

· 综 述 ·

基于 CRISPR 的快速灵敏便捷分子检测

孙雯君¹, 黄行许^{1,3*}, 王鑫杰^{2,3*}

1 上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210

2 中国农业科学院(深圳)农业基因组研究所 岭南现代农业科学与技术广东省实验室深圳分中心 农业农村部农业基因数据分析重点实验室, 广东 深圳 518120

3 广州生物岛实验室, 广东 广州 510030

孙雯君, 黄行许, 王鑫杰. 基于 CRISPR 的快速灵敏便捷分子检测[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 60-73.

SUN Wenjun, HUANG Xingxu, WANG Xinjie. CRISPR-based molecular diagnostics: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 60-73.

摘 要: 快速灵敏检测技术对疾病防控必不可少。特别是新冠疫情暴发以来, 人们深刻认识到快速灵敏检测技术的重要性。近年来, 以 CRISPR/Cas 为代表的基因编辑技术带来了生物技术革命性的进步。CRISPR 的核酸检测技术因其快速、准确、灵敏、经济等特点, 正在引发分子诊断革新, 并已被成功应用于传染病、遗传病、肿瘤基因突变诊断, 以及食品安全等领域。本文归纳了基于 CRISPR 的多种核酸检测体系及应用, 并对未来 CRISPR 核酸检测发展趋势及结合人工智能的智能检测进行了展望。

关键词: 分子诊断; 核酸检测; 临场检测; 基因编辑; CRISPR; CRISPR 检测

CRISPR-based molecular diagnostics: a review

SUN Wenjun¹, HUANG Xingxu^{1,3*}, WANG Xinjie^{2,3*}

1 School of Life Science and Technology, Shanghai Tech University, Shanghai 201210, China

2 Shenzhen Branch, Guangdong Laboratory of Lingnan Modern Agriculture, Genome Analysis Laboratory of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, Guangdong, China

3 Guangzhou Laboratory, Bio-Island, Guangzhou 510030, Guangdong, China

Abstract: Rapid and accurate detection technologies are crucial for disease prevention and control. In particular, the COVID-19 pandemic has posed a great threat to our society,

资助项目: 国家自然科学基金(82002144); 广州实验室应急攻关项目(EKPGL2021018); 上海市科委基金(21N31900400)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82002144), the Emergency Key Program of Guangzhou Laboratory (EKPGL2021018), and the Shanghai Municipal Science and Technology Commission (21N31900400).

*Corresponding authors. E-mail: HUANG Xingxu, huangxx@shanghaitech.edu.cn; WANG Xinjie, wangxinjie@caas.cn

Received: 2022-04-18; Accepted: 2022-08-02

highlighting the importance of rapid and highly sensitive detection techniques. In recent years, CRISPR/Cas-based gene editing technique has brought revolutionary advances in biotechnology. Due to its fast, accurate, sensitive, and cost-effective characteristics, the CRISPR-based nucleic acid detection technology is revolutionizing molecular diagnosis. CRISPR-based diagnostics has been applied in many fields, such as detection of infectious diseases, genetic diseases, cancer mutation, and food safety. This review summarized the advances in CRISPR-based nucleic acid detection systems and its applications. Perspectives on intelligent diagnostics with CRISPR-based nucleic acid detection and artificial intelligence were also provided.

Keywords: molecular detection; nucleic acid detection; point-of-care testing (POCT); gene editing; CRISPR; CRISPR-based detection

基于 CRISPR 蛋白特异性识别目标核酸或识别后激活旁路切割活性的特性, 科学家成功开发了包括 SHERLOCK、DETECTR 和 HOLMES 等一系列 CRISPR 核酸检测体系。CRISPR 检测具有快速、准确、灵敏、简便、经济等特点, 已被成功应用于病原微生物、遗传病、肿瘤基因突变、小分子等检测, 是理想的下一代快速灵敏核酸临场检测平台技术。快速便捷和智能化是临场核酸检测的痛点。开发基于 CRISPR 和 AI 的快速灵敏便捷核酸检测体系, 创制具有自主知识产权的基于 CRISPR 的智能核酸检测产品, 是领域未来发展的方向。快速灵敏诊断有着巨大社会需求, 特别是新冠疫情对人类社会造成巨大威胁, 使人们更加深刻认识到建立快速灵敏检测技术的重要性及必要性。而由于基因组学、转录组学、测序技术等的高速发展, 核酸诊断成为了快速灵敏诊断发展的主角。

近年来, 以 CRISPR/Cas 为代表的基因编辑带来了生物技术革命性的进步, 被认为是等同于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的革命性平台技术, 同 PCR 技术一样影响着生命医药的诸多方面, 并分别在 2015 和 2017 年两次被 *Science* 评为年度突破性科学进展之首, 获评 *Nature* 近 10 年最具影响力的五大科学事件之首和 2020 年诺贝尔化学奖。同时, 研究者开发出基于 CRISPR 的核酸检测技

术, 其具备快速、准确、灵敏、经济等特点, 是理想的下一代快速灵敏核酸临场检测技术。该技术 2018 年被 *Science* 评为年度十大突破性科技进展之一, 被 *Nature* 列为 2022 年值得关注的 7 项技术之一。

1 基于 CRISPR 的核酸检测体系

目前, 基于 CRISPR 的核酸检测从原理上分为 2 种: (1) 利用 Cas9 等 Cas 蛋白高特异性识别并结合双链 DNA (double-strand DNA, dsDNA) 的特性; (2) 利用 Cas13、Cas12 等 Cas 蛋白特异性识别核酸后, 旁路切割活性激活, 非特异性切割单链 DNA (single-strand DNA, ssDNA) 或单链 RNA (single-strand RNA, ssRNA) 的特性(图 1)。在 Cas12 或 Cas13 核酸检测体系中, crRNA 和 Cas 蛋白复合体与靶标结合后(Cas12a 结合 dsDNA, Cas13a 结合 RNA), Cas 蛋白旁路切割活性被激活, 进而非特异性切割报告探针(Cas12a 切割 ssDNA, Cas13a 切割 ssRNA)。通过 FAM、生物素等报告探针标记荧光基团和 BHQ1 等淬灭基团, 检测结果被转化为可视化的荧光信号或试纸条条带。目前, 基于不同检测原理而开发的 CRISPR 核酸检测技术主要分为以下 2 类。

