新一代诊断技术:CRISPR 系统及其在分子诊断中的应用

孙秀兰，　付旭冉，　鲍　琦，　孙嘉笛
（江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122）

摘要：作为新兴的基因编辑和调控工具,CRISPR 系统具有高度的特异性、灵敏度和灵活性。除在基因编辑和改造方面有重要作用外,在传染病诊断、环境监测、食品安全检测等方面也有着良好的前景。随着 CRISPR/Cas 系统的深入研究,通过其高特异性识别目标序列和反式切割能力,已经建立了多种简便、灵敏的生物传感平台,解决了传统方法在操作、灵敏度、特异性及检测周期方面存在的不足。作者将主要介绍应用最广的两类 CRISPR/Cas 系统的特征和机制,总结了基于 CRISPR/Cas 系统开发的核酸、蛋白质和小分子物质构建的生物传感体系和未来发展方向。

关键词：CRISPR;分子诊断;基因编辑
中图分类号:TS 201.6　**文章编号**:1673-1689(2022)07-0057-14　**DOI**:10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.07.006

Next Generation Diagnostic Technology: CRISPR System and Its Application in Molecular Diagnostics

SUN Xiulan，　*FU Xuran*，　*BAO Qi*，　*SUN Jiadi*
（School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: As an emerging tool for gene editing and regulation, CRISPR system is characterized by its high specificity, sensitivity and flexibility. In addition to its important role in gene editing and modification, it also has a promising prospect in infectious disease diagnosis, environmental monitoring and food safety. With the intensive research of CRISPR/Cas system, a variety of simple and sensitive biosensing platforms have been established through its high specificity in identifying target sequences and trans-cleavage capabilities. The shortcomings of traditional methods in terms of operation, sensitivity, specificity and detection cycle have been addressed. In this review, we will focus on the features and mechanisms of the most widely used class 2 CRISPR/Cas systems and summarize CRISPR/Cas based biosensing strategies and future directions for nucleic acids, proteins and small molecules.

Keywords: CRISPR, molecular diagnostics, gene editing

收稿日期：2022-05-02
基金项目：国家自然科学基金项目(32125031)。
作者简介：孙秀兰(1976—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品安全与质量研究。E-mail:sxlzzz@jiangnan.edu.cn

分子诊断是通过核酸识别和基因编辑对遗传物质的变化做出诊断的技术[1],在生物医药、环境监测、食品安全防控等领域起着至关重要的作用[2]。目前,最常用的技术主要有两大类,第一类是以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)为代表的核酸检测技术,其常作为分子诊断的"金标准",具有高灵敏度和可靠性,但对设备条件要求高且具有环境依赖性,基于PCR方法建立的恒温扩增、基因测序、生物芯片等技术也得到了广泛应用,但这些方法依旧存在技术复杂、成本高、特异性差等问题。酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)因其快速和高特异性的优势,已经成为了蛋白质和小分子广泛应用的诊断工具,然而,样品前处理的复杂性以及较低的灵敏度限制了其在现场快速精准检测中的应用。

世界卫生组织(World Health Organization,WHO)发布了理想诊断产品的标准ASSURED[3],即为可负担(affordable)、灵敏(sentitive)、特异(specific)、用户友好(user-friendly)、快速而可靠(rapid and reliable)、免设备(equipment-free)且可交付给最终用户(deliverable to end users)[4]。CRISPR/Cas系统由于优异的生物传感性能逐渐成为下一代诊断技术的焦点,有望成为开发理想诊断产品的方法。基于CRISPR/Cas系统的特异性结合活性和高效反式切割能力,将其与电化学、荧光传感技术相结合,已经成功实现了各种靶标分子的高特异、高灵敏检测,检测对象也已经从最初的核酸扩展到金属离子、蛋白质、细菌、小分子等,说明了CRISPR/Cas系统在检测领域具有通用性。本文中作者重点介绍了两类CRISPR/Cas系统的特征和机制,并总结了基于CRISPR/Cas系统的各种新型生物传感器,列举了针对核酸靶标及蛋白质、生物小分子等非核酸靶标构建的CRISPR/Cas新型生物传感器,最后对该领域的发展提出了一些未来展望,以期为进一步开发新型分子诊断技术提供参考。

1 基因编辑及CRISPR/Cas系统概述

基因编辑是分子诊断技术的基础,目前基因编辑主要有三大利器:锌指核酸酶(zinc-finger nuclease,ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease,TALEN)和成簇规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR)与其蛋白质(CRISPR associated,Cas)共同组成的CRISPR/Cas系统[5]。ZFN是人工修饰的核酸酶,通常由两部分组成,一部分是能够实现特异性识别锌指(zinc-finger,ZF)的DNA结合域,一般包含3个ZF重复结构,每个ZF能识别3个碱基;另一部分是包含非特异性限制性核酸内切酶的DNA切割区域,对DNA进行特异性切割,形成双链断裂区,以非同源末端连接(non-homologous end joining,NHEJ)的方式使目的基因失活,或借助同源重组(homologous recombination,HR)方式黏合断裂的DNA,从而修复DNA。其主要应用于科研和医疗领域,如治疗杜氏肌营养不良症和21三体综合征等遗传疾病[6]。

