读取

电化学信号相较于其他信号读取方式, 更为快速灵敏。目前已有 E-CRISPR 概念的提出, 即通过将 CRISPR/Cas 系统与电信号读取模式相结合, 形成一体式的集成系统, 来实现现场病原微生物的快速检测^[10-11]。电化学信号的输

出与读取通常是利用 Cas 蛋白反式切割活性对电化学标签进行切割, 从而引起一系列变化实现信号的波动(图 3)。例如 Zhang 等^[12]设计了一种由 MB 组成的发卡状 DNA 报告分子。由于其特殊的茎环结构, 该报告分子会靠近金电极的表面, 产生较高的氧化还原反应。而当 Cas12 反

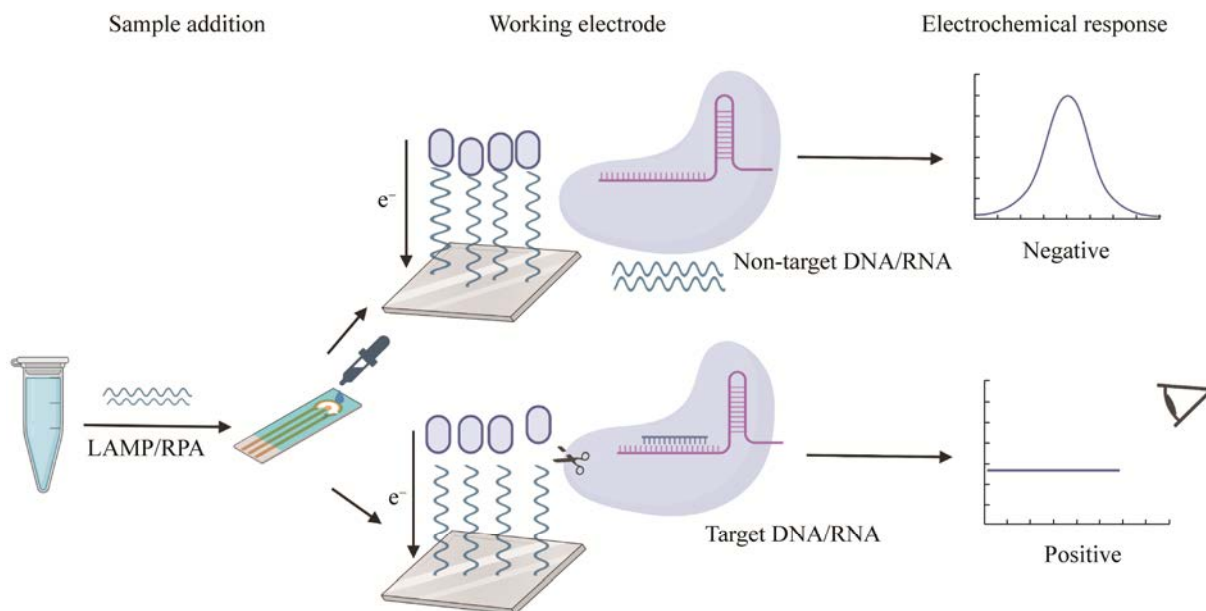


图 3 基于电化学法构建 CRISPR/Cas 检测技术

Figure 3 Electrochemistry-based CRISPR/Cas detection technologies.

式切割活性被激活后, 该报告分子茎环结构会因蛋白切割而被破坏, 从而离开金电极表面。金电极表面报告分子的释放会导致峰值电流的降低, 从而区别于原先的高峰值电流实现检测。E-CRISPR 未来的构建需要更多地与计算工具相结合以提高信号的灵敏度与准确度, 而非目前简单的数字信号转化^[13], 此外目前报道的 E-CRISPR 往往缺乏临床验证, 这依赖未来更多的临床验证以确保其在现场检测中的可行性。

1.2.3 侧向流动读数

侧向流动分析技术主要通过抗原-抗体相互作用或者 DNA 杂交来实现信号输出和读取(图 4)。CRISPR/Cas 系统与侧向流动技术进行结合能够有效增加 CRISPR/Cas 检测技术现场检测的实用性。目前有大量基于 CRISPR/Cas 系统的病原微生物检测技术通过侧向流动试纸来实现结果的快速读出^[14]。例如 Gootenberg 等^[15]报

道的 SHERLOCKv2 系统, 在该系统中研究者巧妙设计了一种不依赖任何设备的侧向读数系统。在该系统中, 报告序列两端标记了生物素和 FAM 荧光素。在侧向流动纸测试条上, 报告基序的荧光素与纸条上被金纳米颗粒标记的抗 FAM 抗体结合形成复合物, 但纸条的第一条线处(标记 C 的位置)含有链霉亲和素, 可与报告序列的生物素结合, 在靶标序列不存在的情况下, 检测序列积累在侧向流动测试条的第一行。而当靶标序列存在时, Cas 蛋白的反式切割活性被激活, 报告序列被切割, FAM 及其抗体复合物就会流向带有二抗的第二条测试线(标记 T 的位置), 从而产生清晰的检测信号。针对侧向流动试纸读数结果可能存在显色模糊、难以判定的情况, 相关的量化应用程序也已经被开发, 并被证明可以提供更为清晰无误的诊断读数^[16]。针对部分病原微生物的 CRISPR/Cas 检测技术总结如表 2 所示。