1.1 利用 Cas 蛋白家族高特异性识别 dsDNA 的检测技术

CRISPR 系统中的 II 型 Cas9 蛋白可以在 gRNA 的引导下特异性结合靶标 DNA, 研究者据此原理开发了一系列核酸检测方案。其中, NASBA-CRISPR 利用核酸序列等温扩增技术 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) 和 Cas9 特异性切割, 从而产生可被小型传感器监测或在试纸上显示出颜色变化的判读信号(图 1A)^[1]。该系统可以在单碱基水平区分美洲型和非洲型的寨卡病毒(zika virus, ZIKV)。CRISDA 检测利用 CRISPR-Cas9 特异性靶点切割介导的链位移扩增方法, 结合多肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA) 入侵介导的结果测量方法, 能够在复杂样本背景下检测 amol/L 级别灵敏度和单核苷酸特异性的 DNA 样品^[2]。

另外, 研究人员利用失活型变体蛋白 dCas9 能特异性识别但不切割靶核酸的特性也开发出一系列检测方案。其中, CRISPR-Chip 是一种利用 dCas9 和石墨烯的核酸检测芯片(图 1B)^[3]。将 dCas9-gRNA 复合物结合到具有超高导电特性的石墨烯芯片上, 利用 CRISPR 特异性结合靶标核酸的能力, 产生电信号差异。该体系可以实现 15 min 内检测到低至 1.7 fmol/L 的靶标 DNA, 并成功用于杜氏肌营养不良症(duchenne muscular dystrophy, DMD)患者 DNA 突变的检测。

1.2 利用 Cas 蛋白家族特异识别核酸后激活旁路切割活性的检测技术

CRISPR 系统中的 V 型 Cas12 蛋白, 在 crRNA 指导下能特异性识别切割 dsDNA, 并激活非特异性 ssDNA 反式切割活性。基于 Cas12a 的上述特性, 研究人员开发了多种快速准确的检测方法, 包括 DETECTR^[4]、HOLMES^[5]和 CDetection^[6]等, 适用于核酸样品检测, 并成功应用于临床标本中与癌症相

关的 16 型和 18 型 HPV 的鉴定、新冠病毒、流感病毒及非洲猪瘟病毒等的检测(图 1C)。其中, Cas12f (又称 Cas14)蛋白具有类似的靶向切割 ssDNA 后激发反式切割的特性, 有研究者基于该原理开发出无前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)限制的识别单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)的高特异性核酸检测方法, 称为 Cas14-DETECTR^[7]。

CRISPR 系统中的 VI 型 Cas13 蛋白在与 crRNA 结合后, 能特异性识别切割 RNA 序列, 激活非靶向 RNA 切割活性。基于 CRISPR-Cas13 上述特性, 研究者开发了一种快速准确的核酸检测方法 SHERLOCK^[8], 成为一种灵敏且特异的诊断平台(图 1D)。该平台可直接从尿液、唾液、血清、血浆和全血等体液中检测 ZIKV 以及登革热病毒(dengue virus, DENV), 还可以区分 4 种密切相关的 DENV 血清型及 ZIKV 分离株中的 SNPs。研究人员基于 Cas13 该特性还开发了针对新冠病毒、流感病毒等检测方案。

2 基于 CRISPR 的核酸检测技术的优势与改进

理想的分子检测应当具备以下特点: 灵敏、特异、快速、使用便捷、经济、无需大型设备和专业技术人员等。目前 PCR 是最常用的诊断方法, 具有高灵敏度和特异性, 但需要专业实验室、昂贵仪器和专业人员, 这限制了其部分应用。测序技术在核酸检测中变得越来越重要, 然而, 高复杂度、长时间和高成本等阻碍了其在快速临场感染诊断中的应用。基于等温扩增的核酸检测具备快速和便携式检测能力, 但其灵敏度和特异性仍存在不足^[9]。而基于 CRISPR 的核酸检测在灵敏度、特异性、检测时间、无需专业仪器设备和人员方面展示出部分优势(表 1)。

