



## 基于 CRISPR/Cas 系统的纸基分析在快速检测食源性致病菌中的应用\*

李鹏儒<sup>1)</sup> 沈兴<sup>1)</sup> 孟静南<sup>2)</sup> 罗林<sup>1)</sup> 王涓<sup>1)</sup> 徐振林<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup> 华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 广州 510642; (<sup>2)</sup> 安徽科技学院食品工程学院, 滁州 233100)

**摘要** 由食源性致病菌引起的食品安全事件严重影响人类健康, 开发针对食源性致病菌的快速检测技术十分必要。成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 是原核生物的适应性免疫系统, 具有特异性识别并切割核酸序列的功能。纸基分析方法作为一种简便性好、成本低廉的分析检测工具, 在快速检测领域展现出良好的前景。因此, 将 CRISPR/Cas 系统的高效识别能力和纸基分析方法的简便性相结合可实现对食源性致病菌的快速灵敏检测。本文简要介绍了 CRISPR/Cas 系统用于核酸检测的概况, 对第二类单 Cas 效应蛋白系统的特点及原理进行概述, 重点综述基于 CRISPR/Cas 系统的试纸分析、侧向流动分析和纸基微流控装置在检测食源性致病菌方面的应用, 并讨论了 CRISPR/Cas 系统结合纸基分析建立检测方法的优势、当前的挑战及未来的发展前景。

**关键词** 成簇间隔短回文重复序列及相关蛋白, 食源性致病菌, 纸基分析, 快速检测  
**中图分类号** TS207.4

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0365

食源性致病菌是指人类通过食物摄入并引发食源性疾病的微生物, 常见的食源性致病菌有沙门氏菌、单增李斯特菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌等<sup>[1]</sup>, 食用被其污染的食物通常引起腹泻、呕吐、恶心等症状, 严重时会引起肾脏损害和大脑神经损伤, 甚至导致死亡<sup>[2]</sup>。食源性致病菌的污染非常普遍, 根据世界卫生组织在 2015 年公布的数据, 全球每年 6 亿例食源性疾病患者中有 5.5 亿例是由腹泻型传染性病原体引起的, 造成 23 万人死亡, 其中仅非伤寒沙门氏菌一种就造成了 5.9 万人死亡<sup>[3]</sup>。在美国, 食源性致病菌是引起食源性疾病的重要原因 (占 33%)<sup>[4]</sup>。据报道, 中国在 2011~2020 年期间共报告食源性疾病暴发事件 35 806 起, 在各致病因素中, 因食源性致病菌导致的患者数量最多, 占 35.69%<sup>[5]</sup>。因此, 必须准确快速灵敏地检测食源性致病菌以保障食品安全和人类健康。

作为食源性致病菌的传统检测方法, 细菌培养和生理生化指标鉴定便宜简单, 但耗时长达 3 d 甚

至 1 周以上<sup>[6]</sup>, 因此无法满足行业与监管机构需在数小时内完成筛查的需求。随着检测技术的发展, 例如基于抗原抗体结合的免疫分析<sup>[7-8]</sup>、基于聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的分子检测<sup>[9-10]</sup>等方法被应用于食源性致病菌的快速检测, 但酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 耗时偏长且灵敏度略低, 免疫层析法检测速度快, 但灵敏度较差, PCR 对实验人员和环境要求高, 这些不足使上述方法在现场检测中受限。

近年来, 由成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 组成的 CRISPR/Cas 系统作为新型的生物工具在基因编辑<sup>[11]</sup>、基因转录调

\* 国家自然科学基金 (32072316) 和广东省基础与应用基础研究重大项目 (2020B0301030005) 资助。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 020-85283448, E-mail: xzlin@scau.edu.cn

收稿日期: 2023-09-15, 接受日期: 2023-11-09

控<sup>[12]</sup>等领域中得到了极大发展。除此之外, CRISPR/Cas 系统具有脱氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease, DNase) 和核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 活性<sup>[13-14]</sup>, 通过指导 RNA (guide RNA, gRNA) 靶向核酸目的片段和激活相关 Cas 蛋白的核酸酶活性, 为生物传感器的开发提供了理论基础。目前, 以基于 CRISPR/Cas13a 的特异性高灵敏度酶报告系统 (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, SHERLOCK)<sup>[15]</sup> 和基于 CRISPR/Cas12a 的 DNA 内切酶靶向 CRISPR 反式报告系统 (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter, DETECTR)<sup>[14]</sup> 为代表的多种核酸检测技术已成功开发, 在医学诊断、生命科学和食品安全等多个领域中应用, 并且在提升食源性致病菌检测水平上具有巨大潜力。

纸作为一种易获得的材料, 具有可降解、重量轻、易改性等优点<sup>[16]</sup>, 据此建立的纸基分析方法作为各类生物化学分析平台具有操作简便、成本低廉等优势<sup>[17]</sup>, 非常适用于现场的即时快速检测。纸基分析方法可使用比色<sup>[18]</sup>、荧光<sup>[19]</sup>、电化学<sup>[20]</sup>、化学发光<sup>[21]</sup> 等作为信号输出方式, 并且根据不同的应用形式, 还可分为试纸分析<sup>[22]</sup>、侧流层析试纸条<sup>[23]</sup>、纸基微流控<sup>[24]</sup> 等类型, 以满足不同场景的检测需要。将纸基分析与 CRISPR/Cas 系统联合起来开发的新型传感体系, 在现场检测领域具有极强的应用前景。

本文对基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测技术进行介绍, 并着重综述基于 CRISPR/Cas 系统的纸基分析方法检测食源性致病菌的最新研究进展, 讨论当前的挑战与未来的发展前景, 这将有助于开发更有效的食源性致病菌检测方法。

## 1 CRISPR/Cas 系统的概述及分类

CRISPR/Cas 系统存在于细菌和古细菌中, 是一种可识别并特异性切割入侵核酸序列的适应性免疫系统<sup>[25-26]</sup>。含有 CRISPR/Cas 系统的原核生物受到感染时, 获得的入侵核酸序列会插入并储存至 CRISPR 基因座中<sup>[25]</sup>。当原核生物再次受到感染后, 根据 CRISPR 基因座转录的前体 CRISPR RNA (crRNA) 被加工为成熟的 crRNA, 并被不同 Cas 效应蛋白识别并引导 Cas 效应蛋白靶向入侵核酸序列, 当两者互补结合后, Cas 效应蛋白的核酸内切酶活性被激活并切割对应的入侵核酸序列<sup>[27]</sup>。

CRISPR/Cas 系统主要分为第一类和第二类,

进一步则可细分为 6 种亚型 (I~VI 型)<sup>[28]</sup>。第一类包括 I、III 和 IV 型, 主要利用多 Cas 效应蛋白复合物来发挥作用; 第二类则包括 II、V 和 VI 型, 主要由含有多个结构域的单一 Cas 效应蛋白发挥作用。在 6 种亚型中, I、II、V 型系统可对 DNA 靶标序列进行识别切割, VI 型系统可识别切割 RNA 靶标序列, III 型系统可处理 DNA 和 RNA 靶标序列, 而 IV 型系统的功能机制细节仍有待进一步探究, 但已有研究表明, IV-A 型系统具有识别并解开目标双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 的能力<sup>[29-30]</sup>。目前, 第二类 CRISPR/Cas 系统因其基于单一效应蛋白具有特异性强、灵敏度高和操作方便等优点, 在生物传感等方面被广泛研究和应用<sup>[31]</sup>, 因此本文主要讨论第二类中的 II、V 和 VI 型 CRISPR/Cas 系统的特点及原理。

### 1.1 II 型效应蛋白

CRISPR/Cas 系统的 Cas9 蛋白是最具有代表性的 II 型效应蛋白, 也是最早应用在核酸检测领域的 Cas 蛋白<sup>[32]</sup>。Cas9 蛋白识别富含 G 的前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM), 切割 PAM 序列附近的 dsDNA。根据 crRNA 和反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 的特征设计单一指导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 该 sgRNA 可引导 Cas9 蛋白识别 PAM 为 5'-NGG-3' 的 dsDNA 并结合在其上游序列, 通过 HNH 结构域切割与 sgRNA 配对的互补链, 通过 RuvC 结构域切割另一条非互补链<sup>[33]</sup>, 从而使 dsDNA 断裂并产生平末端。此外, 研究人员还通过对 H840 位点 (HNH 结构域) 和 D10 位点 (RuvC 结构域) 进行突变, 获得丧失切割活性的 dCas9 (dead Cas9), 但该 dCas9 蛋白仍然可在 sgRNA 的引导下特异性识别目标 DNA<sup>[34]</sup>, 由于具备高度特异性的结合能力, dCas9 蛋白在免扩增核酸检测中得到了一定应用<sup>[35-36]</sup>。