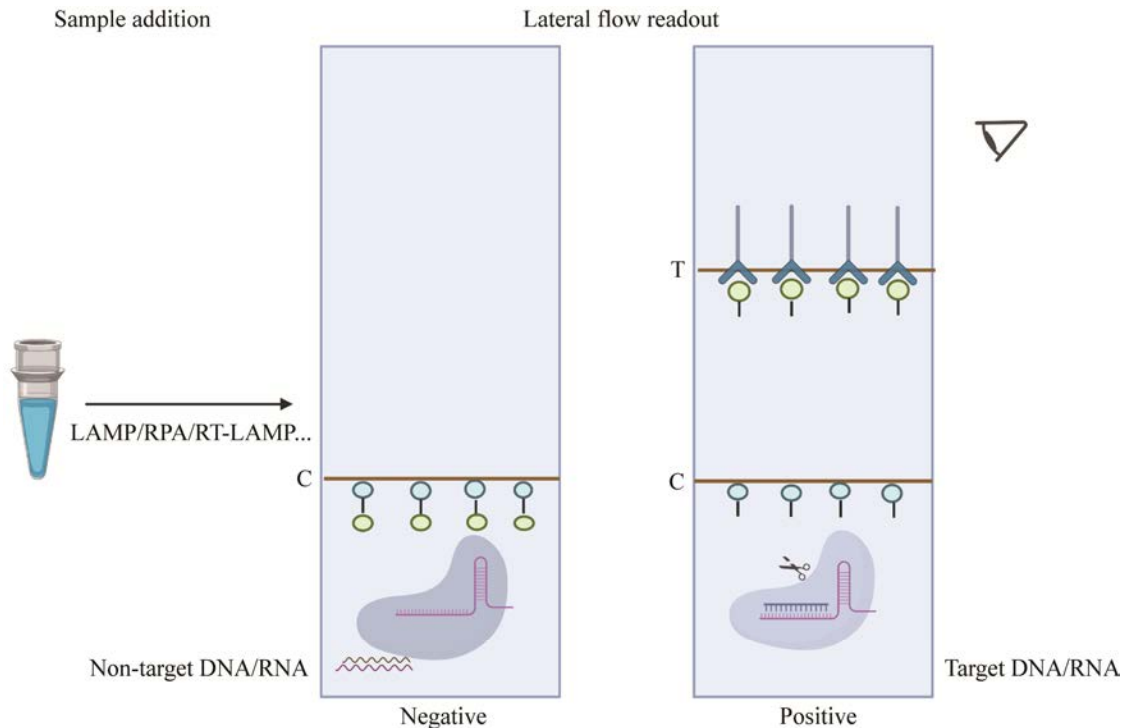


图 4 基于侧向流动试纸构建 CRISPR/Cas 检测技术

Figure 4 Lateral flow assay-based CRISPR/Cas detection technologies.

表 2 基于 CRISPR/Cas 系统建立的病原微生物检测技术

Table 2 CRISPR/Cas-based pathogenic microorganism detection technologies

Pathogenic microorganism	Cas protein	Technical name	Signal amplification method	Sensitivity	Time	Signal output	References
SARS-CoV-2	Cas13a	–		100 copies/ μ L	In 30 min	Fluorescent signal	[17]
	Cas13a	SHERLOCK	RT-RPA	42 copies/reaction	In 1 h	Fluorescent signal, lateral-flow strip	[18]
	Cas13a	–	HCR	6 copies/ μ L	In 1 h	Fluorescent signal	[19]
	Cas12a	opvCRISPR	RT-LAMP	5 copies/ μ L	In 45 min	Fluorescent signal	[20]
	Cas12a	–	LAMP	20 copies/reaction	In 40 min	Fluorescent signal	[21]
	Cas12b	STOPCovid	LAMP	33 copies/ μ L	In 1 h	Fluorescent signal	[22]
	Cas9		RT-RPA	100 copies/ μ L	In 1 h	Lateral-flow strip	[23]
<i>Salmonella</i>	Cas13a	APC-Cas	Allosteric probe	1 CFU/mL	About 2 h	Fluorescent signal	[24]
	Cas12a	G-CRISPR/Cas	LAMP, G-quadruplex probe	20 CFU/mL	About 30 min	Fluorescent signal	[25]
	Cas12a	–	AuNP	1 CFU/mL	About 90 min	Naked eye observation	[26]
	Cas12a	BCA-RPA-Cas12a	RPA/AuNP	1 CFU/mL	In 1 h	Fluorescent signal	[27]
	Cas12a	Cas12a-Ddp	RPA	1 CFU/mL	About 40 min	Fluorescent signal	[28]
	Cas9	–	Biotin tag	100 CFU/mL	In 3 h	Naked eye observation	[29]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cas13a	CCB-Detection	PCR	1 CFU/mL	In 4 h	Fluorescent signal	[30]
	Cas12a	–	Allosteric probe/Aptamer	10^2 CFU/mL	About 45 min	Fluorescent signal	[31]
	Cas12a	–	RCA/Aptamer	10^2 CFU/mL	About 20 min	Fluorescent signal	[32]
	Cas12a	–	LAMP	2 copies/ μ L	In 1 h	Fluorescent signal	[33]
	Cas12a	E-Si-CRISPR	Silver metallization	3.5 fmol/L	About 45 min	Electrochemical signal	[34]
	dCas9	–	SYBR Green I	10 CFU/mL	In 30 min	Fluorescent signal	[6]
<i>Escherichia coli</i>	Cas12a	–	Charge change	3 nmol/L	About 1.5 h	EIS	[35]
	Cas12a	OCTOPUS	RPA	1 CFU/mL	In 50 min	Fluorescent signal	[36]

(待续)

(续表 2)

	Cas9	–	Rolling circle amplification	4.0×10^1 CFU/mL	About 2 h	Fluorescent signal	[37]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cas12a	CRISPR-MTB	RPA	50 CFU/mL	About 1.5 h	Fluorescent signal	[38]
	Cas12a	–	RPA	4.48 fmol/L	About 4 h	Fluorescent signal	[39]
	Cas12a	–	PCR	500 CFU/mL	In 3 h	Fluorescent signal	[40]
	Cas12b	TB-QUICK	LAMP	1.3 copies/ μ L	In 2 h	Fluorescent signal	[41]
<i>Yersinia pestis</i>	Cas12a	Cas12a-UPTLFA	UPT	1 CFU/ μ L	In 1.3 h	Fluorescent signal	[42]
	Cas13a	–	RPA	4.2×10^2 copies/mL	About 3 h	Fluorescent signal	[43]
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cas12b	–		10 CFU/g	About 45 min	Fluorescent signal	[44]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Cas12a	E-CRISPR	RAA	26 CFU/mL	In 2 h	Electrochemical signal	[11]
	Cas12a	Cas12aFDet	RAA/PCR	1.35×10^2 CFU/mL	In 1 h	Fluorescent signal	[45]
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cas12a	–	PCR	1.02×10^2 copies/ μ L	About 2 h	Fluorescent signal	[46]
	Cas12a	–	LAMP	30 copies/reaction	In 50 min	Fluorescent signal	[47]

2 引导 RNA 的结构特点与设计规则

在常见用于病原微生物检测的几种 Cas 蛋白中, 每种 Cas 蛋白使用的引导 RNA 的结构特点均有所不同。Cas9 蛋白在天然状态下需要在 trans activating CRISPR RNA (tracrRNA)-CRISPR RNA (crRNA) 双 RNA 引导下进行切割^[48]。成熟的引导 RNA 通常包含 75 nt 的 tracrRNA 和 39–42 nt 的 crRNA; 其中 crRNA 包含了能够特异性靶向细菌的间隔序列以及重复序列(图 5)。tracrRNA 包含与重复序列配对的部分序列以及 3 个发卡结构, 这一结构特点至关重要, 研究表明, Cas9 蛋白需要识别引导 RNA 上的发卡结构以及重复-反重复双链结构才能与特定的引导 RNA 进行结合^[49]。将 crRNA 的 3'端与 tracrRNA 的 5'端通过一个短序列进行连接, 形