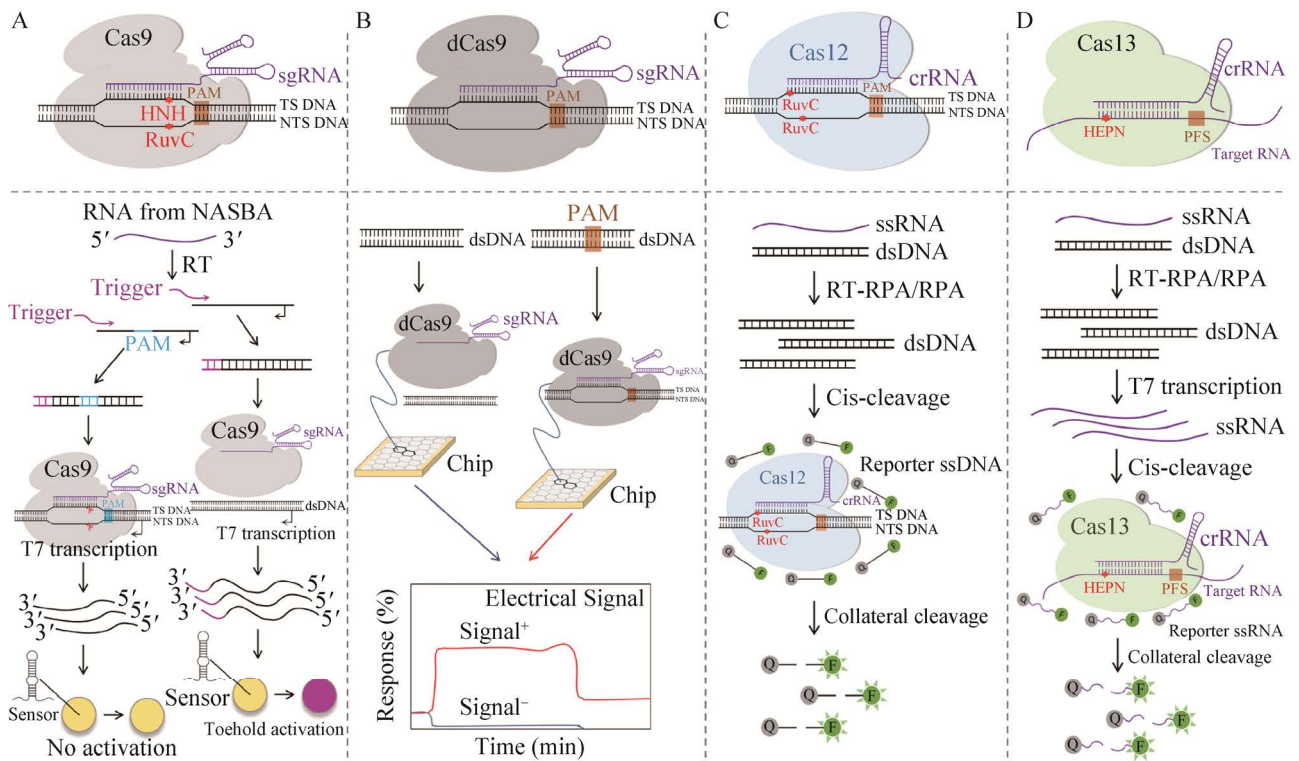


图 1 基于不同 CRISPR 蛋白开发的核酸检测技术

Figure 1 Four nucleic acid detection techniques based on different CRISPR proteins. A: In reverse transcription, a trigger (purplish red) attaches to sequence-specific primers. If the template contains a specific PAM sequence (blue), targeted cleavage induced by Cas9 will result in T7-transcribed truncated RNA which is unable to activate the toehold sensor. If the template does not have a specific PAM sequence, the full-length template with a trigger is transcribed to activate the toehold sensor and produces a visible color change^[1]. B: The dCas9-sgRNA complex is combined with a graphene chip with ultra-high electrical conductivity. A target sequence can be recognized and stably combined with the dCas9-sgRNA complex, resulting in a significant difference in electrical signals^[3]. C: Targeted DNA or RNA is amplified by RT-RPA or RPA, then binds to the Cas12-crRNA complex followed by cleavage, thereby activating the robust non-specific ssDNA cleavage activity of Cas12. Non-specific ssDNA is labeled with a fluorophore and quench agent at both ends, which produces fluorescence signal when cleaved^[4]. D: Targeted sequence is amplified by RT-RPA or RPA, then is transcribed to ssRNA. Targeted ssRNA specifically binds to the Cas13-crRNA complex followed by cleavage, activating the non-specific ssRNA cleavage activity of Cas13. The cleaved non-specific ssRNA produces fluorescence signals^[8].

表 1 基于 CRISPR 的分子检测技术与现行分子检测方法比较

Table 1 Comparison between CRISPR-based molecular detection and other methods

Characteristics	CRISPR/Cas	PCR/qPCR	Isothermal amplification	Sequencing
Specificity	High	High	Medium	Medium-high
Sensitivity	High	Medium	Low-medium	High
Detection time	15–50 min	1–3 h	15–50 min	1–15 d
Cost	Low	Low-medium	Low	High
Professional equipment	No	PCR/qPCR amplifier	No	Sequencer
Convenience	High	Low-medium	High	Low
Usability	Easy	Medium	Easy	Complex

CRISPR 系统的 RNA 引导 Cas 蛋白识别切割特定核酸序列的机制保证了其检测的特异性。Cas12 蛋白需要至少 17 bp 的匹配才能实现稳定地结合与切割, 相较于 Cas9 蛋白具有更高的特异性, 可实现单核苷酸检测精度^[10]。在灵敏检测方面, Cas12、Cas13 在特异识别目标核酸后激活旁路切割的特性, 实现了对检测信号的放大。这种旁路切割使大量的单链核酸被切割, 迅速转化为可视化的荧光信号或试纸条条带。为进一步增加 CRISPR 核酸检测技术的灵敏度, 有研究者将 Cas13 检测体系与 CRISPR III 型 RNA 核酸酶 Csm6 结合, Cas13 的旁路切割激活 Csm6, 进一步切割报告探针释放荧光, 从而级联增加信号^[11]。对靶核酸的预扩增进一步增加了灵敏度, 目前常使用的核酸等温扩增方式为重组酶聚合酶扩增(recombinant polymerase amplification, RPA)和环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等。反应缓冲液以及 crRNA 对 CRISPR 蛋白的靶向切割和旁路切割能力有着很大的影响。研究者通过对反应缓冲液的 Mg^{2+} 离子浓度^[4]、 Mn^{2+} 离子浓度^[12]、pH 值^[13-14]、添加剂(PEG、glycerin 和 Triton X-100; BSA 和 L-脯氨酸)^[15]等条件进行了优化, 进一步提升了检测灵敏度。另有研究者通过工程化改造 crRNA, 如在 5'端或 3'端延伸 UA 丰富的 RNA^[16-17]、在 3'端增加 TA 丰富的 DNA^[17]或对 crRNA 进行多项化学修饰^[16], 使检测灵敏度增加。将生物传感器与 CRISPR 检测相结合^[18-20], 也为大幅提升灵敏度提供了可能。近期有研究者开发出一种基于 Cas13a 的电化学传感器, 可实现无需核酸扩增的快速超敏 SARS-CoV-2 RNA 检测^[21]。他们将 ssRNA 的氧化还原探针固定在纳米复合材

料(nanocomposite, NC)和金纳米颗粒(gold nanoflower, AuNF)修饰的电极表面, 在 Cas13a 的旁路切割激活后, ssRNA 被切割释放氧化还原分子, 从而产生电流变化。该检测方法能够在无预扩增情况下实现 SARS-CoV-2 开放阅读框(open reading frame, ORF)和 S 基因 fg/mL 水平的定量检测。

临场检测(point of care testing, POCT)需要快速简便的样品预处理方式和可视化的读取方法。有研究者通过加热和化学还原使核酸酶和病毒失活, 实现对血液、唾液和尿液等临床样品的预处理^[22]。可视化的读取方法主要有荧光信号、颜色变化、免疫层析试纸条以及电化学信号等。荧光信号一般来自于 CRISPR 蛋白旁路切割释放荧光团, 可在蓝光照射下通过肉眼或便携式荧光阅读器来读取。有研究者将金纳米颗粒比色法与 CRISPR 检测法相结合, 当存在靶标时旁路切割使金纳米颗粒脱离, 溶液变为鲜艳的红色^[23-24]。免疫层析试纸条的原理主要为链霉亲和素与生物素的高亲和力。标记有荧光团 FAM 与生物素的报告探针与偶联金纳米颗粒的抗荧光素异硫氰酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)特异性抗体结合。当报告探针未被切割时, 生物素与链霉亲和素结合, 形成第一条色带; 当存在靶标 DNA 或 RNA 时, 旁路切割的激活使报告探针被切割, FAM 和偶联金纳米颗粒的 FITC 特异性抗体在条带上走得更远, 与物种特异性的二级抗体结合, 形成第二条色带^[11]。有研究者将电化学传感器与 CRISPR 检测法结合, 通过测定带有电化学标签的报告分子被切割后引起的电流变化达到检测核酸的目的^[18-21]。