### 1.2 V 型效应蛋白

常用的 Cas12 蛋白亚型有 Cas12a 蛋白和 Cas12b 蛋白。由于 Cas12b 的温度要求较高, 其最佳 DNA 切割活性的温度为 48°C<sup>[37]</sup>, 影响了在生物传感和检测领域的应用, 而 Cas12a 仅需 37°C, 目前应用较多的仍然是 Cas12a 蛋白。Cas12a 蛋白具有单个 RuvC 结构域, 仅需单一 crRNA 引导并识别目标 dsDNA 上游的 5'-(T)TTN-3' 的 PAM 序列即可切割目标 dsDNA, 同时激活反式切割活性, 非特异性切割单链 DNA (single-stranded DNA,

ssDNA)<sup>[14]</sup>。Cas12b蛋白的RNA介导模式与Cas9蛋白类似,由crRNA和tracrRNA两者引导,含有单个RuvC结构域<sup>[38]</sup>。

Cas12f蛋白(旧称Cas14)由400~700个氨基酸组成,其大小是其他第二类Cas效应蛋白的一半,具有RuvC结构域,可在无PAM序列的情况下由crRNA和tracrRNA两者或sgRNA引导并识别切割目标ssDNA<sup>[39]</sup>。除靶向ssDNA外,还具有PAM(5'-TTTR-3')依赖性的dsDNA切割活性<sup>[40]</sup>,发生顺式切割后即可激活反式切割活性。由于目标DNA中的碱基错配会严重影响其活性,因此Cas12f拥有更高的特异性<sup>[39]</sup>。

1.3 VI型效应蛋白

以Cas13为特征蛋白的VI型效应蛋白专门以

RNA为靶标,有两个与Cas13的RNase活性相关的HEPN(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide, HEPN)结构域<sup>[13, 41]</sup>,由于其缺乏RuvC结构域,因此无DNase活性<sup>[42]</sup>。Cas13a蛋白是其中最具代表性的效应蛋白,当crRNA引导Cas13a蛋白靶向目标ssRNA后,不仅切割识别的靶标ssRNA,还会非特异性地切割体系中的任意ssRNA<sup>[43]</sup>。Cas13蛋白无需PAM序列,但需要原型间隔子侧翼位点(proto-spacer-flanking site, PFS)且PFS的3'端需为腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶<sup>[44]</sup>,因为鸟嘌呤碱基会影响crRNA与靶标ssRNA之间的碱基互补配对<sup>[13]</sup>。不同类型的Cas效应蛋白的检测特性如表1和图1所示。

Table 1 Detection properties of different CRISPR-associated protein

表1 不同Cas效应蛋白的检测特性

	Cas9	Cas12a	Cas13a	Cas12f (旧称Cas14)
所属类型	II	V	VI	V
PAM/PFS序列	5'-NGG-3'	5'-TTTN-3'	3'A/U/C	无(ssDNA)或5'-TTTR-3'(dsDNA)
靶标	dsDNA	dsDNA	ssRNA	ssDNA或dsDNA
指导RNA	sgRNA	crRNA	crRNA	sgRNA
活性结构域	HNH、RuvC	RuvC	2×HEPN	RuvC
反式切割活性	无	有(ssDNA)	有(ssRNA)	有(ssDNA)

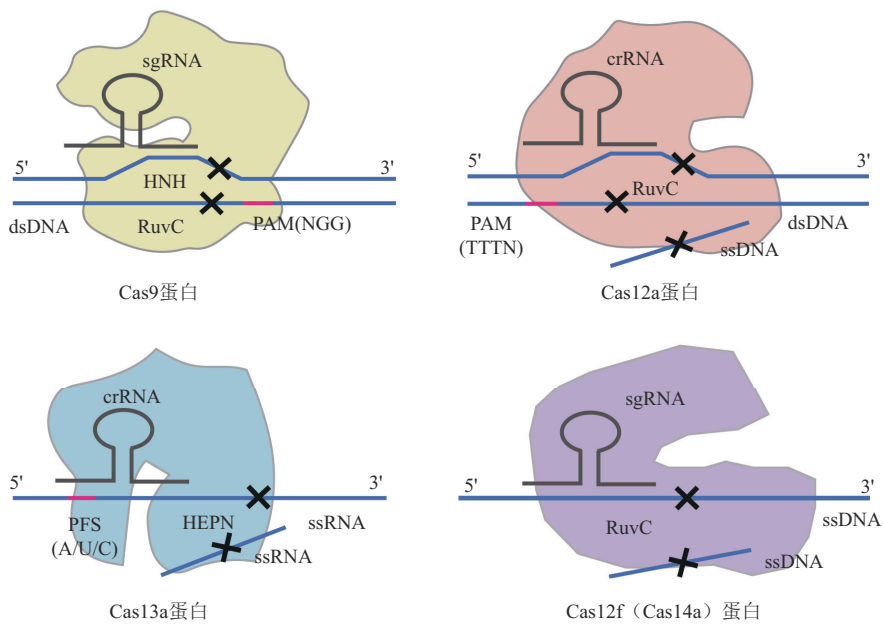


Fig. 1 Principles of detection of different CRISPR-associated protein

图1 不同Cas效应蛋白的检测原理

## 2 基于CRISPR/Cas系统的纸基分析方法在食源性致病菌检测的研究进展

CRISPR/Cas系统兼具特异性识别、高灵敏度等特点,在开发生物传感器和检测方法方面具有巨大的优势。Collins课题组<sup>[32]</sup>首先在2016年应用CRISPR/Cas9系统实现对寨卡病毒RNA基因组的检测。紧接着张锋课题组<sup>[15]</sup>于2017年结合重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)开发出基于CRISPR/Cas13a的核酸检测系统SHERLOCK,其作为体外核酸检测系统可实现对寨卡病毒、登革热病毒核酸的富集和检测,检测灵敏度达到了amol/L级别。Doudna课题组<sup>[14]</sup>于2018年开发出与SHERLOCK相似的核酸检测系统DETECTR,利用Cas12a效应蛋白和RPA成功检测出amol/L级别的目标DNA,这些系统的成功开发引起了CRISPR系统用于核酸检测的研究热潮。近年来,研究者们将CRISPR/Cas系统与多种传感技术相结合,以期建立具有高特异性的简便新型生物传感器,但由于依赖实验室设备,许多新型传感器在现场检测方面的应用受到限制。而纸基分析方法尤其是试纸分析、侧向流动分析(lateral flow assays, LFAs)和纸基微流控装置( $\mu$ PADs)具有操作简便、成本低等优点,使其在食品安全现场检测领域发挥着重要作用<sup>[45-46]</sup>。因此,试纸分析、LFAs和 $\mu$ PADs作为常用的纸基分析方法与基于CRISPR/Cas系统的生物传感器结合,在食源性致病菌的现场快速检测中可展现出巨大的潜力,相关研究如表2所示。

### 2.1 基于CRISPR/Cas系统的试纸分析

试纸分析通常是将可发生颜色变化的物质固定在纸上,当目标检测物存在时,与纸上的物质发生化学反应,通过颜色变化即可完成对样品的检测。例如,Collins课题组<sup>[32]</sup>基于在试纸上发生的比色变化,利用核酸依赖性扩增技术(nuclear acid sequence-based amplification, NASBA)和CRISPR/Cas系统建立了检测并区分寨卡病毒与其他病毒的试纸传感器。作者使用NASBA扩增合成“立足点开关”的触发序列并整合到靶标上,针对靶标设计的sgRNA引导CRISPR/Cas9系统识别并切割靶标上的NGG序列。当靶标不存在时,未被Cas9切割的dsDNA可转录出全长RNA,激活试纸上的“立足点开关”传感器,此时激活的传感器成功表达LacZ酶,试纸颜色由黄色变为紫色;当靶