成环路, 同时保留 tracrRNA-crRNA 的二级结构可以形成单引导 RNA (sgRNA)^[50]。合成的 sgRNA 与天然双 RNA 能够同样引导 Cas9 蛋白进行特异性切割。sgRNA 由 2 个部分组成, 分别是能够与目标 DNA 特异性结合的靶标序列 (protospacer) 以及固定的 scaffold 序列^[51]。与天然结构的引导 RNA 一样, 间隔序列位于重复序列前面^[52], 所以引导 Cas9 的 sgRNA 的 protospacer 同样位于 scaffold 序列的前端, 通过更换不同的 protospacer, 能够靶向不同的目标 DNA。scaffold 序列具有与天然结构类似的二级结构且不同来源的 sgRNA 的 scaffold 序列组成有所不同, 这对于 Cas9 蛋白识别特定的引导 RNA 具有重要作用。sgRNA 的整体结构包括间隔区、下茎、凸起、上茎、连接和发夹 6 个模块。6 个模块行使着不同功能来帮助 Cas 蛋白完成

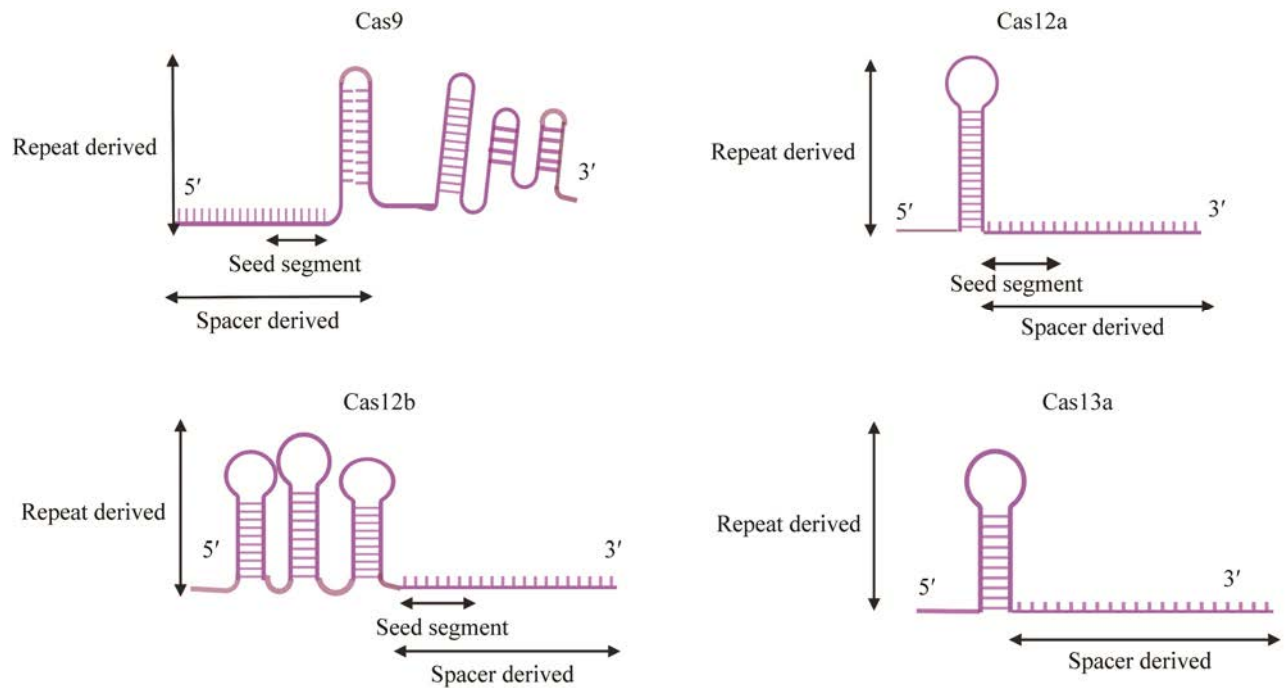


图 5 部分 Cas 蛋白 sgRNA 结构

Figure 5 SgRNA structure of some Cas proteins.

靶标的切割,例如凸起与连接是裂解 DNA 过程中不可缺少的,而连接与发夹则有助于系统之间的正交性等^[53]。引导 RNA 由可变的 protospacer 与恒定的 scaffold 序列组成,因此在进行设计时这 2 个部分就是考虑的主要因素。Protospacer 的长度对于整个切割活动影响巨大,包含过长或过短 protospacer 序列的引导 RNA 无法发挥正常功能。通常 20 nt 长度 protospacer 与 scaffold 序列相连接就可以引导 Cas9 对靶标进行切割检测^[54-56]。但这长度也并非固定,例如在 Zhang 等^[57]报道的基于 dCas9 病原微生物检测平台中,使用(21±2) nt 长度的 protospacer 都能达到很好的检测效果。而对于 Cas9 以及其他 Cas 蛋白恒定的 scaffold 序列而言,在序列正确的前提下通过体外转录等方式就可以得到具有正确空间结构的 scaffold 序列。此外对引导 RNA 进行修饰也能够进一步提高靶向效果,例如靠

近引导 RNA 的 5'位置添加额外 2 个鸟嘌呤核苷酸^[58],或者是在特定位置添加化学修饰的核苷酸^[59]。

Cas12a 不依赖 tracrRNA 和核糖核酸酶 RNase III 来产生成熟的 crRNA。其本身具有核糖核酸酶功能,能够完成对 pre-crRNA 的切割,从而形成中间体 crRNA 并最终形成成熟的 crRNA^[60]。由于缺少 tracrRNA, Cas12a 的 crRNA 长度明显短于 Cas9 的 sgRNA。首次在新弗朗西斯菌中发现的 CRISPR/Cas12a 系统显示,其成熟的 crRNA 长度为 42–44 nt,其中部分直接重复序列长 19–20 nt,间隔序列长度为 23–25 nt^[61]。在直接重复序列的 3'端处,通过碱基配对作用,形成了 1 个茎环结构(图 5)。这一结构与 Cas9 引导 RNA 的 3 个发卡结构有着显著的不同。茎环结构对于 Cas12a 蛋白与 crRNA 结合起着关键作用, Cas12a 蛋白需要通过识别茎环结构特

征和序列特征来识别 crRNA^[61]。crRNA 的茎环结构高度保守,来自不同细菌的 Cas12a 系统的 crRNA 都有着相同或类似的茎环结构。这也使得同源细菌的 crRNA 可以彼此更换直接重复序列使用而不会影响 crRNA 的活性。与 Cas9 类似的是,在 PAM 位点旁边同样存在对于蛋白与目标特异性结合起着关键作用的种子序列,长度较 Cas9 较短,通常为 5–6 nt^[60,62]。对于 Cas12a 而言,包含 20 nt 长度的 protospacer 序列的引导 RNA 能够高效地引导 Cas 蛋白来实现检测^[11,63–64],但是该长度并不是唯一的黄金准则,21 nt^[65]、24 nt^[20]等长度的 protospacer 序列也在不同的检测系统中展现出较高的效率。同样地对引导 RNA 的结构进行修饰能够有效提高检测的效率,例如对于 LbCas12a 而言,在其引导 RNA 的 5'或 3'进行 7 nt DNA 长度的延伸修饰,能够将 LbCas12a 反式切割活性提高 3.5 倍,并且这种提高是通用的,不依赖特定的 protospacer 序列^[2]。