在简便性方面, 研究者开发了多种一管闭管式 CRISPR 检测方案。STOPCovid 是一种基

于 SHERLOCK 的检测方法(SHERLOCK testing in one pot, STOP), 将病毒 RNA 的提取、等温扩增和 CRISPR 介导的检测整合到同一个体系中, 首次实现了对 SARS-COV-2 的快速、闭管式灵敏检测^[25]。但是该方法无法避免因检测反应中切割底物造成扩增不足, 导致灵敏度降低的问题。不少研究者针对该问题, 通过优化反应条件^[26]、筛选高效引物和荧光探针^[27-29]、选择次优 PAMs^[30]等方法使反应前期更倾向于扩增而非切割。这种一管闭管式 CRISPR 检测方案简化操作步骤, 且全程仅需恒温操作, 具有极高的简便性, 有利于其在现场检测的应用。另一种改进策略是将扩增体系与检测体系时空分离, 如在管底进行扩增, 反应后通过离心将管壁或管盖的检测体系与扩增产物混合^[31-33]; 还有通过动态多相水反应(dynamic aqueous multiphase reaction, DAMR)体系使底层的扩增产物向上逐级扩散从而激活检测反应^[34]。

发展至目前, 基于 CRISPR 的核酸检测技术具有以下优点: (1) 高特异性, 可实现单核苷酸点突变检测; (2) 高灵敏性, 可实现单拷贝核酸检测; (3) 快速性, 整个检测在 0.5–1.0 h 内完成; (4) 简便性, 不需专业设备及人员, 可现场完成; (5) 经济性, 单个检测成本低; (6) 易开发性, 可快速开发出新核酸检测试剂盒等^[35](表 2)。我们相信, 随着进一步的改进和优化, 其更具通用性, CRISPR 核酸检测技术将成为 POCT 的最优选。

3 CRISPR 核酸检测的应用

CRISPR 核酸检测展现出来的巨大前景, 引得业界高度关注。两家基于 CRISPR 的核酸检测公司——Mammoth Biosciences 和 SHERLOCK Biosciences 分别由业界的两位领袖科学家 DOUDNA Jennifer 和 ZHANG Feng 领衔成立。美国政府高度重视, 国防部威胁

表 2 已报道的多种基于 CRISPR 的分子检测技术比较

Table 2 Comparison of the reported CRISPR-based molecular detection technology

Platform	Effector	Amplification	Readout	LOD	Time	Reference
NASBA-CRISPR	Cas9	NASBA	Colometry	fmol/L	~3 h	[1]
CRISDA	Cas9	SDA	Fluorescence	amol/L	~2 h	[2]
CRISPR-Chip	dCas9		Electrochemical	fmol/L	15 min	[3]
DETECTR	Cas12a	RPA	Fluorescence	amol/L	2 h	[4]
Cas14-DETECTR	Cas14	PCR	Fluorescence	amol/L	2 h	[7]
HOLMES	Cas12a	PCR	Fluorescence	amol/L	~1 h	[5]
HOLMES v2	Cas12b	LAMP	Fluorescence	amol/L	~1 h	[13]
CDetection	Cas12b	RPA	Fluorescence	amol/L	~3 h	[6]
E-CRISPR	Cas12a		Electrochemical	pmol/L	~3 h	[18]
MeCas12a	Cas12a	RAA	Fluorescence	zmol/L	45 min	[12]
SCAN	Cas12a	PCR	Electrochemical	amol/L	~1 h	[20]
SHERLOCK	Cas13a	RPA	Fluorescence	amol/L	~2 h	[8]
SHERLOCK v2	Cas13b	RPA	Fluorescence	zmol/L	1–3 h	[11]
HUDSON+SHERLOCK	Cas13a	RPA	Fluorescence	amol/L	<2 h	[22]
STOPCovid v2	Cas12b	LAMP	Fluorescence	amol/L	~1 h	[25]
CARMEN	Cas13	RPA	Fluorescence	amol/L	~2 h	[36]

降低局(U.S. Defense Threat Reduction Agency, DTRA)聚焦 CRISPR 核酸检测技术创新开发, 于 2019 年 9 月与 SHERLOCK Biosciences 签约开发超快超敏诊断; 美国国防高级研究计划局(Defense Advanced Research Projects Agency, DARPA)聚焦技术能力储备, 于 2019 年 12 月与 Mammoth Biosciences 签约启动基因编辑检测计划, 拟投入 3 670 万美元开发已知的 50 000 种病毒、细菌和寄生虫的快速监测平台。CRISPR 核酸检测的技术特点使得其被快速开发和推广。

3.1 病原微生物检测

应用 CRISPR 核酸检测技术进行病原微生物的检测对于传染病的临检具有重要意义。基于 Cas9、Cas12a 和 Cas13a 的病原微生物检测发展非常快。

近年来, 登革热病毒(dengue virus, DENV)和寨卡病毒(zika virus, ZIKV)等传染性病毒在部分国家流行传播并导致人员死亡, 引起社会恐慌和经济损失。为开发能在非洲等部分欠发达地区快速进行的传染性病毒检测方案, 科学家们利用基于 CRISPR 的核酸检测进行了一系列尝试。利用 Cas9 核酸酶, 研究者通过 NASBA 扩增 ZIKV 的 RNA 后应用 CRISPR/Cas9 对扩增的病毒核酸进行切割, 通过触点开关传感器进行检测, 最终结果以显色的方式在试纸上读取, 该系统能够在单碱基水平分辨 ZIKV 的美洲及非洲毒株^[1]。有研究团队开发了基于 Cas13a 的 SHERLOCK 核酸检测技术, 能够实现在没有专业仪器设备的条件下直接从病人样本中对 DENV 与 ZIKV 进行快速检测。基于 SHERLOCK 的 HUDSON 方案可以在 2 h 内直接从患者血清、尿液和唾液等样本中检测出 DENV 和 ZIKV, 且可在胶体金试纸条上实现结果判定^[22]。SHERLOCKv2^[11]可以实

现对 DENV 或 ZIKV 以及患者液体活检样本的突变检测。发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus, SFTSV)作为一种症状严重的新型布尼亚病毒, 也可以被基于 RPA 扩增与 Cas12a 反式切割的检测系统灵敏诊断^[37]。

针对人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的快速检测及亚型区分这一问题, 有研究团队利用 Cas9 对靶标 DNA 的特异切割作用和 PCR 技术, 开发 CARP 和 ctPCR 检测策略。这些方法能够方便、特异、高效地检测人乳头瘤病毒不同亚型(HPV16 和 HPV18)^[38-40]。另有研究者基于 Cas12a 开发了 DETECTR、HOLMES 和 CDetection 核酸检测技术, 分别用于检测人乳头瘤病毒并进行基因分型^[4-6]。