标存在时,dsDNA被Cas9蛋白切割,由于无法转录出完整的RNA序列,导致无法激活传感器,此时试纸颜色仍为黄色。作者利用发生在PAM位点的单碱基差异实现了在试纸上对不同病毒的检测和区分,提示可利用各个CRISPR/Cas系统的PAM位点存在的碱基差异来对同源性高的食源性致病菌进行便捷式的区分。

此外,还有研究利用CRISPR/Cas系统的附属切割活性开发的生物传感器与滤纸片结合,通过采集滤纸上的荧光信号完成对目标物的检测和定量。Katzmeier等<sup>[47]</sup>在滤纸上冻干CRISPR/Cas13a系统的反应试剂,使其可以长期保存以适应现场检测的需要,并开发了一种成本不到15美元的小型荧光检测器。当含有靶标RNA的样品溶液与滤纸接触后,即可使Cas13a蛋白切割含有荧光基团的单链RNA报告探针并释放荧光基团,使用开发的小型荧光检测器对滤纸上的荧光信号进行读取,该方法可在20 min内检测到浓度为3 nmol/L的靶标RNA,与其他检测体系相比,滤纸的检测灵敏度偏低且该类方法的报道较少。在未来的研究中,可对试剂载体材料进行优化以提高检测性能,或将反应试剂更换为检测dsDNA的CRISPR/Cas12a系统,结合沸水法等简便方式提取食源性致病菌的基因组DNA,以促进在食品安全中现场快速检测并区分食源性致病菌的研究。

### 2.2 基于CRISPR/Cas系统的侧向流动分析

侧向流动分析作为一种十分有前景的检测方法,通过简单的信号读取方式即可实现对食源性致病菌的检测,其应用形式即为LFAs试纸条。通常情况下,将可能含有目标物的样品滴加至试纸条的样品垫上,并通过毛细管力迁移至结合垫,目标物即可与结合垫上的标记材料结合,随着结合物的迁移与硝酸纤维素膜上反应元件结合并最终到达吸水垫,通过测试线与控制线的颜色变化即可判断样品中是否含有目标物<sup>[48]</sup>。

Qian等<sup>[49]</sup>开发了一种将试纸条和CRISPR/Cas12a系统相结合的金黄色葡萄球菌检测方法。首先使用RPA对金黄色葡萄球菌的靶标片段进行扩增,然后通过CRISPR/Cas12a系统进行检测,将稀释后的检测液添加至试纸条中孵育,读出信号。该试纸条的控制线(C线)位于测试线(T线)的前端,样液先流经C线,再流经T线。其检测原理如图2a所示:FAM-ssDNA-生物素信号报告探针可以与结合垫上金标抗FAM抗体结合而形成复合物,

当不存在目标物时, C线上的链霉亲和素可通过生物素完整地捕获复合物, 由于胶体金颗粒的聚集而导致C线呈现红色, 而T线无颜色变化, 当目标存在时, 由于FAM-ssDNA-生物素信号报告探针被Cas12a蛋白切割, 被切割为FAM-ssDNA与ssDNA-生物素两部分, 此时C线上的链霉亲和素与ssDNA-生物素结合, 而FAM-ssDNA则与抗FAM抗体结合后被T线上的抗IgG抗体捕获, 从而导致T线变成红色。T线的颜色越深, 说明信号探针被切割得越彻底, 目标物含量则越多, C线颜色则与之相反。该方法在60 min内检测到1 CFU/ml的金黄色葡萄球菌, 对人工污染牛奶样品的检测限为20 CFU/ml, 对其他常见食品样品的检测限为 $1 \times 10^2$  CFU/ml。此外, Liu等<sup>[50]</sup>也基于以上原理, 建立了灵敏度高、便携性好的检测金黄色葡萄球菌的CRISPR-LFAs试纸条, 在40 min内可检测到最低5个拷贝(20  $\mu$ l体系)的金黄色葡萄球菌。这种基于生物素-链霉亲和素识别而设计的试纸条还被Lee等<sup>[51]</sup>联合环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)应用在沙门氏菌的检测中。

除了利用生物素-链霉亲和素识别系统进行检测外, 也可通过设计ssDNA捕获探针并将其固定在试纸条上, 与CRISPR/Cas系统的信号报告探针碱基互补配对来完成识别, 并通过更换标记材料的方式改变信号输出方式, 提升试纸条的灵敏度。在各种荧光标记材料中, 时间分辨荧光微球具有表面积大、荧光寿命长和斯托克斯位移宽的优点, 有助于提高标记效率和荧光强度并降低非特异性荧光信号的干扰<sup>[52]</sup>。Bao等<sup>[53]</sup>通过设计双crRNA系统将检测灵敏度提升27倍, 并基于此开发了一种用于检测沙门氏菌的免扩增AFC-TRFIA (amplification-free CRISPR-Cas12a time-resolved fluorescence immunochromatographic assay)平台(图2b)。该方法首先设计可碱基互补配对的ssDNA-1与ssDNA-2, 将Eu(III)-时间分辨荧光微球(time-resolved fluorescent microspheres, TRFM)与抗生物素抗体偶联, 并与修饰了生物素的ssDNA-1结合, 使三者(TRFM-生物素-ssDNA-1)形成一种替代传统ssDNA-FQ的信号报告探针。当靶标存在时, Cas12a附属切割该信号报告探针的ssDNA-1, 此时T线上包被的针对TRFM-生物素-ssDNA设计的ssDNA-2探针无法与之结合, T线无荧光, 而C线由于抗体被二抗捕获而聚集产生明显的荧光;

当靶标不存在时, TRFM-生物素-ssDNA-1报告探针无法被Cas12a切割而被T线上的ssDNA-2探针捕获, 抗体也被C线上的二抗捕获, 此时T线与C线同时在紫外的照射下产生荧光, 该平台可在30 min内完成对耐药性沙门氏菌的检测, 检测线性范围为 $4.9 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^6$  CFU/ml, 计算检测限达84 CFU/ml。

采用类似的原理, Zhou等<sup>[54]</sup>基于链霉亲和素修饰的量子点(quantum dots)和重组酶介导核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA), 建立了针对金黄色葡萄球菌检测的CRA-LFB (CRISPR/Cas-recombinase-assisted amplification based LFB)侧流分析传感器。该LFB传感器在70 min内对金黄色葡萄球菌的基因组DNA的检测限达75 amol/L, 对细菌菌液的检测限可达 $5.4 \times 10^2$  CFU/ml。与胶体金颗粒和荧光染料相比, 量子点标记具有高荧光特性与良好的稳定性<sup>[55]</sup>, 在LFBs试纸条上具有更高的灵敏度和更低的背景干扰的优点<sup>[56]</sup>。

上述基于CRISPR/Cas系统的侧流层析分析主要可分为两类, 即基于生物素-链霉亲和素相互识别原理和基于两种ssDNA探针互补配对原理设计的试纸条。这些试纸条的检测结果不仅取决于信号报告探针的裂解程度, 还取决于其他因素, 如未被切割的信号报告探针、标记材料(如胶体金复合物)与控制线上的受体之间的相互作用, 已切割的信号报告探针与标记材料之间的相互作用, 以及标记材料随时可能发生在测试线上的相互作用<sup>[57]</sup>, 这些因素均有可能造成假阳性的检测结果。因此, Ivanov等<sup>[57]</sup>开发了一种通用型的DNA-IgG信号报告探针和基于CRISPR/Cas系统的新型试纸条(图2c), 使测试线中的颜色变化直接与目标分析物的含量相关, 作者首先设计了一种由“生物素-dsDNA-ssDNA-FAM”组成的DNA复合物, 将其与抗FAM抗体组成了通用型的DNA-IgG探针, 并通过链霉亲和素将该探针包被在96孔板中。当靶标存在时, Cas12a的附属切割活性被激活, 反应液添加到96孔板中即可裂解复合探针中的ssDNA部分, 然后将抗FAM抗体释放在溶液中, 试纸条的T线和胶体金颗粒表面的山羊抗鼠抗体分别竞争结合抗FAM抗体的不同位点, 此时T线显色, C线上的单克隆鼠抗体可通过结合胶体金颗粒表面的山羊抗鼠抗体而显色。此平台有长时间(90 min)和短时间(30 min)两种测试方式, 其中长时间方案