Cas12b 与 Cas12a 不同,为双 RNA 引导的 DNA 内切酶。来自不同菌种的 Cas12b 引导 RNA 长度有着一定的差异,例如在酸热脂环芽孢杆菌中,Cas12b 引导 RNA 包含 crRNA 与 tracrRNA,其中 crRNA 长 34 nt,包含 5'端 14 nt 直接重复序列和 20 nt 的间隔序列,79 nt 的 tracrRNA 与经过处理的 14 nt 重复序列能够形成一个稳定的二级结构^[66]。而在短芽孢杆菌观察到 Cas12b 的 crRNA 中直接重复序列长 27 nt,间隔序列为 38 nt, tracrRNA 为 99 nt。与其他 CRISPR 系统类似,在 Cas12b 所偏好的 PAM 位点附近观察到种子序列的存在,位于 PAM 位点下游 3–6 nt 处^[67]。与 Cas9 类似,通过将 crRNA 与 tracrRNA 融合得到 sgRNA,能够实现在体外引导 Cas12b 进行切割。在 Cas12b 的引导 RNA 中, protospacer 的长度通常为 20 nt^[44,68–69]。然

而当检测的病原微生物靶标序列极其接近,需要进行单碱基差异的区分时,20 nt 便不再是最佳的 protospacer 长度。当检测目标为 ssDNA 时,16 nt 或 17 nt 的 protospacer 序列最佳;当目标为 dsDNA 时,18–20 nt 的 protospacer 序列最佳^[70]。

对于 Cas13 而言,单一的 crRNA 就可以引导切割。在李斯特菌中首次发现 Cas13 相关基因座,将其在大肠杆菌中表达显示 crRNA 包含 5'端 29 nt 的直接重复序列以及 15–18 nt 的间隔序列,未发现 tracrRNA 的表达。这种直接重复序列在前,间隔序列在后的排列方式在 Cas13 家族的 crRNA 中并不唯一,例如对于 Cas13b 而言,其直接重复序列位于间隔序列的 3'端,与 Cas13a 的 crRNA 排列顺序相反^[71]。Cas13 的 crRNA 采用较为简单的结构,直接重复序列形成了单一的环状手柄结构,在其两端则是长度可变的间隔序列^[72–73](图 5)。对于大部分 Cas13a 诸如 LwCas13a 来说,引导 RNA 中 protospacer 合适长度通常为 28 nt^[74–76],而 LbuCas13a 的 protospacer 长度为 20 nt 较为合适^[15]。引导 RNA 的设计复杂,目前并没有统一的标准,目前的部分规则也只是基于已报道的 CRISPR/Cas 检测技术上总结而来,实际构建过程中,设计多个引导 RNA 并通过实验进行筛选仍然是最佳的方法。表 3 总结了常见 Cas 蛋白引导 RNA 的部分设计规则。

3 病原微生物特异性靶标的获取

CRISPR/Cas 介导的病原微生物快速检测技术对检测目标的高特异性一方面得益于不同 Cas 蛋白偏好不同的 PAM/PFS 序列,另一方面引导 RNA 所携带的 protospacer 也是识别的关键。此外通过更换引导 RNA 来实现对不同目标的检测主要是通过更换引导 RNA 中 protospacer 来实现,因此在构建基于 CRISPR/Cas 的病原微生物

表 3 CRISPR/Cas 诊断技术中引导 RNA 设计规则

Table 3 Design principles for sgRNAs used in CRISPR/Cas-based diagnostics

Cas protein	Protospacer length/nt	Scaffold+Protospacer (5'→3')
SpCas9 ^[77]	20	Protospacer+GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAAGGCUAGUCCG
LbCas12a ^[78]	20	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU+Protospacer
AsCas12a ^[15]	20	UAAUUUCUACUCUUGUAGAU+Protospacer
AacCas12b ^[41]	20	GUCUAGAGGACAGAAUUUUUCAACGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGU GGCAAAGCCCUGUAGCUUCUCAAAUCUGAGAAGUGGCAC+Protospacer
AapCas12b ^[22]	20	GUCUAGAGGACAGAAUUUUUCAACGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGU GGCAAAGCCCUGUAGCUUCUCAAAUCUGAGAAGUGGCAC+Protospacer
LwaCas13a ^[15]	28	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAAC+Protospacer

物检测系统时, 获取特异性良好的 protospacer 至关重要。特异性良好的 protospacer 首先需要在检测目标中高度保守, 以保证能够对病原微生物检出。此外这段序列要在除检测目标以外的所有物种中都不存在, 以排除检测过程中假阳性结果。对于大部分病原微生物来说, 都会存在保守性好、特异性强的特异性检测基因, 诸如沙门菌 *invA* 基因^[26]、副溶血弧菌 *tlh* 基因^[46]、单核增生李斯特菌 *prfA* 基因^[79]等。这些基因通常已经被鉴定和报道, 并且在 PCR、荧光定量 PCR 等其他分子检测方法中已被用来鉴定目标病原菌。因此这些基因都可以用来寻找合适的 protospacer。由于不同 Cas 蛋白需要识别 PAM 位点才能后续进行引导 RNA 与靶标的结合, 因此可以通过扫描不同的 PAM 位点附近合适长度的序列来作为候选的 protospacer, 将候选的 protospacer 进行在线以及本地 BLAST 来确定特异性较好的 protospacer。在扫描 PAM 位点时候, 需注意不同 Cas 蛋白识别的 PAM 位点与引导 RNA 中 protospacer 特异性结合的序列位置不一致, 例如 Cas9 所识别的 PAM 位点位于与 protospacer 互补序列的后端, 而 Cas12a 所识别的 PAM 位点则位于与 protospacer 互补序列的前端。部分检测技术使用此逻辑设计了高特异性的引导 RNA, 用于病原微生物的检测。例

如 You 等^[80]报道的基于 Cas12a 所建立鼠疫耶尔森菌的快速检测技术, 在进行 crRNA 设计时, 选用鼠疫耶尔森菌的 4 个检测靶点基因, 对检测基因进行了 Cas12a 所偏好的“TTTN”的 PAM 位点的筛选。设计 3–5 个 crRNA 进行测试, 选择效率最高的进行后续实验。在确定好的靶向基因后, 还可以进一步使用序列比对工具例如 DNAMAN、DNASTAR 等进行比对, 找出高度保守区域, 这样更有利于快速寻找 protospacer。例如 Yu 等^[81]在设计鉴定隐孢子虫 IId 子类型 (SF) 引导 RNA 时, 在获取不同的 SF 的序列后, 使用 ClustalX 2.1 进行比对, 确定了 SF 高保守区域。选择 PAM 位点后面的一段高特异性序列作为 protospacer。