针对病毒的高通量检测问题, 研究人员开发了基于 SHERLOCK 的 CRISPR 分子诊断微流控芯片检测方案^[36]。该技术方案可以一次针对一种病毒检测 1 000 多个样本, 或一次针对一个样本中多达 169 种病毒进行检测, 提供高通量检测或多重感染分析。首先从样品中提取核酸并进行扩增, 再将独特的荧光染料添加至样品中, 并将混合物分成仅有纳升的微小液滴。同时, 将含有 CRISPR-Cas13、crRNA 和报告 RNA 的混合物, 用荧光标定、编码, 并分成微小液滴, 与标定好的样本在芯片上的小孔中混合。CRISPR-Cas13 在 crRNA 的引导下识别并与其靶标(如特定的核酸序列)结合, 其旁路切割活性被激活, 切割报告 RNA, 进而释放特异荧光信号。这一体系能够提供高通量检测或多重感染分析。

新型冠状病毒肺炎疫情给世界公共健康带来了巨大威胁, 研究者利用 CRISPR 核酸检测的优势, 开发了一系列针对新型冠状病毒 SARS-COV-2 的快速检测方案。基于

DETECTR 和免疫层析试纸的快速检测方法, 可从鼻咽拭子 RNA 提取液中快速(<40 min)、准确地检测 SARS-CoV-2^[41]。本研究团队利用 Cas12a 灵敏核酸检测平台, 快速开发了 SARS-CoV-2 的荧光可视检测方案 CRISPR/Cas12a-NER, 能实现简易、灵敏且特异性强的检测^[42]。在 CRISPR/Cas12a-NER 基础上, 本实验室进一步开发出灵敏度提升至单拷贝水平的锰离子增强型检测方案-MeCas12a^[12]及针对 SARS-CoV-2 突变毒株的精准检测方案 symRNA-Cas12a^[43]。基于 SARS-CoV-2 毒株变异迅速的情况, 近期不少研究团队运用基于 Cas12a 或 Cas13a 的荧光检测方法对 SARS-CoV-2 阳性临床样本进行检测, 可实现灵敏且特异的野生型 SARS-CoV-2 和多种主要变异型(alpha、beta、delta 和 omicron)区分^[44-46]。STOPCovid 实现了对 SARS-COV-2 的快速、闭管式灵敏检测^[25]。通过使用 crRNAs 靶向次优 PAMs 底物, 在等温扩增与切割同时进行的前期更倾向于扩增累积底物的方法, 进一步提升了一管法的灵敏度, 并在 15 min 内检测出 SARS-CoV-2^[30]。有研究团队开发出一种基于 CRISPR-Cas13a 的无需核酸预扩增的新冠病毒检测方法^[47]。该方法快速、灵敏, 能够在 30 min 内检测到约 100 拷贝/微升的病毒载量, 将结果输出到手机终端。由于结合了个人移动设备, 该检测方法有望实现 SARS-CoV-2 的快速、低成本、医疗点筛查。

3.2 遗传病检测

应用核酸检测进行特定基因位点及突变的识别, 对于遗传疾病的准确诊断和治疗至关重要。现有的核酸检测方案如基因测序、抗原抗体反应等耗时长、成本高, 基于 CRISPR 的核酸检测技术能够快速灵敏且高效特异地进行核酸检测。CRISPR-Chip 能够成功地检测 DMD

患者 DNA 样本中的基因突变^[3]。有研究者利用 Cas12a 的旁路切割活性结合 PCR 扩增, 开发了 HOLMES 核酸检测方案, 成功地对人基因组中的 SNP 以及痛风相关位点进行了检测^[5]。

3.3 肿瘤基因突变检测

肿瘤突变的早期检测能够确保及时诊断和治疗, 降低死亡率。现有的癌症检测技术如抗原抗体反应、基因测序、成像等在检测的特异性、灵敏度、检测成本和检测速度等方面存在缺陷。CRISPR 核酸检测技术因其高效、快速、灵敏、特异等优点在肿瘤突变检测中得到应用^[48]。SHERLOCK 可以在低等位基因情况下检测到 *EGFR* 基因的 L858R 和 *BRAF* 基因的 V600E 两种癌症突变游离 DNA (cell-free DNA, cfDNA), 并达到单碱基水平的灵敏性^[8]。增强版的 SHERLOCK v2^[11]可以检测到非小细胞肺癌患者的 *EGFR* 基因的 L858R 突变或 19 号外显子缺失。本实验室开发了 EasyCatch 技术平台, 该方案是一种基于 Cas12a 的超敏突变检测体系^[49], 该方案通过整合特异性酶切、等温扩增和 CRISPR 检测技术, 可实现高达 0.001%灵敏度的单碱基突变检测, 且准确、快速、简单, 在突变检测及癌症精准诊断方面有巨大应用前景。

3.4 小分子检测

基于 CRISPR 的生物传感器不仅可以用于核酸检测, 而且可以对非核酸靶标进行检测。研究者利用细菌变构转录因子对小分子和 dsDNA 的竞争性结合活性, 与 Cas12a 的 ssDNA 反式切割活性, 成功开发首个 Cas12a 检测小分子方法, 实现对尿酸和对羟基苯甲酸的纳摩尔浓度的灵敏快速检测^[50]。另有研究人员基于竞争性结合机制设计了 ATP 和 ssDNA 竞争性结合的 ATP 适配体, 当存在 ATP 竞争结合适配体时, ssDNA 脱落触发 Cas12a 反式

切割活性,该方法可实现在室温环境下 15 min 内对 ATP 和 Na^+ 离子进行检测^[51]。相似策略也被用于三聚氰胺的检测中^[52]。有研究团队开发了一种 CRISPR-Cas13a 的非核酸靶标检测方法^[53]。利用核糖开关或蛋白质通过特定的效应分子来调节转录,转录的特定 RNA 激活 CRISPR-Cas13a 的非特异性切割活性,通过检测荧光强度量化效应分子浓度,实现包括辅助因子、核苷酸、氨基酸代谢物、四环素和样品中的单原子离子等多种化合物的检测量化。近期有研究者开发出一种结合 DNAzyme 和 CRISPR 系统的高灵敏度铅检测方法,通过读取荧光信号可检测低至 0.48 nmol/L 的铅离子。铅离子 DNAzyme 由酶链(e链)和底物链(s链)组成,当识别铅离子时,s底物链可被e酶链切割,释放 ssDNA 序列。产生的 ssDNA 被 Cas 蛋白/gRNA 复合物特异性识别,进一步触发 Cas 蛋白的旁路切割效应,切割 ssDNA 报告基因产生荧光,进行结果判定^[54]。