对靶标dsDNA的检测限为0.5 nmol/L, 短时间方案的检测限为1 nmol/L, 该方法通过更换 crRNA 即可完

成对不同目标物的检测。

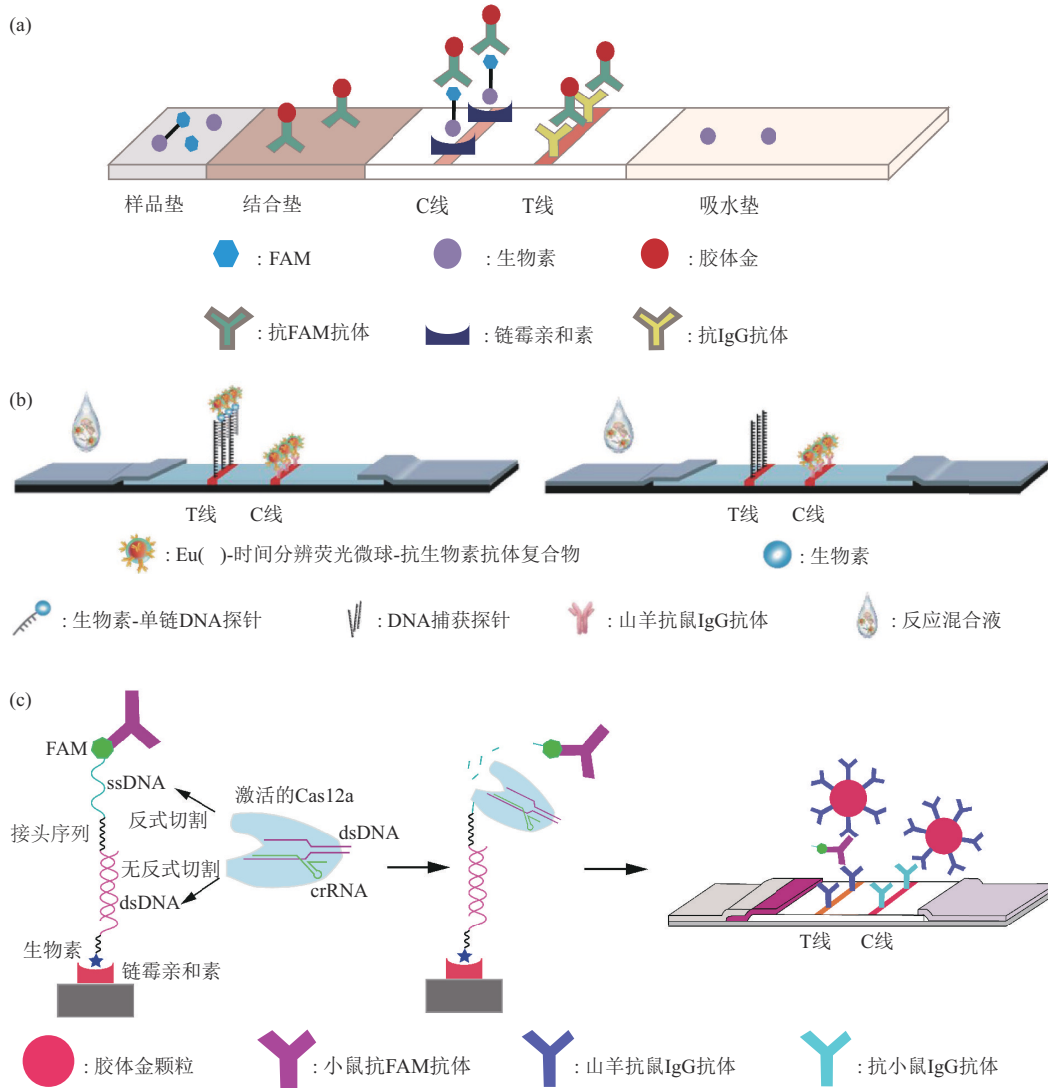


Fig. 2 CRISPR/Cas12a based lateral flow analysis

图2 基于CRISPR/Cas12a系统的侧向流动分析

(a) 基于生物素-链霉亲和素的CRISPR/Cas12a试纸条; (b) 基于DNA捕获探针的CRISPR/Cas12a试纸条<sup>[53]</sup>; (c) 通用型DNA-IgG信号报告探针的CRISPR/Cas12a试纸条。

以上研究都建立在 Cas12a 的附属切割效应之上, 而 CRISPR/Cas9 系统同样拥有出色的 DNA 识别能力, 其 5'-NGG-3' 的 PAM 序列在基因组的检测频率大于 CRISPR/Cas12a 系统的 5'-TTTN-3' 的 PAM 序列<sup>[58]</sup>, 这对于 CRISPR/Cas9 系统在食源性致病菌检测方面的限制会更小。

Wang 等<sup>[58]</sup> 依据 CRISPR/Cas9 系统识别目标 dsDNA 后会将非靶向 DNA 链作为 ssDNA 释放的原理<sup>[59]</sup>, 设计了两种 AuNP-DNA 探针并建立了 CRISPR/Cas9 介导侧向流动核酸检测平台

(CRISPR/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay, CASLFA)。其设计的 AuNP-DNA 探针由标记区、控制线互补配对区和信号探针互补配对区组成 (图 3)。该平台首先使用生物素化引物可成功对检测靶标进行扩增, 通过与 CRISPR/Cas9 系统孵育后滴入试纸条中, 随后 AuNP-DNA 探针即可通过信号探针互补配对区与结合了 Cas9 蛋白的生物素化扩增靶标结合, 其复合物接着被 T 线上的链霉亲和素结合, 从而使 T 线显色, 此时过量的 AuNP-DNA 探针继续流动并通过控制线互补配对区与预

先包被在C线的DNA探针结合,导致C线显色。作者还通过修改sgRNA的框架区,并据此修改AuNP-DNA探针的信号探针互补配对区,获得了一种AuNP-DNA通用型探针,开发出一种通用型CASLFA,每50 μl的反应可检测到150个拷贝的单增李斯特菌。此外,为了同时检测多种食源性致病菌,Wang等<sup>[60]</sup>结合CRISPR/Cas9n和试纸条开发了一种双重检测食源性致病菌方法,其中Cas9n是由Cas9蛋白通过定点突变而获得,仅保留了HNH活性结构域<sup>[61]</sup>。作者首先利用Cas9n蛋白建立了针对大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的恒温双重DNA

扩增技术,接着将地高辛和生物素标记在大肠杆菌扩增子两侧,将FITC和生物素标记在鼠伤寒沙门氏菌扩增子两侧,在试纸条的T1线包被抗地高辛抗体,T2线包被抗FITC抗体,C线则包被生物素化二抗以用于结合过量的链霉亲和素标记的彩色乳胶微球,该方法可同时检测两种食源性致病菌,其对基因组DNA的检测限仅为100拷贝/μl,细菌菌液的检测限为100 CFU/ml。另外,Wang等<sup>[62]</sup>也通过Cas9蛋白设计了检测沙门氏菌的试纸条,最低可检测到10<sup>2</sup> CFU/ml的沙门氏菌,并且可准确地检测到被污染的牛奶样品。