在缺乏已经报道的靶标或者是在报道的靶标位点上找不到合适的 protospacer 时, 一些报道详细的生物信息学分析流程能够为找寻合适的靶标提供思路。研究者通常将目标基因组与亲缘关系接近的物种进行比对, 以期获得新的特异性靶点。例如在 Williams 等^[82]报道的鉴定大西洋鲑鱼的 CRISPR/Cas 快检技术中, 研究者将大西洋鲑鱼与其亲缘关系最为接近的 2 种鲑鱼科成员的线粒体基因组进行比对来设计 crRNA, 并通过 BLAST 比对确保 crRNA 的高特异性。在部分亲缘关系非常相近, 难以进行

很好区分的病原微生物靶标筛选过程中,则需要根据情况进行更加灵活的筛选。例如 Chen 等^[83]报道了一种鼠疫耶尔森菌特异靶点的筛选流程(图 6A),研究者在获取了鼠疫耶尔森和其他耶尔森氏菌的基因组数据之后,以鼠疫耶尔森 CO92 为标准菌株,通过自己编写的 python 脚本将基因组划分成若干 100 nt 的 DNA 片段。将这些 DNA 片段通过局部 BLAST 比对,来筛选出在所有鼠疫耶尔森菌中均有分布的片段。在获得 DNA 片段之后,将 DNA 片段组合成非重叠的长 DNA 片段。随后使用 MEGA-X 软件将其他耶尔森菌中与这些长 DNA 片段的同源序列进行比对,从而得到能将鼠疫耶尔森与其他耶尔森菌区分开 SNP 位点。将包含多个 SNP 位点的 DNA 片段进行 BLAST 在线比对,证实能够对鼠疫耶尔森菌进行很好的鉴定,这些包

含 SNP 位点的 DNA 片段即为新的检测靶点。本实验室同样开发了一套找寻特异性靶标的生物信息学分析流程,并成功应用于对空肠弯曲菌的特异性靶标的找寻(图 6B)。在美国国家生物技术信息中(National Center of Biotechnology Information, NCBI)获取弯曲菌的基因组数据后,以空肠弯曲菌标准株或者以结肠弯曲菌标准株为参考,使用 FastANI 计算平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)来进行物种鉴定和亲缘关系判定,并通过使用了 Seqkit amplicon 算法进行原位 PCR 分析来获得高质量的空肠弯曲菌以及结肠弯曲菌的基因组。将空肠弯曲菌与结肠弯曲菌的序列进行比对可以获得特异性靶标。在比对中首先使用了 mlst 软件进行多位点分型,挑取 ST 型中具有代表性的菌株序列使用 Neptune 软件进行比对,得到的特异性靶标序列

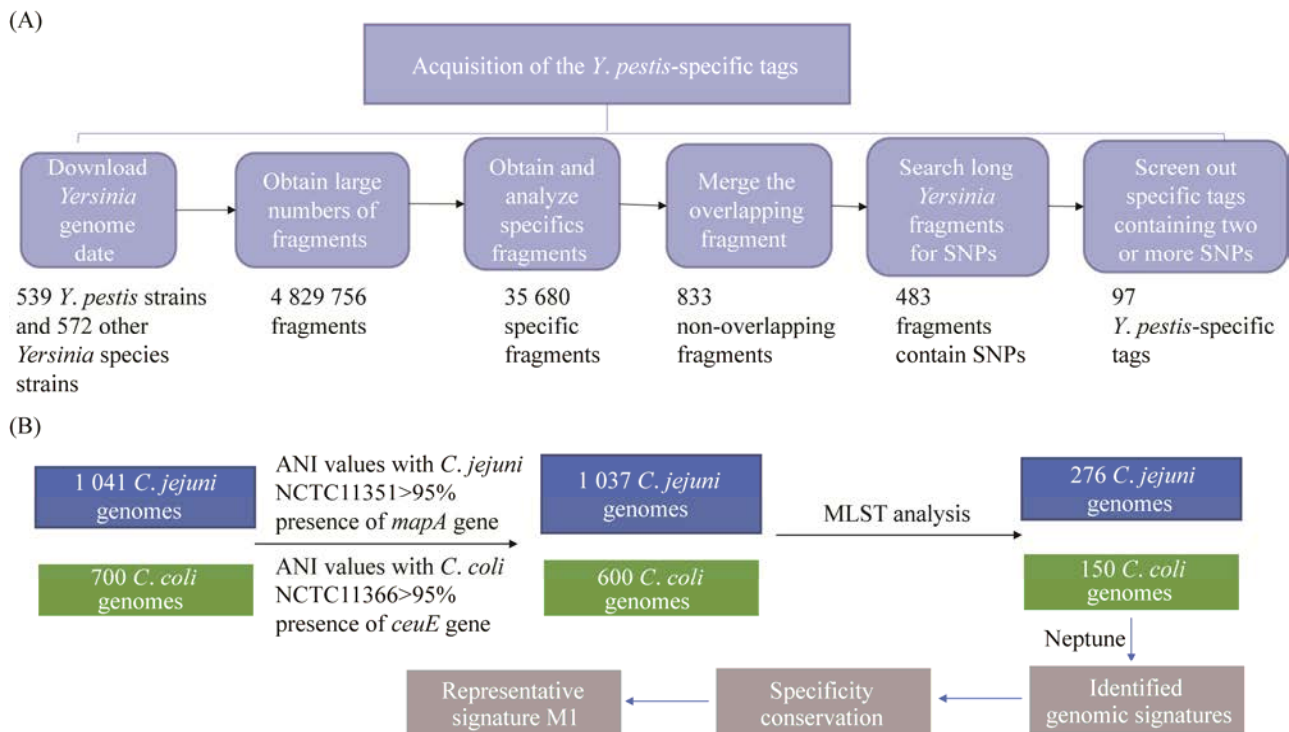


图 6 病原微生物特异性靶标获取流程^[44,81]

Figure 6 Methods on pathogenic microorganism-specific targets identification^[44,81]. A: identification of *Y. pestis*-specific tags; B: identification of *Campylobacter jejuni*-specific tags.