3.5 食品病原微生物检测

病原微生物威胁全球食品安全,对食源性病毒快速、灵敏、准确检测是食品安全的关键。近年来,基于 CRISPR 的核酸检测也应用到了食品病原微生物检测。针对食品中大肠杆菌检测,有研究人员利用 Cas9 蛋白识别切割目标毒力基因,随后启动链替代扩增与滚环扩增进行信号放大,并结合金属-有机框架平台进行信号读取^[55],能实现矿泉水、牛奶、橙汁等食品中的大肠杆菌的有效检测。另有研究团队使用基于 LAMP 的 CRISPR/Cas12a 检测体系从新鲜莴苣中检测出低至 1.22 CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7^[56]。有研究团队整合 RPA 与 CRISPR-Cas12a 检测方法,开发了用于食物病原细菌、基因修饰作物、掺假肉等的 RPA-Cas12a-FS 检测系统,可在

45 min 内检测到最低 10 个拷贝的靶片段^[57]。RPA-Cas12a- μ PAD 是一种在基于微流控纸张的分析装置(microfluidic paper-based analytical devices, μ PAD)上实现 RPA 辅助的表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)信号 CRISPR/Cas12a 检测,可在牛奶和肉类样品中实现低至 3-4 CFU/mL 的鼠伤寒沙门氏菌检测^[58]。该方法依赖于 Cas12a 在识别靶向 DNA 后激活旁路切割能力,非特异性切割连接子 ssDNA,使连接子 ssDNA 无法与制备的分别包被 DNA1 和 DNA2 的 AuNS@4-MBA@Au@DNA 探针对杂交,从而在 μ PAD 上产生差异化结果。ICB-LAMP-CRISPR/Cas12a 是一种高效检测空肠弯曲杆菌的方法,先用免疫捕获磁珠(ICB)捕获空肠弯曲杆菌,加热释放细菌基因组 DNA 用于 LAMP 反应后进行基于 Cas12a 的检测反应,该方法可以在 70 min 内检测低至 8 CFU/mL 的空肠弯曲杆菌^[59]。研究者基于 CRISPR-Cas13a 也开发了多种类似检测方案。有研究团队结合 PCR 扩增与 CRISPR-Cas13a 开发了 CCB-Detection 方法,可在 4 h 内完成食品中低至 100 amol/L 的金黄色葡萄球菌污染的检测^[60]。APC-Cas 是另一种基于 CRISPR-Cas13a 的检测系统,能够在不提取细菌基因组的条件下对牛奶等样品中低至 1 CFU/mL 的肠炎沙门氏菌进行核酸检测^[61]。还有研究者通过向 CRISPR-Cas13a 系统中引入发光 RNA 适配体,开发了一种无需扩增、无需转录、无需标记的细菌检测方案,能够快速检测并定量食物中枯草芽孢杆菌活菌^[62]。

综上所述,基于 CRISPR 的核酸检测技术可以开发为适用于各种场景(如无电源和特殊仪器等)和实时动态(如检测靶标实时监测和疗效追踪评估等)检测的新型技术,是现有 PCR 核酸检测技术的重要补充,将极大地拓展核酸

检测的适用性、应用领域及场景。

4 展望

CRISPR 的核酸检测能够在等温条件下完成高效特异检测, 可以克服 POCT 设备在分子检测中复杂温度控制的一些关键限制, 其性能可与基于 PCR 的技术相媲美。随着新型 CRISPR-Cas 蛋白的发现和原有系统的不断改进, 将会为生物分子检测提供更多的可能性。我们相信, 基于 CRISPR 的分子检测与最新的传感器技术相结合, 将会革命性地改变 POCT 分子诊断市场, 开发出更灵敏、更特异、更易用、更高通量、更快速、更智能、更高效的分子检测技术。不过目前基于 CRISPR 的核酸检测尚处于早期研发阶段, 目前亟需聚焦解决的重大技术问题包括: (1) 单分子水平核酸灵敏准确检测; (2) 单分子水平核酸修饰准确检测; (3) 核酸检测的常温存储运输及使用; (4) 微量样品多指标的高通量检测; (5) 超短时间内精准检测; (6) 检测结果数字化及与物联网互通等。相信随着各方面技术的不断发展, 基于 CRISPR 的分子检测技术可实现在任何时间与任何地点的高通量快速灵敏检测。

人工智能(artificial intelligence, AI)的快速发展及其在生物医药研发中的广泛应用, 使得我们有望把 AI 和 CRISPR 技术融合, 建立基于 AI 和 CRISPR 的核酸便捷检测产品平台, 包括: (1) 建立基于 AI 的 CRISPR 检测的智慧产品设计体系。高度的检测靶标或病原异质性使得诊断的合理设计及其输出分析变得极其困难。通过 AI 赋能 CRISPR 产品设计, 实现对检测疾病或病原的全信息分析, 筛选预测最佳的检测靶点、高效特异 crRNA、高效扩增引物等, 将提高 CRISPR 产品设计精度, 并缩短设计时间等, 实现对包括血液、尿

液、汗液、唾液和呼吸道等样本中的有效检测。ADAPT (activity-informed design with all-inclusive patrolling of targets) 是目前已开发的一项基于 AI 和 CRISPR 的病毒检测技术, 可通过机器深度学习在 2 h 内实现高通量的 CRISPR-Cas13a 检测组分最优化设计^[63]。(2) 建立基于 AI 的 CRISPR 检测分析判读系统, 进一步提高检测性能并消除与操作员对结果的解释相关的任何主观性。研发出一种 CRISPR 智能诊断设备, 整合自动图像采集和算法处理, 并通过 AI 处理整理后的数据, 以进一步减少分析运行时间和 CRISPR 检测的主观性, 并形成数字化结果。(3) CRISPR 检测的智能预警。可实现实时准确的诊断数据更新, 通过大数据的 AI 驱动的机器学习将更准确地警告风险并提供疫病对策建议, 从而便于个人的健康管理及大数据化的疾病科学研究。目前基于 AI 与 CRISPR 的检测平台发展还处于起步阶段, 可以预见, 通过 AI 与 CRISPR 检测结合使用, 将开发出快速、准确和智慧的检测系统。

REFERENCES

- [1] 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[J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [2] ZHOU WH, HU L, YING LM, ZHAO Z, CHU PK, YU XF. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5012.
- [3] HAJIAN R, BALDERSTON S, TRAN T, DEBOER T, ETIENNE J, SANDHU M, WAUFORD NA, CHUNG JY, NOKES J, ATHAIYA M, PAREDES J, PEYTAVI R, GOLDSMITH B, MURTHY N, CONBOY IM, ARAN K. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect

- transistor[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2019, 3(6): 427-437.
- [4] 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[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [5] LI SY, CHENG QX, WANG JM, LI XY, ZHANG ZL, GAO S, CAO RB, ZHAO GP, WANG J. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discovery*, 2018, 4: 20.
- [6] 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[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 132.
- [7] 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[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [8] 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[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [9] ZHAO YX, CHEN F, LI Q, WANG LH, FAN CH. Isothermal amplification of nucleic acids[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(22): 12491-12545.
- [10] SINGH D, MALLON J, PODDAR A, WANG YB, TIPPANA R, YANG O, BAILEY S, HA T. Real-time observation of DNA target interrogation and product release by the RNA-guided endonuclease CRISPR Cpf1 (Cas12a)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(21): 5444-5449.
- [11] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, KELLNER MJ, JOUNG J, COLLINS JJ, ZHANG F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [12] MA PX, MENG QZ, SUN BQ, ZHAO B, DANG L, ZHONG MT, LIU SY, XU HT, MEI H, LIU J, CHI T, YANG G, LIU M, HUANG XX, WANG XJ. MeCas12a, a highly sensitive and specific system for COVID-19 detection[J]. *Advanced Science: Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany*, 2020, 7(20): 2001300.
- [13] 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[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2228-2237.
- [14] YUE HH, SHU BW, TIAN T, XIONG EH, HUANG MQ, ZHU DB, SUN J, LIU Q, WANG SC, LI YR, ZHOU XM. Droplet Cas12a assay enables DNA quantification from unamplified samples at the single-molecule level[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(11): 4643-4653.
- [15] LI ZH, ZHAO WC, MA SX, LI ZX, YAO YJ, FEI T. A chemical-enhanced system for CRISPR-Based nucleic acid detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 192: 113493.
- [16] OOI KH, LIU MM, TAY JWD, TEO SY, KAEWSAPSAK P, JIN SY, LEE CK, HOU JW, MAURER-STROH S, LIN WS, YAN B, YAN G, GAO YG, TAN MH. An engineered CRISPR-Cas12a variant and DNA-RNA hybrid guides enable robust and rapid COVID-19 testing[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1739.
- [17] NGUYEN LT, SMITH BM, JAIN PK. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4906.
- [18] 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[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2019, 58(48): 17399-17405.
- [19] SETHI K, DAILEY GP, ZAHID OK, TAYLOR EW, RUZICKA JA, HALL AR. Direct detection of conserved viral sequences and other nucleic acid motifs with solid-state nanopores[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(5): 8474-8483.
- [20] NOURI R, JIANG YQ, TANG ZF, LIAN XL, GUAN WH. Detection of SARS-CoV-2 with solid-state CRISPR-Cas12a-assisted nanopores[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(19): 8393-8400.

- [21] HEO W, LEE K, PARK S, HYUN KA, JUNG HI. Electrochemical biosensor for nucleic acid amplification-free and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA via CRISPR/Cas13a trans-cleavage reaction[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 201: 113960.
- [22] 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, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [23] JIANG YZ, HU ML, LIU AN, LIN Y, LIU LL, YU B, ZHOU XM, PANG DW. Detection of SARS-CoV-2 by CRISPR/Cas12a-enhanced colorimetry[J]. *ACS Sensors*, 2021, 6(3): 1086-1093.
- [24] HU ML, YUAN CQ, TIAN T, WANG XS, SUN J, XIONG EH, ZHOU XM. Single-step, salt-aging-free, and thiol-free freezing construction of AuNP-based bioprobes for advancing CRISPR-based diagnostics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(16): 7506-7513.
- [25] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, KIM NG, WOOLLEY AE, SEGEL M, BARRETTO RPJ, RANU A, MACRAE RK, FAURE G, IOANNIDI EI, KRAJESKI RN, BRUNEAU R, HUANG ML W, YU XG, LI JZ, WALKER BD, HUNG DT, GRENINGER AL, JEROME KR, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [26] CHEN Y, MEI YX, ZHAO XH, JIANG XY. Reagents-loaded, automated assay that integrates recombinase-aided amplification and Cas12a nucleic acid detection for a point-of-care test[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(21): 14846-14852.
- [27] FENG W, PENG HY, XU JY, LIU YM, PABBARAJU K, TIPPLES G, JOYCE MA, SAFFRAN HA, TYRRELL DL, BABIUK S, ZHANG HQ, LE XC. Integrating reverse transcription recombinase polymerase amplification with CRISPR technology for the one-tube assay of RNA[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(37): 12808-12816.
- [28] de PUIG H, LEE RA, NAJJAR D, TAN X, SOEKENSEN LR, ANGENENT-MARI NM, DONGHIA NM, WECKMAN NE, ORY A, NG CF, NGUYEN PQ, MAO AS, FERRANTE TC, LANSBERRY G, SALLUM H, NIEMI J, COLLINS JJ. Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants[J]. *Science Advances*, 2021, 7(32): eabh2944.
- [29] DING X, YIN K, LI ZY, LALLA RV, BALLESTEROS E, SFEIR MM, LIU CC. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4711.
- [30] LU SH, TONG XH, HAN Y, ZHANG K, ZHANG YZ, CHEN QB, DUAN JY, LEI XL, HUANG MH, QIU Y, ZHANG DY, ZHOU X, ZHANG Y, YIN H. Fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using suboptimal protospacer adjacent motifs for Cas12a[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(3): 286-297.
- [31] WU H, HE JS, ZHANG F, PING JF, WU J. Contamination-free visual detection of *CaMV35S* promoter amplicon using CRISPR/Cas12a coupled with a designed reaction vessel: rapid, specific and sensitive[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1096: 130-137.
- [32] 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[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 169: 112642.
- [33] 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[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(19): 12156-12161.
- [34] YIN K, DING X, LI ZY, ZHAO H, COOPER K, LIU CC. Dynamic aqueous multiphase reaction system for one-pot CRISPR-Cas12a-based ultrasensitive and quantitative molecular diagnosis[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(12): 8561-8568.
- [35] KAMINSKI MM, ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, ZHANG F, COLLINS JJ. CRISPR-based diagnostics[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021, 5(7): 643-656.
- [36] ACKERMAN CM, MYHRVOLD C, THAKKU SG,