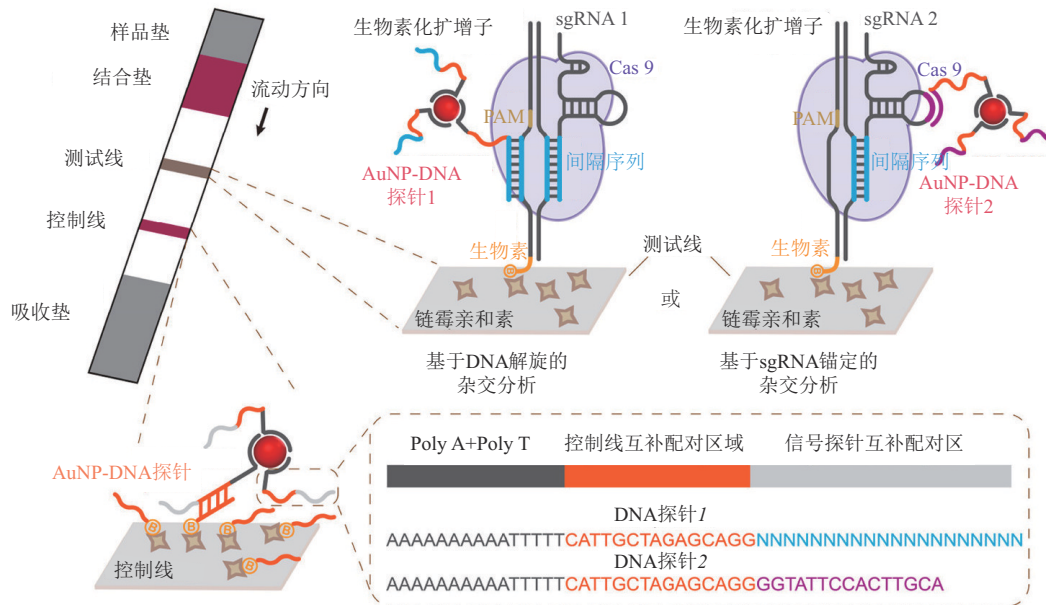


Fig. 3 CRISPR/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay<sup>[58]</sup>

图3 CRISPR/Cas9介导侧向流动核酸检测平台<sup>[58]</sup>

### 2.3 基于CRISPR/Cas系统的纸基微流控装置

微流控装置是将样品制备、反应、分离和检测分析等实验操作集成到一个微米级的芯片中,芯片通常可由玻璃、石英、高分子材料、水凝胶和纸等多种材料构成,具有自动化、小型化、高通量和低成本的特点<sup>[63]</sup>。与其他微流控装置相比,纸基微流控装置(μPADs)具有许多优势:a.纸张成本低,属于可再生资源;b.无需外力,依靠毛细管作用力即可驱动样品进行分析;c.具有良好的柔韧性;d.预储存反应试剂等<sup>[64]</sup>,可成为检测食源性致病菌的有力工具<sup>[65-67]</sup>。尽管μPADs具有以上优点,但仍然存在检测灵敏度低和定量能力有限等缺点<sup>[64]</sup>,这可能是由于储存在μPADs上的试剂活性易发生变化、试剂混合不均匀以及浓度不合适等原

因导致的<sup>[68-69]</sup>。近年来研究者们通过探索各种技术来推动μPADs的设计与改造,例如Yin等<sup>[70]</sup>结合CRISPR/Cas系统和RPA设计了一种多重检测装置,在1 h内检测到100个拷贝的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)RNA。因此CRISPR/Cas系统与μPADs联用可进一步提高其检测性能和拓展在食源性致病菌检测方面的应用。

为了充分挖掘μPADs联用CRISPR/Cas系统检测食源性致病菌的潜力,Zhuang等<sup>[71]</sup>基于RPA和CRISPR/Cas12a系统开发了一种联用表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)技术的μPADs装置以用于沙门氏菌的检测(图4a)。作者首先制备了一种通过ssDNA相互连接的具有SERS信号的纳米材料,靶标存在时

Cas12a 蛋白会切割 ssDNA, 此时纳米材料经过短暂离心后仍保持胶体溶液状态, 而纳米材料的分散和聚集状态将带来不同的 SERS 信号。此外, 作者在  $\mu$ PADs 装置上干燥固定该纳米材料, 在反应垫上滴加 CRISPR/Cas12a 反应液后,  $\mu$ PADs 的毛细管力可对不同聚散状态的纳米材料进行分离, 最终将 DNA 信息转换为 SERS 信号来判定是否存在沙门氏菌, 该方法对人工污染牛奶和肉类样品的检测限分别为 3.72 CFU/ml 和 4.04 CFU/ml。此  $\mu$ PADs 可作为通用型的 CRISPR/Cas 信号输出装置用于检测不同的食源性致病菌, 满足更多的检测场景需求。

为了在  $\mu$ PADs 装置上对目标进行定量检测, Huang 等<sup>[72]</sup> 开发了一种集成了 CRISPR/Cas12a 系统和水凝胶以用于定量检测真菌含量的  $\mu$ PADs 装置 (图 4b)。水凝胶由 Y 型支架 DNA 和连接 DNA 自组装构成并保留了可供 Cas12a 蛋白切割的 ssDNA 连接位点。作者首先对真菌的 18s rRNA 进行逆转录以获得带有 PAM 位点的 dsDNA, Cas12a 蛋白即可被 dsDNA 激活 DNase 活性, 水凝胶解体并释放出葡萄糖淀粉酶, 此时溶液中的直链淀粉被水解进而产生了大量的葡萄糖,  $\mu$ PADs 装置的加样孔中预装的葡萄糖氧化酶可将溶液中的葡萄糖氧化

成  $H_2O_2$ , 在毛细管作用力的驱动下  $H_2O_2$  被预装在反应通道的辣根过氧化物酶用于将二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 转化为棕色的 DAB。在  $\mu$ PADs 装置中葡萄糖的浓度与棕色条带的长度呈正相关, 因此根据棕色条带的长度即可判断真菌的含量, 该装置对几种细菌的肉眼检测限可低至 10 CFU/ml, 实现了对目标物的定量检测。尽管以上联用了 CRISPR/Cas 系统的  $\mu$ PADs 装置具有许多优点, 但是基于纸基的微流控装置仍存在如疏水性差、拉伸强度低等缺点, 这意味着在开发  $\mu$ PADs 装置过程中需要注意纸基材料的选择, 这些因素将使  $\mu$ PADs 的应用受到一定的限制<sup>[73]</sup>。

除纸基微流控外, 基于 CRISPR/Cas 系统的其他类型微流控芯片检测食源性致病菌的技术也得到了研究, 如结合 RAA 扩增和一锅法 CRISPR/Cas12a 的手指驱动微流控芯片可同时检测多种食源性致病菌<sup>[74]</sup>, 将 CRISPR/Cas13a 系统与微流控芯片结合检测李斯特菌<sup>[75]</sup> 以及基于 CRISPR/Cas12a 系统检测金黄色葡萄球菌的数字微流控技术等<sup>[76]</sup>。总体而言, 基于 CRISPR/Cas 系统开发针对食源性致病菌的微流控检测方法在现场检测方面具有巨大的优势和前景。

**Table 2 Summary of detection techniques based on CRISPR/Cas system and different paper-based analysis methods**

**表2 基于CRISPR/Cas系统和不同纸基分析方法的检测技术总结**

纸基方法	Cas效应蛋白	目标物	检测限	检测时间 (不含前处理)	参考文献
试纸分析	Cas9	寨卡病毒	/	2~3 h	[32]
	Cas13a	RNA适配体	3 nmol/L	20~60 min	[47]
侧向流动分析	Cas12a	金黄色葡萄球菌	1 CFU/ml	60 min	[49]
	Cas12a	金黄色葡萄球菌	5 copy/reaction (20 $\mu$ l)	40 min	[50]
	Cas12a	沙门氏菌	1.22 CFU/ml	70 min	[51]
	Cas12a	沙门氏菌	84 CFU/ml	30 min	[53]
	Cas12a	金黄色葡萄球菌	$5.4 \times 10^2$ CFU/ml	70 min	[54]
	Cas12a	马铃薯黑胫病菌	0.5 nmol/L或1 nmol/L	60 min或30 min	[57]
	Cas9	单增李斯特菌	150拷贝/反应 (50 $\mu$ l)	40 min	[58]
	Cas9n	大肠杆菌	100 CFU/ml	90 min	[60]
	Cas9	鼠伤寒沙门氏菌			
纸基微流控	Cas12a	严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2)	100拷贝/反应 (30 $\mu$ l)	60 min	[70]
	Cas12a	沙门氏菌	34 CFU/ml	45 min	[71]
	Cas12a	念珠菌	10 CFU/ml	2 h	[72]
其他微流控	Cas12a	7种食源性致病菌	500 CFU/ml	45 min	[74]
	Cas13a	4种李斯特菌	30~100 CFU/ml	60 min	[75]
	Cas12a	金黄色葡萄球菌	32 CFU/ml	55 min	[76]