通过在线 BLAST 以及本地 BLAST 进行特异性的验证^[44]。综合不同分析流程来看, 高质量的基因组是分析的必要条件, 因为可能存在错误注释分类的基因组数据或者无明确物种注释信息等情况影响后续的分析。基因组的比对要在检测目标与其亲缘关系最为接近的物种之间进行, 因为这是后续最影响检测结果的物种。针对不同比对软件或者算法, 基因组可能要适当的拆分。得出的特异性靶标序列需要再次在检测目标与其他物种基因组中进行验证以保证其保守性和特异性。此外无论是新型挖掘的病原微生物特异序列还是已经频繁报道的特异序列, 其长度都可能较长。而引导 RNA 的 protospacer 则较短, 因此从特异基因中选取的 protospacer 可能因为长度的减少, 而导致其物种特异性的降低。而将 CRISPR/Cas 检测技术通过与前期的扩增步骤进行结合, 则能够有效缓解这一问题, 特异序列的核酸扩增能够对后续 CRISPR/Cas 检测的目标范围进行有效划分, 通过富集目标病原微生物的特异性序列, 从而进一步保证 CRISPR/Cas 检测的特异性。

4 展望与总结

CRISPR/Cas 系统通过与不同的信号读取方式相结合, 使其在病原微生物即时诊断方面展现出巨大优势。但是与世界卫生组织提出的理想即时诊断标准^[84]相比, 基于 CRISPR/Cas 系统建立的检测技术仍然存在很大发展空间。例如目前已开发的 CRISPR/Cas 检测技术主要通过荧光强弱来读取结果, 荧光探针自身的背景值可能会影响低浓度样品结果的判定, 如何进一步排除荧光背景值影响, 实现对低浓度阳性样品更准确地判定是至关重要的问题。此外荧光的读取依赖荧光激发及检测设备, 这增加了现场检测的设备携带负担, 如何最大程度减

少设备依赖, 设置更为简易直观的信号读取方式也是未来 CRISPR/Cas 检测技术开发的一个重要方向。本文所论述的引导 RNA 的设计同样是开发基于 CRISPR/Cas 系统病原微生物快速检测技术的重要问题之一。性能优良的引导 RNA 能够使得检测变得高效而灵敏, 但是检测目标特异性靶标的选择, protospacer 序列长度、scaffold 序列二级结构对于切割活动的影响等问题都使得引导 RNA 的设计成为一个值得思考的问题。目前有研究给出 Cas13d 蛋白的引导 RNA 的设计规则^[85], 然而进行此类研究需要大量的数据支撑, 对于其他蛋白的引导 RNA 的设计虽然也有部分报道, 但更多还在不断的探索之中。因此, 研发制定完善的引导 RNA 的设计规则也是未来开发新型 CRISPR/Cas 检测技术的一个重要方向。

参考文献

- [1] Jansen R, Van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *Omic: a Journal of Integrative Biology*, 2002, 6(1): 23–33.
- [2] Mao ZF, Chen RP, Wang XJ, Zhou ZX, Peng Y, Li S, Han DP, Li S, Wang Y, Han T, Liang J, Ren SY, Gao ZX. CRISPR/Cas12a-based technology: a powerful tool for biosensing in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 122: 211–222.
- [3] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Scott D, Shah SA, Siksnyš V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, Van Der Oost J, Barrangou R, Koonin EV. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67–83.
- [4] Li SY, Cheng QX, Liu JK, Nie XQ, Zhao GP, Wang J. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Research*, 2018, 28(4): 491–493.

- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Zhang WS, Pan JB, Li F, Zhu M, Xu MT, Zhu HY, Yu YY, Su GX. Reverse transcription recombinase polymerase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for facile and highly sensitive colorimetric SARS-CoV-2 detection. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(8): 4126–4133.
- [8] Moon J, Kwon HJ, Yong D, Lee IC, Kim H, Kang H, Lim EK, Lee KS, Jung J, Park HG, Kang T. Colorimetric detection of SARS-CoV-2 and drug-resistant pH1N1 using CRISPR/dCas9. *ACS Sensors*, 2020, 5(12): 4017–4026.
- [9] Zhou T, Huang MQ, Lin JQ, Huang R, Xing D. High-fidelity CRISPR/Cas13a trans-cleavage-triggered rolling circle amplified DNAzyme for visual profiling of microRNA. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(4): 2038–2044.
- [10] Dai YF, Somoza RA, Wang L, Welter JF, Li Y, Caplan AI, Liu CC. Exploring the *trans*-cleavage activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the development of a universal electrochemical biosensor. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2019, 58(48): 17399–17405.
- [11] 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.
- [12] Zhang DC, Yan YR, Que HY, Yang TT, Cheng XX, Ding SJ, Zhang XM, Cheng W. CRISPR/Cas12a-mediated interfacial cleaving of hairpin DNA reporter for electrochemical nucleic acid sensing. *ACS Sensors*, 2020, 5(2): 557–562.
- [13] Ibrahim AU, Al-Turjman F, Sa'id Z, Ozsoz M. Futuristic CRISPR-based biosensing in the cloud and internet of things era: an overview. *Multimedia Tools and Applications*, 2020: 2020 Jun 8; 1-2020 Jun 829.
- [14] Van Dongen JE, Berendsen JTW, Steenbergen RDM, Wolthuis RMF, Eijkel JCT, Segerink LI. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: recent advances, challenges and opportunities. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 166: 112445.
- [15] 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.
- [16] Barnes KG, Lachenauer AE, Nitido A, Siddiqui S, Gross R, Beitzel B, Siddle KJ, Freije CA, Dighero-Kemp B, Mehta SB, Carter A, Uwanibe J, Ajogbasile F, Olumade T, Odia I, Sandi JD, Momoh M, Metsky HC, Boehm CK, Lin AE, Kembal M, Park DJ, Branco L, Boisen M, Sullivan B, Amare MF, Tiamiyu AB, Parker ZF, Iroezindu M, Grant DS, Modjarrad K, Myhrvold C, Garry RF, Palacios G, Hensley LE, Schaffner SF, Happi CT, Colubri A, Sabeti PC. Deployable CRISPR-Cas13a diagnostic tools to detect and report Ebola and Lassa virus cases in real-time. *Nature Communications*, 2020, 11: 4131.
- [17] Fozouni P, Son S, De León Derby MD, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio MV, Zhao CY, Switz NA, Kumar GR, Stephens SI, Boehm D, Tsou CL, Shu J, Bhuiya A, Armstrong M, Harris AR, Chen PY, Osterloh JM, Meyer-Franke A, Joehnk B, Walcott K, Sil A, Langelier C, Pollard KS, Crawford ED, Puschnik AS, Phelps M, Kistler A, DeRisi JL, Doudna JA, Fletcher DA, Ott M. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*, 2021, 184(2): 323–333.e9.
- [18] Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, Aphicho K, Suraritdechachai S, Meesawat P, Sappakhaw K, Leelahakorn N, Ruenkam T, Wongsatit T, Athipanyasilp N, Eiamthong B, Lakkansirorat B, Phoodokmai T, Niljianskul N, Pakotiprapha D, Chanarat S, Homchan A, Tinikul R, Kamutira P, Phiwkaow K, Soithongcharoen S, Kantiwiriyanitch C, Pongsupasa V, Trisrivirat D, Jaroensuk J, Wongnate T, Maenpuen S, Chaiyen P, Kamnerdnakta S, Swangsri J, Chuthapisith S, Sirivatanauskorn Y, Chaimayo C, Suttthent R, Kantakamalakul W, Joung J, Ladha A, Jin X, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F, Horthongkham N, Uttamapinant C. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nature Biomedical Engineering*, 2020, 4(12): 1140–1149.