- FREIJE CA, METSKY HC, YANG DK, YE SH, BOEHM CK, KOSOKO-THORODDSEN TS F, KEHE J, NGUYEN TG, CARTER A, KULESA A, BARNES JR, DUGAN VG, HUNG DT, BLAINEY PC, SABETI PC. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13[J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 277-282.
- [37] HUANG MQ, LIU SH, XU YN, LI AQ, WU W, LIANG MF, NIU GY, WANG ZY, WANG T. CRISPR/Cas12a technology combined with RPA for rapid and portable SFTSV detection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 754995.
- [38] ZHANG BB, XIA Q, WANG Q, XIA XY, WANG JK. Detecting and typing target DNA with a novel CRISPR-typing PCR (ctPCR) technique[J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 561/562: 37-46.
- [39] ZHANG BB, WANG Q, XU XH, XIA Q, LONG FF, LI WW, SHUI YC, XIA XY, WANG JK. Detection of target DNA with a novel Cas9/sgRNAs-associated reverse PCR (CARP) technique[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(12): 2889-2900.
- [40] WANG Q, ZHANG BB, XU XH, LONG FF, WANG JK. CRISPR-typing PCR (ctPCR), a new Cas9-based DNA detection method[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 14126.
- [41] BROUGHTON JP, DENG XD, YU GX, FASCHING CL, SERVELLITA V, SINGH J, MIAO X, STREITHORST JA, GRANADOS A, SOTOMAYOR-GONZALEZ A, ZORN K, GOPEZ A, HSU E, GU W, MILLER S, PAN CY, GUEVARA H, WADFORD DA, CHEN JS, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 870-874.
- [42] WANG XJ, ZHONG MT, LIU Y, MA PX, DANG L, MENG QZ, WAN WW, MA XD, LIU J, YANG G, YANG ZF, HUANG XX, LIU M. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER[J]. *Science Bulletin*, 2020, 65(17): 1436-1439.
- [43] MENG QZ, WANG XJ, WANG YQ, DANG L, LIU XY, MA XD, CHI T, WANG X, ZHAO Q, YANG G, LIU M, HUANG XX, MA PX. Detection of the SARS-CoV-2 D614G mutation using engineered Cas12a guide RNA[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(6): e2100040.
- [44] NIU MW, HAN Y, DONG X, YANG L, LI F, ZHANG YC, HU Q, XIA XS, LI H, SUN YS. Highly sensitive detection method for HV69-70del in SARS-CoV-2 alpha and *Omicron* variants based on CRISPR/Cas13a[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 831332.
- [45] LIANG YH, ZOU LR, LIN HQ, LI BS, ZHAO JH, WANG HY, SUN JF, CHEN JD, MO YL, YANG XF, DENG XL, TANG SX. Detection of major SARS-CoV-2 variants of concern in clinical samples via CRISPR-Cas12a-mediated mutation-specific assay[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(5): 1811-1823.
- [46] LIANG YH, LIN HQ, ZOU LR, DENG XL, TANG SX. Rapid detection and tracking of *Omicron* variant of SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas12a-based assay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 205: 114098.
- [47] 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, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy[J]. *Cell*, 2021, 184(2): 323-333.e9.
- [48] HUANG CH, LEE KC, DOUDNA JA. Applications of CRISPR-cas enzymes in cancer therapeutics and detection[J]. *Trends in Cancer*, 2018, 4(7): 499-512.
- [49] LIU Y, CHEN YL, DANG L, LIU YX, HUANG SS, WU SY, MA PX, JIANG HQ, LI Y, PAN YB, WEI YC, MA XD, LIU M, JI QJ, CHI T, HUANG XX, WANG XJ, ZHOU FL. EasyCatch, a convenient, sensitive and specific CRISPR detection system for cancer gene mutations[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 157.
- [50] LIANG MD, LI ZL, WANG WS, LIU JK, LIU LS, ZHU GL, KARTHIK L, WANG M, WANG KF, WANG Z, YU J, SHUAI YT, YU JM, ZHANG L, YANG ZH, LI C, ZHANG Q, SHI T, ZHOU LM, XIE F, et al. A CRISPR-Cas12a-derived biosensing platform for the highly sensitive detection of diverse small molecules[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3672.
- [51] XIONG Y, ZHANG JJ, YANG ZL, MOU QB, MA Y, XIONG YH, LU Y. Functional DNA regulated CRISPR-Cas12a sensors for point-of-care diagnostics of non-nucleic-acid targets[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(1): 207-213.
- [52] QIAO B, XU JK, YIN WH, XIN WM, MA LX, QIAO J, LIU Y. "Aptamer-locker" DNA coupling with CRISPR/Cas12a-guided biosensing for high-efficiency

- melamine analysis[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 183: 113233.
- [53] IWASAKI RS, BATEY RT. SPRINT: a Cas13a-based platform for detection of small molecules[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(17): e101.
- [54] CHEN YJ, WU H, QIAN S, YU XP, CHEN H, WU J. Applying CRISPR/Cas system as a signal enhancer for DNAzyme-based lead ion detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1192: 339356.
- [55] 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[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(4): 3032-3041.
- [56] LEE SY, OH SW. Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid, sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157: H7[J]. *Talanta*, 2022, 241: 123186.
- [57] LIU H, WANG JB, ZENG HJ, LIU XF, JIANG W, WANG Y, OUYANG WB, TANG XM. RPA-Cas12a-FS: a frontline nucleic acid rapid detection system for food safety based on CRISPR-Cas12a combined with recombinase polymerase amplification[J]. *Food Chemistry*, 2021, 334: 127608.
- [58] 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[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 207: 114167.
- [59] LI C, CHEN X, WEN RQ, MA P, GU K, LI C, ZHOU CY, LEI CW, TANG YZ, WANG HN. Immunocapture magnetic beads enhanced the LAMP-CRISPR/Cas12a method for the sensitive, specific, and visual detection of *Campylobacter jejuni*[J]. *Biosensors*, 2022, 12(3): 154.
- [60] 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[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1127: 225-233.
- [61] SHEN JJ, ZHOU XM, SHAN YY, YUE HH, HUANG R, HU JM, XING D. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 267.
- [62] ZHANG T, ZHOU WH, LIN XY, KHAN MR, DENG S, ZHOU M, HE GP, WU CY, DENG RJ, HE Q. Light-up RNA aptamer signaling-CRISPR-Cas13a-based mix-and-read assays for profiling viable pathogenic bacteria[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 176: 112906.
- [63] METSKY HC, WELCH NL, PILLAI PP, HARADHVALA NJ, RUMKER L, MANTENA S, ZHANG YB, YANG DK, ACKERMAN CM, WELLER J, BLAINEY PC, MYHRVOLD C, MITZENMACHER M, SABETI PC. Designing sensitive viral diagnostics with machine learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(7): 1123-1131.

(本文责编 陈宏宇)