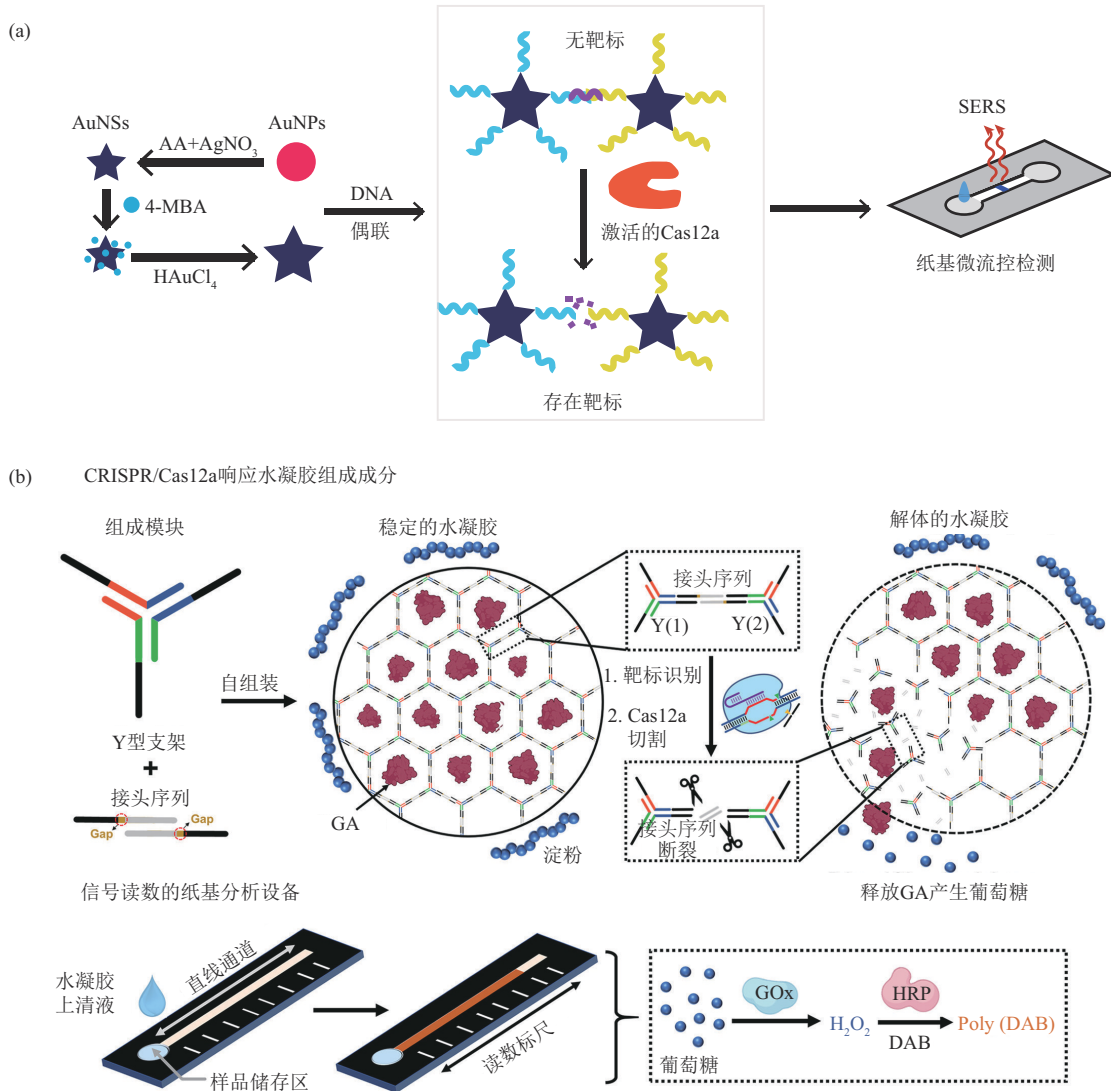


Fig. 4 CRISPR/Cas based paper-based microfluidic analytical devices

图4 基于CRISPR/Cas系统的纸基微流控装置

(a) 基于CRISPR/Cas和SERS的纸基微流控装置; (b) 基于CRISPR/Cas和水凝胶的纸基微流控装置<sup>[72]</sup>。GA: 葡萄糖淀粉酶; GOx: 葡萄糖氧化酶; HRP: 辣根过氧化物酶。

### 3 总结与展望

尽管在过去的一段时间里研究者们基于CRISPR/Cas系统开发了大量具有高灵敏度、高特异性、快速简便和一定通用性的生物传感器和纸基分析方法, 以用于检测食源性致病菌、病毒、毒素和其他污染物等, 但CRISPR/Cas系统仍处于发展阶段, 另外纸基分析方法中纸基材料固有的纤维素结构也会影响其检测性能, 这些因素都会使所建立的检测方法在实际应用时面临许多挑战。a. 在现场检测中, 复杂的样品基质可能会影响检测效果, 需

要对检测样品进行如提取和纯化等操作的预处理, 因此开发简便有效的样品提取装置也是提高检测效率的重要手段。另外在构建基于CRISPR/Cas系统的纸基分析方法的过程中, 大多会涉及到核酸提取、扩增和检测3个主要步骤, 如果可以将这3个步骤集成在同一个LFAs试纸条或μPADs装置中, 则简便性和检测效率会得到很大提高。b. 尽管目前已经开发了基于各种Cas效应蛋白的生物传感器, 但仍需对各种Cas效应蛋白及其传感器的性质和工作机制进行进一步的研究。如Cas12f的特点之一是无需PAM和PFS序列即可靶向ssDNA并激活附

属切割活性, 这使其在单核酸多态性位点等应用场景上拥有比其他第二类 Cas 效应蛋白更小的限制, 基于 Cas12f 开发检测方法将存在更多可能性。c. 目前基于 CRISPR/Cas 系统设计的检测方法主要是针对单一检测目标, 难以对多个目标进行同时检测, 可针对 gRNA 和 Cas 蛋白进行改造来提高特异性, 进而满足在同一反应液中对不同目标物的识别。d. 纸基分析方法中纸基材料固有的纤维素结构会导致反应试剂等溶液难以均匀地分布在测试区域中, 从而会影响检测的准确度和灵敏度, 当溶液在纸基材料中的流动受到影响时则可能会导致假阴性结果的产生, 将纸基材料与新兴生物材料结合以改进其结构也是提高分析性能的方法之一。

总体来说, CRISPR/Cas 系统与纸基分析结合具有非常可观的发展前景, 但目前两者结合建立的分析方法分为 CRISPR/Cas 检测和纸基分析两个步骤组成, 如果将 Cas 蛋白以保留活性的方式直接整合在纸基材料并建立简便的一步纸基分析方法, 这将具有巨大的应用潜力和商业化前景, 值得进一步探索。