- [19] Yang YH, Liu JC, Zhou XH. A CRISPR-based and post-amplification coupled SARS-CoV-2 detection with a portable evanescent wave biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 190: 113418.
- [20] Wang R, Qian CY, Pang YN, Li MM, Yang Y, Ma HJ, Zhao MY, Qian F, Yu H, Liu ZP, Ni T, Zheng Y, Wang YM. opvCRISPR: one-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 172: 112766.
- [21] Chen YJ, Shi Y, Chen Y, Yang ZN, Wu H, Zhou ZH, Li J, Ping JF, He LP, Shen H, Chen ZX, Wu J, Yu YS, Zhang YJ, Chen H. Contamination-free visual detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: a promising method in the point-of-care detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 169: 112642.
- [22] Segel M, Ioannidi EI, Bruneau R, Jerome KR, Kim N, Woolley AE, Gootenberg JS, Barretto RPJ, Li JZ, Yu XG, Greninger AL, Macrae RK, Zhang F, Saito M, Joung J, Hung DT, Ranu A, Walker BD, Huang MW, Krajeski RN, Ladha A, Faure G, Abudayyeh OO. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(15): 1492–1494.
- [23] Xiong EH, Jiang L, Tian T, Hu ML, Yue HH, Huang MQ, Lin W, Jiang YZ, Zhu DB, Zhou XM. Simultaneous dual-gene diagnosis of SARS-CoV-2 based on CRISPR/Cas9-mediated lateral flow assay. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2021, 60(10): 5307–5315.
- [24] Shen JJ, Zhou XM, Shan YY, Yue HH, Huang R, Hu JM, Da Xing. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction. *Nature Communications*, 2020, 11: 267.
- [25] Xia XH, Ma BH, Zhang T, Lu YH, Khan MR, Hu Y, Lei CW, Deng S, He Q, He GP, Zhang KX, Deng RJ. G-quadruplex-probing CRISPR-Cas12 assay for label-free analysis of foodborne pathogens and their colonization *in vivo*. *ACS Sensors*, 2021, 6(9): 3295–3302.
- [26] Ma L, Peng L, Yin LJ, Liu GZ, Man SL. CRISPR-Cas12a-powered dual-mode biosensor for ultrasensitive and cross-validating detection of pathogenic bacteria. *ACS Sensors*, 2021, 6(8): 2920–2927.
- [27] Cai QQ, Wang R, Qiao ZH, Yang WG. Single-digit *Salmonella* detection with the naked eye using bio-barcode immunoassay coupled with recombinase polymerase amplification and a CRISPR-Cas12a system. *The Analyst*, 2021, 146(17): 5271–5279.
- [28] Fu XR, Sun JD, Ye YL, Zhang YZ, Sun XL. A rapid and ultrasensitive dual detection platform based on Cas12a for simultaneous detection of virulence and resistance genes of drug-resistant *Salmonella*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 195: 113682.
- [29] Wang LY, Shen XY, Wang T, Chen PR, Qi N, Yin BC, Ye BC. A lateral flow strip combined with Cas9 nickase-triggered amplification reaction for dual food-borne pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 165: 112364.
- [30] Zhou J, Yin LJ, Dong YN, Peng L, Liu GZ, Man SL, Ma L. CRISPR-Cas13a based bacterial detection platform: sensing pathogen *Staphylococcus aureus* in food samples. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1127: 225–233.
- [31] Wei JJ. Accurate and sensitive analysis of *Staphylococcus aureus* through CRISPR-Cas12a based recycling signal amplification cascades for early diagnosis of skin and soft tissue infections. *Journal of Microbiological Methods*, 2021, 183: 106167.
- [32] Xu LQ, Dai QQ, Shi ZY, Liu XT, Gao L, Wang ZZ, Zhu XY, Li Z. Accurate MRSA identification through dual-functional aptamer and CRISPR-Cas12a assisted rolling circle amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 2020, 173: 105917.
- [33] Chen YX, Shi Y, Zhu WF, You JX, Yang J, Xie YP, Zhao HX, Li HY, Fan SW, Li L, Liu C. Combining CRISPR-Cas12a-based technology and metagenomics next generation sequencing: a new paradigm for rapid and full-scale detection of microbes in infectious diabetic foot samples. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 742040.
- [34] Suea-Ngam A, Howes PD, DeMello AJ. An amplification-free ultra-sensitive electrochemical CRISPR/Cas biosensor for drug-resistant bacteria detection. *Chemical Science*, 2021, 12(38): 12733–12743.
- [35] Bonini A, Poma N, Vivaldi F, Biagini D, Bottai D, Tavanti A, di Francesco F. A label-free impedance biosensing assay based on CRISPR/Cas12a collateral activity for bacterial DNA detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 204: 114268.
- [36] Wang YQ, Ke YQ, Liu WJ, Sun YQ, Ding XT. A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level. *ACS Sensors*, 2020, 5(5): 1427–1435.

- [37] Sun X, Wang Y, Zhang L, Liu S, Zhang M, Wang J, Ning BA, Peng Y, He J, Hu YG, Gao ZX. CRISPR-Cas9 triggered two-step isothermal amplification method for *E. coli* O157:H7 detection based on a metal-organic framework platform. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(4): 3032–3041.
- [38] Ai JW, Zhou X, Xu T, Yang ML, Chen YY, He GQ, Pan N, Cai YW, Li YJ, Wang XR, Su H, Wang T, Zeng WQ, Zhang WH. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 1361–1369.
- [39] Xu HP, Zhang XL, Cai ZX, Dong XQ, Chen G, Li ZL, Qiu LM, He L, Liang B, Liu XL, Liu JF. An isothermal method for sensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex using clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas12a *Cis* and *trans* cleavage. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2020, 22(8): 1020–1029.
- [40] Xiao GH, He X, Zhang S, Liu YY, Liang ZH, Liu HM, Zhang JJ, Ou M, Cai SH, Lai WJ, Zhang TY, Ren LL, Zhang GL. Cas12a/guide RNA-based platform for rapid and accurate identification of major *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(2): e01368–e01319.
- [41] Sam IK, Chen YY, Ma J, Li SY, Ying RY, Li LX, Ji P, Wang SJ, Xu J, Bao YJ, Zhao GP, Zheng HJ, Wang J, Sha W, Wang Y. TB-QUICK: CRISPR-Cas12b-assisted rapid and sensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection*, 2021, 83(1): 54–60.
- [42] You Y, Zhang PP, Wu GS, Tan YF, Zhao Y, Cao SY, Song YJ, Yang RF, Du ZM. Highly specific and sensitive detection of *Yersinia pestis* by portable Cas12a-UPTLFA platform. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 700016.
- [43] Schultzhause Z, Wang Z, Stenger D. Systematic analysis, identification, and use of CRISPR/Cas13a-associated crRNAs for sensitive and specific detection of the *lcrV* gene of *Yersinia pestis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2021, 99(3): 115275.
- [44] Huang Y, Gu D, Xue H, Yu JY, Tang YY, Huang JL, Zhang YZ, Jiao XN. Rapid and accurate *Campylobacter jejuni* detection with CRISPR-Cas12b based on newly identified *Campylobacter jejuni*-specific and-conserved genomic signatures. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 649010.
- [45] 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.
- [46] Zhang MY, Liu CZ, Shi Y, Wu J, Wu J, Chen H. Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application. *Talanta*, 2020, 214: 120818.
- [47] Wu H, Chen YJ, Yang QQ, Peng C, Wang XF, Zhang MY, Qian S, Xu JF, Wu J. A reversible valve-assisted chip coupling with integrated sample treatment and CRISPR/Cas12a for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 188: 113352.
- [48] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao YJ, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [49] Jiang FG, Taylor DW, Chen JS, Kornfeld JE, Zhou KH, Thompson AJ, Nogales E, Doudna JA. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*, 2016, 351(6275): 867–871.
- [50] 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.
- [51] Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Krzowski L, Saluk-Bijak J, Bijak M. Various aspects of a gene editing system-CRISPR-Cas9. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9604.
- [52] Chylinski K, le Rhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biology*, 2013, 10(5): 726–737.
- [53] Briner AE, Donohoue PD, Goma AA, Selle K, Slorach EM, Nye CH, Haurwitz RE, Beisel CL, May AP, Barrangou R. Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. *Molecular Cell*, 2014, 56(2): 333–339.
- [54] 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.
- [55] Zhang BB, Xia Q, Wang Q, Xia XY, Wang JK. Detecting and typing target DNA with a novel