### 参 考 文 献

- [1] Demirci A, Feng H, Krishnamurthy K. Food Safety Engineering. Switzerland: Springer Cham, 2020: 25-49
- [2] Gallo M, Ferrara L, Calogero A, *et al.* Relationships between food and diseases: what to know to ensure food safety. Food Res Int, 2020, **137**: 109414
- [3] World Health Organization. WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015. Switzerland: World Health Organization Press, 2015: 61-89
- [4] Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, *et al.* Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. Emerg Infect Dis, 2011, **17**(1): 7-15
- [5] 夏琳琳, 邱爽, 王若彤, 等. 2011-2020 年中国食源性疾病暴发的时空趋势. 卫生研究, 2023, **52**(2): 226-231  
Xia L L, Qiu S, Wang R T, *et al.* Journal of Hygiene Research, 2023, **52**(2): 226-231
- [6] Zhao X, Lin C W, Wang J, *et al.* Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. J Microbiol Biotechnol, 2014, **24**(3): 297-312
- [7] Zhao Y, Zeng D, Yan C, *et al.* Rapid and accurate detection of *Escherichia coli* O157:H7 in beef using microfluidic wax-printed paper-based ELISA. Analyst, 2020, **145**(8): 3106-3115
- [8] Wangman P, Surasilp T, Pengsuk C, *et al.* Development of a species-specific monoclonal antibody for rapid detection and identification of foodborne pathogen *Vibrio vulnificus*. J Food Safety, 2021, **41**(6): e12939
- [9] Liu Y, Cao Y, Wang T, *et al.* Detection of 12 common food-borne bacterial pathogens by TaqMan real-time PCR using a single set of reaction conditions. Front Microbiol, 2019, **10**: 222
- [10] Wei C, Zhong J, Hu T, *et al.* Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* by multiplex PCR in milk. 3 Biotech, 2018, **8**(1): 76
- [11] Abdulrachman D, Champreda V, Eurwilaichitr L, *et al.* Efficient multiplex CRISPR/Cpf1 (Cas12a) genome editing system in *Aspergillus aculeatus* TBRC 277. J Biotechnol, 2022, **355**: 53-64
- [12] Mahas A, Neal S C, Mahfouz M M. Harnessing CRISPR/Cas systems for programmable transcriptional and post-transcriptional regulation. Biotechnol Adv, 2018, **36**(1): 295-310
- [13] Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Konermann S, *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science, 2016, **353**(6299): aaf5573
- [14] Chen J S, Ma E, Harrington L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science, 2018, **360**(6387): 436-439
- [15] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science, 2017, **356**(6336): 438-442
- [16] Mahadeva S K, Walus K, Stoeber B. Paper as a platform for sensing applications and other devices: a review. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, **7**(16): 8345-8362
- [17] Mahato K, Srivastava A, Chandra P. Paper based diagnostics for personalized health care: emerging technologies and commercial aspects. Biosens Bioelectron, 2017, **96**: 246-259
- [18] Galiga H F, Sevilla F B. Digital colorimetric sensor for assessment of iodate in food-grade salt based on paper-based analytical device. Food Chem, 2023, **414**: 135741
- [19] Tong X, Cai G, Xie L, *et al.* Threaded 3D microfluidic paper analytical device-based ratiometric fluorescent sensor for background-free and visual detection of organophosphorus pesticides. Biosens Bioelectron, 2023, **222**: 114981
- [20] Zhang X, Zhi H, Zhu M, *et al.* Electrochemical/visual dual-readout aptasensor for ochratoxin A detection integrated into a miniaturized paper-based analytical device. Biosens Bioelectron, 2021, **180**: 113146
- [21] Li W, Luo Y, Yue X, *et al.* A novel microfluidic paper-based analytical device based on chemiluminescence for the determination of  $\beta$ -agonists in swine hair. Anal Methods, 2020, **12**(18): 2317-2322
- [22] 陈亚立, 贾挺挺, 祁昊, 等. 可视化组胺快速检测试纸研究. 食品研究与开发, 2018, **39**(18): 146-150  
Chen Y L, Jia T T, Qi H, *et al.* Food Research and Development, 2018, **39**(18): 146-150
- [23] Shi Z, Tian Y, Wu X, *et al.* A one-piece lateral flow impedimetric test strip for label-free clenbuterol detection. Anal Methods, 2015, **7**(12): 4957-4964
- [24] Trofimchuk E, Hu Y, Nilghaza A, *et al.* Development of paper-based microfluidic device for the determination of nitrite in meat. Food Chem, 2020, **316**: 126396

- [25] Sternberg S H, Richter H, Charpentier E, *et al.* Adaptation in CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*, 2016, **61**(6): 797-808
- [26] Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, **9**(6): 467-477
- [27] Behler J, Hess W R. Approaches to study CRISPR RNA biogenesis and the key players involved. *Methods*, 2020, **172**: 12-26
- [28] Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, **37**: 67-78
- [29] Wang F, Wang L, Zou X, *et al.* Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing. *Biotechnol Adv*, 2019, **37**(5): 708-729
- [30] Cui N, Zhang J T, Liu Y, *et al.* Type IV-A CRISPR-Csf complex: assembly, dsDNA targeting, and CasDinG recruitment. *Mol Cell*, 2023, **83**(14): 2493-2508
- [31] Wang S Y, Du Y C, Wang D X, *et al.* Signal amplification and output of CRISPR/Cas-based biosensing systems: a review. *Anal Chim Acta*, 2021, **1185**: 338882
- [32] Pardee K, Green A A, Takahashi M K, *et al.* Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016, **165**(5): 1255-1266
- [33] Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, **346**(6213): 1258096
- [34] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816-821
- [35] Zheng F, Chen Z, Li J, *et al.* A highly sensitive CRISPR-empowered surface plasmon resonance sensor for diagnosis of inherited diseases with femtomolar-level real-time quantification. *Adv Sci*, 2022, **9**(14): 2105231
- [36] Yang W, Restrepo-perez L, Bengtson M, *et al.* Detection of CRISPR-dCas9 on DNA with solid-state nanopores. *Nano Lett*, 2018, **18**(10): 6469-6474
- [37] Shmakov S, Abudayyeh O O, Makarova K S, *et al.* Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*, 2015, **60**(3): 385-397
- [38] Liu L, Chen P, Wang M, *et al.* C2c1-sgRNA complex structure reveals RNA-guided DNA cleavage mechanism. *Mol Cell*, 2017, **65**(2): 310-322
- [39] Harrington L B, Burstein D, Chen J S, *et al.* Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, **362**(6416): 839-842
- [40] Karvelis T, Bigelyte G, Young J K, *et al.* PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(9): 5016-5023
- [41] Smargon A A, Cox D B T, Pyzocha N K, *et al.* Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell*, 2017, **65**(4): 618-630
- [42] Habimana J D D, Huang R, Muhoza B, *et al.* Mechanistic insights of CRISPR/Cas nucleases for programmable targeting and early-stage diagnosis: a review. *Biosens Bioelectron*, 2022, **203**: 114033
- [43] Hillary V E, Ceasar S A. A Review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Mol Biotechnol*, 2023, **65**(3): 311-325
- [44] Huang T, Zhang R, Li J. CRISPR-Cas-based techniques for pathogen detection: retrospect, recent advances, and future perspectives. *J Adv Res*, 2023, **50**: 69-82
- [45] Yu C Y, Ang G Y, Chua A L, *et al.* Dry-reagent gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for the simultaneous detection of *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139. *J Microbiol Meth*, 2011, **86**(3): 277-282
- [46] Weng X, Neethirajan S. Paper-based microfluidic aptasensor for food safety. *J Food Safety*, 2018, **38**: e12412
- [47] Katzmeier F, Aufinger L, Dupin A, *et al.* A low-cost fluorescence reader for *in vitro* transcription and nucleic acid detection with Cas13a. *PLoS One*, 2019, **14**(12): e0220091
- [48] Shirshahi V, Liu G. Enhancing the analytical performance of paper lateral flow assays: from chemistry to engineering. *Trend Anal Chem*, 2021, **136**: 116200
- [49] Qian J, Huang D, Ni D, *et al.* A portable CRISPR Cas12a based lateral flow platform for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* with double insurance. *Food Control*, 2022, **132**: 108485
- [50] Liu L, Duan J J, Wei X Y, *et al.* Generation and application of a novel high-throughput detection based on RPA-CRISPR technique to sensitively monitor pathogenic microorganisms in the environment. *Sci Total Environ*, 2022, **838**: 156048
- [51] Lee S Y, Oh S W. Lateral flow biosensor based on LAMP-CRISPR/Cas12a for sensitive and visualized detection of *Salmonella* spp. *Food Control*, 2023, **145**: 109494
- [52] Liu Z, Hua Q, Wang J, *et al.* A smartphone-based dual detection mode device integrated with two lateral flow immunoassays for multiplex mycotoxins in cereals. *Biosens Bioelectron*, 2020, **158**: 112178
- [53] Bao Q, Sun J, Fu X, *et al.* A simplified amplification-free strategy with lyophilized CRISPR-CcrRNA system for drug-resistant *Salmonella* detection. *Small*, 2023, **19**: 2207343
- [54] Zhou B, Ye Q, Li F, *et al.* CRISPR/Cas12a based fluorescence-enhanced lateral flow biosensor for detection of *Staphylococcus aureus*. *Sensor Actuat B Chem*, 2022, **351**: 130906
- [55] Li J, Lv Y, Li N, *et al.* Robust synthesis of bright multiple quantum dot-embedded nanobeads and its application to quantitative immunoassay. *Chem Eng J*, 2019, **361**: 499-507
- [56] Li X, Li W, Yang Q, *et al.* Rapid and quantitative detection of prostate specific antigen with a quantum dot nanobeads-based immunochromatography test strip. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, **6**(9): 6406-6414
- [57] Ivanov A V, Safenkova I V, Zherdev A V, *et al.* DIRECT<sup>2</sup>: A novel platform for a CRISPR-Cas12-based assay comprising universal DNA-IgG probe and a direct lateral flow test. *Biosens Bioelectron*,

- 2022, **208**: 114227
- [58] Wang X, Xiong E, Tian T, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay. *ACS Nano*, 2020, **14**(2): 2497-2508
- [59] Jiang F, Zhou K, Ma L, *et al.* A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 2015, **348**(6242): 1477-1481
- [60] Wang L, Shen X, Wang T, *et al.* A lateral flow strip combined with Cas9 nickase-triggered amplification reaction for dual food-borne pathogen detection. *Biosens Bioelectron*, 2020, **165**: 112364
- [61] Wang T, Liu Y, Sun H H, *et al.* An RNA-guided Cas9 nickase-based method for universal isothermal DNA amplification. *Angew Chem Int Edit*, 2019, **58**: 5382-5386
- [62] Wang H, Wu Q, Zhou M, *et al.* Development of a CRISPR/Cas9-integrated lateral flow strip for rapid and accurate detection of *Salmonella*. *Food Control*, 2022, **142**: 109203
- [63] Zhou W, Le J, Chen Y, *et al.* Recent advances in microfluidic devices for bacteria and fungus research. *Trend Anal Chem*, 2019, **112**: 175-195
- [64] Noviana E, Ozer T, Carrell C S, *et al.* Microfluidic paper-based analytical devices: from design to applications. *Chem Rev*, 2021, **121**(19): 11835-11885
- [65] Xiang X, Ren X, Lu J, *et al.* Microfluidic isothermal amplification strategy coupled with improved propidium monoazide (PMAxx) for rapid detection of six viable foodborne pathogens. *Sensor Actuat B Chem*, 2023, **393**: 134246
- [66] Jin Z, Ding G, Li G, *et al.* Rapid detection of foodborne bacterial pathogens using visual high-throughput microfluidic chip. *J Chem Technol Biot*, 2020, **95**(5): 1460-1466
- [67] Cao Y, Ye C, Zhang C, *et al.* Simultaneous detection of multiple foodborne bacteria by loop-mediated isothermal amplification on a microfluidic chip through colorimetric and fluorescent assay. *Food Control*, 2022, **134**: 108694
- [68] Lim W Y, Goh B T, Khor S M. Microfluidic paper-based analytical devices for potential use in quantitative and direct detection of disease biomarkers in clinical analysis. *J Chromatogr B*, 2017, **1060**: 424-442
- [69] Akyazi T, Basabe D L, Benito L F. Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. *Anal Chim Acta*, 2018, **1001**: 1-17
- [70] Yin K, Ding X, Li Z, *et al.* Autonomous lab-on-paper for multiplexed, CRISPR-based diagnostics of SARS-CoV-2. *Lab Chip*, 2021, **21**(14): 2730-2737
- [71] Zhuang J, Zhao Z, Lian K, *et al.* SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods. *Biosens Bioelectron*, 2022, **207**: 114167
- [72] Huang D, Ni D, Fang M, *et al.* Microfluidic ruler-readout and CRISPR Cas12a-responded hydrogel-integrated paper-based analytical devices ( $\mu$ ReaCH-PAD) for visible quantitative point-of-care testing of invasive fungi. *Anal Chem*, 2021, **93**(50): 16965-16973
- [73] Qin X, Liu J, Zhang Z, *et al.* Microfluidic paper-based chips in rapid detection: current status, challenges, and perspectives. *Trend Anal Chem*, 2021, **143**: 116371
- [74] Xing G, Shang Y, Wang X, *et al.* Multiplexed detection of foodborne pathogens using one-pot CRISPR/Cas12a combined with recombinase aided amplification on a finger-actuated microfluidic biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2023, **220**: 114885
- [75] Xiang X, Li F, Ye Q, *et al.* High-throughput microfluidic strategy based on RAA-CRISPR/Cas13a dual signal amplification for accurate identification of pathogenic *Listeria*. *Sensor Actuat B Chem*, 2022, **358**: 131517
- [76] Lu L, Zhang H, Lin F, *et al.* Sensitive and automated detection of bacteria by CRISPR/Cas12a-assisted amplification with digital microfluidics. *Sensor Actuat B Chem*, 2023, **381**: 133409

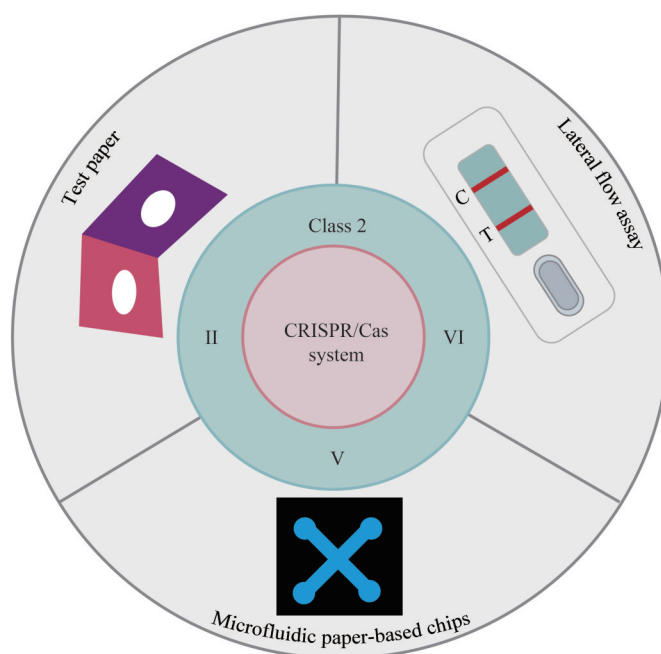
## Application of CRISPR/Cas System–integrated Paper–based Analytical Devices for Rapid Detection of Foodborne Pathogens\*

LI Peng-Ru<sup>1)</sup>, SHEN Xing<sup>1)</sup>, MENG Jing-Nan<sup>2)</sup>, LUO Lin<sup>1)</sup>, WANG Juan<sup>1)</sup>, XU Zhen-Lin<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Safety and Quality, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

<sup>2)</sup>College of Food Engineering, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, China)

### Graphical abstract



**Abstract** Foods can be contaminated with foodborne pathogens through a variety of pathways, including water, air and soil. Food safety events caused by foodborne pathogens show a serious impact on human health. However, due to the diversity of foodborne pathogens and the complexity of food matrices, the rapid detection of foodborne pathogens was difficult. The conventional microbial culture and physiological and biochemical identification can hardly meet the need of rapid detection of foodborne pathogens in the field. It is necessary to develop rapid detection technologies for foodborne pathogens. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and associated protein (Cas) are an adaptive immune systems of prokaryotes with specific recognition

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32072316) and Guangdong Basic and Applied Basic Research Major Programs (2020B0301030005).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-20-85283448, E-mail: xzlin@scau.edu.cn

Received: September 15, 2023 Accepted: November 9, 2023

and cleavage of nucleic acid sequences, which shows good potential for development of nucleic acid detection and biosensing in the field. According to different forms of application, paper-based analytical devices can be categorized into test paper, lateral flow assay and microfluidic paper-based chips, *etc.* As a good simplicity and low-cost analytical testing tools, they show good prospects in the field of rapid testing. Therefore, the rapid and sensitive detection of foodborne pathogens can be realized by combining the efficient recognition ability of CRISPR/Cas system and the simplicity of paper-based analytical devices. In this paper, we briefly introduce an overview of the CRISPR/Cas system for nucleic acid detection, and this section focuses on an overview of the features and principles of the class 2 system, including types II, V and VI, which uses a single effector. The application of CRISPR/Cas system based test paper analysis, lateral flow assay and microfluidic paper-based chips for the detection of foodborne pathogens are highlighted in the paper, and finally the advantages, current challenges and future prospects of CRISPR/Cas system in combination with paper-based analytical devices to establish detection methods are discussed.

**Key words** CRISPR/Cas, foodborne pathogen, paper-based analysis, rapid detection

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0365