- CRISPR-typing PCR (ctPCR) technique. *Analytical Biochemistry*, 2018, 561/562: 37–46.
- [56] Wang XS, Xiong EH, Tian T, Cheng M, Lin W, Wang H, Zhang GH, Sun J, Zhou XM. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2497–2508.
- [57] 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 HM, 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.
- [58] Kim D, Kim S, Kim S, Park J, Kim JS. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex digenome-seq. *Genome Research*, 2016, 26(3): 406–415.
- [59] Cromwell CR, Sung K, Park J, Krysler AR, Jovel J, Kim SK, Hubbard BP. Incorporation of bridged nucleic acids into CRISPR RNAs improves Cas9 endonuclease specificity. *Nature Communications*, 2018, 9: 1448.
- [60] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, 532(7600): 517–521.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] Zhuang JW, Zhao ZY, Lian K, Yin LJ, Wang JJ, Man SL, Liu GZ, Ma L. SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 207: 114167.
- [64] Peng L, Zhou J, Yin LJ, Man SL, Ma L. Integration of logic gates to CRISPR/Cas12a system for rapid and sensitive detection of pathogenic bacterial genes. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1125: 162–168.
- [65] Li YN, Shi ZL, Hu AZ, Cui JS, Yang K, Liu Y, Deng GQ, Zhu CC, Zhu L. Rapid one-tube RPA-CRISPR/Cas12 detection platform for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostics: Basel, Switzerland*, 2022, 12(4): 829.
- [66] 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.
- [67] Tian Y, Liu RR, Xian WD, Xiong MJ, Xiao M, Li WJ. A novel thermal Cas12b from a hot spring bacterium with high target mismatch tolerance and robust DNA cleavage efficiency. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 376–384.
- [68] Li SJ, Huang JF, Ren LJ, Jiang WJ, Wang M, Zhuang L, Zheng QN, Yang R, Zeng Y, Lu LDW, Wang Y, Tai J. A one-step, one-pot CRISPR nucleic acid detection platform (CRISPR-top): application for the diagnosis of COVID-19. *Talanta*, 2021, 233: 122591.
- [69] Chen X, Tan Y, Wang SS, Wu XL, Liu R, Yang XG, Wang Y, Tai J, Li SJ. A CRISPR-Cas12b-based platform for ultrasensitive, rapid, and highly specific detection of hepatitis B virus genotypes B and C in clinical application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 743322.
- [70] 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.
- [71] Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng KJ, Slaymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, Shmakov S, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Molecular Cell*, 2017, 65(4): 618–630.e7.
- [72] East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JHD, Tjian R, Doudna JA. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 2016, 538(7624): 270–273.
- [73] 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.
- [74] 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.
- [75] Wu YT, Liu SX, Wang F, Zeng MS. Room temperature detection of plasma Epstein-Barr virus DNA with CRISPR-Cas13. *Clinical Chemistry*, 2019, 65(4): 591–592.
- [76] Zhang XY, Tian Y, Xu L, Fan ZH, Cao YL, Ma YM, Li H, Ren F. CRISPR/Cas13-assisted hepatitis B virus covalently closed circular DNA detection. *Hepatology International*, 2022, 16(2): 306–315.
- [77] 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.
- [78] He Q, Yu DM, Bao MD, Korensky G, Chen JH, Shin M, Kim J, Park M, Qin PW, Du K. High-throughput and all-solution phase African swine fever virus (ASFV) detection using CRISPR-Cas12a and fluorescence based point-of-care system. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 154: 112068.
- [79] Rossmannith P, Krassnig M, Wagner M, Hein I. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Research in Microbiology*, 2006, 157(8): 763–771.
- [80] You Y, Zhang P, Wu G, Tan Y, Zhao Y, Cao S, Song Y, Yang R, Du Z. Highly specific and sensitive detection of *Yersinia pestis* by portable Cas12a-UPTLFA Platform. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 700016.
- [81] Yu F, Zhang K, Wang Y, Li D, Cui Z, Huang J, Zhang S, Li X, Zhang L. CRISPR/Cas12a-based on-site diagnostics of *Cryptosporidium parvum* IId-subtype-family from human and cattle fecal samples. *Parasit Vectors*, 2021, 14(1): 208.
- [82] Williams MA, O'Grady J, Ball B, Carlsson J, De Eyto E, McGinnity P, Jennings E, Regan F, Parle-Mcdermott A. The application of CRISPR-Cas for single species identification from environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(5): 1106–1114.
- [83] Chen G, Lyu YF, Wang DS, Zhu L, Cao SY, Pan C, Feng EL, Zhang WC, Liu XK, Cui YJ, Wang HL. Obtaining specific sequence tags for *Yersinia pestis* and visually detecting them using the CRISPR-Cas12a system. *Pathogens: Basel, Switzerland*, 2021, 10(5): 562.
- [84] Kosack CS, Page AL, Klatser PR. A guide to aid the selection of diagnostic tests. *Bulletin of the World Health Organization*, 2017, 95(9): 639–645.
- [85] Wessels HH, Méndez-Mancilla A, Guo XY, Legut M, Daniloski Z, Sanjana NE. Massively parallel Cas13 screens reveal principles for guide RNA design. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(6): 722–727.