TALEN最初来源于黄单胞菌,完整的TALEN由包含定位信号的N结构域、可识别特定靶DNA的TALE重复序列以及FoKI核酸内切酶组成。天然TALEN元件识别的序列长度为17~18 bp[7],主要是通过将TALEN靶向并结合DNA位点,在FoKI核酸内切酶的作用下实现对特定点位的剪切。TALEN技术目前已在全球范围内广泛用于靶向基因编辑,在医疗和动植物育种领域有广泛应用前景。

上述两种酶的作用机制都是通过对双链DNA(double stranded DNA,dsDNA)进行识别和切割,激活细胞的非同源末端修复或者同源重组修复,依赖于DNA序列与蛋白质的特异性结合,而这一步骤非常的费时且烦琐,具有很强的设备依赖性。CRISPR/Cas系统通过特异性向导RNA(guide RNA,gRNA)指导核酸内切酶结合靶点,从而实现更简单高效的基因编辑。不同种类的酶对应的靶点类型不同,包括dsDNA、单链DNA(single stranded DNA,ssDNA)和RNA等。与其他两种基因编辑系统相比,CRISPR/Cas系统具有显著优势[8]:1)载体构建简单且靶向效率高,只需要构建一个具有几十个碱基的CRISPR sgRNA即可与DNA序列进行匹配,从而介导Cas效应子对DNA序列进行切割;2)CRISPR/Cas系统可编辑的位点分布频率较高,易选择合适的位点进行基因编辑;3)CRISPR/Cas系统可同时对基因组进行多位点编辑。

简而言之,TALEN和ZFN虽然精确度高和可控性强,但CRISPR/Cas系统因操作简单和功能强大,在分子诊断及生物传感领域,尤其是现场即时

检测(point-of-care testing,POCT)领域有着更为巨大的潜力,三者的对比见表 1[9]。

表 1 3 种常见基因编辑技术的特点及比较

Table 1 Characteristics and comparison of three common gene editing technologies

类别	来源	靶点 DNA 识别区域	剪切区域	识别长度	最小模块识别碱基量	细胞毒性	切割类型	体内递送	优点	缺点
ZFN	真核转录因子	锌指结构域	FoKI 核酸内切酶结合域	(8~32 bp)×2*	1	大	双链断裂、同源重组	较为容易	ZF 设计简单,特异性强,平台较为成熟	细胞毒性强、模块组装较为烦琐
TALEN	黄单胞菌	TAL 蛋白结构域	FoKI 核酸内切酶结合域	(9 或 20 bp)×2*	3	较小	双链断裂、同源重组	困难	效率高于被动同源重组,可实现大规模构建	具有细胞毒性,设计依赖上下游序列,易脱靶
CRISPR/Cas	原核生物	gRNA	Cas 蛋白结合域	PAM 位点和(20~23 bp)	1	小	双链、单链断裂,非限制性切割	中等	靶向精确,效率高,细胞毒性低	靶序列前必须有 PAM 识别区域,特异性较弱

注:* 代表有 2 个目标 DNA 结合域。

2 CRISPR 系统的分类及特点

CRISPR/Cas 系统依据 Cas 效应子的不同可以分为 6 大类和 32 个亚型。1 类 CRISPR 系统主要通过多个蛋白质协同作用来激活切割活性,包括Ⅰ型、Ⅲ型和Ⅳ型,效率较低且操作复杂,研究和应用较少;2 类 CRISPR 系统的 Cas 效应蛋白通常只有一个蛋白质,包括Ⅱ型、Ⅴ型和Ⅵ型[10]。2 类 CRISPR 系统作用机制主要包括 3 个阶段:第一个阶段是识别可变间隔区,当识别到外来物质时,前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif,PAM)识别外源 DNA 片段并整合到宿主 CRISPR 基因的两个重复序列之间,作为间隔序列[11];第二阶段是 Cas 酶结合 gRNA 形成二元复合物,从而将 gRNA 中的 CRISPR 引导至 DNA 分子上的前间隔序列;第三阶段是 gRNA 与前间隔序列配对形成 Cas-gRNA-PAM 三元复合物[12],特异性识别外源核酸片段,Cas 酶被激活,顺式切割外源核酸片段。由于 2 类 CRISPR 系统只需要一个效应蛋白就可以实现对靶核酸位点的切割,操作简单、靶向精确,逐渐成为分子诊断领域的热点,已发现的 2 类 CRISPR 系统效应蛋白 Cas9、Cas12、Cas13 和 Cas14 都有了广泛应用,且具有不同特点,其主要区别见表 2。

表 2 2 类 CRISPR 系统中主要 Cas 效应蛋白比较

Table 2 Comparison of major Cas effector proteins in class 2 CRISPR system

Cas 类型	靶标类型	识别区域	PAM 位点	间隔区长度/nt	gRNA
Cas9	dsDNA	HNH 和 RuvC	3′-NCC-5′/5′-NGG-3′	20	tracrRNA 和 crRNA
Cas12a	dsDNA/ssDNA	RuvC	3′-AAAN-5′/5′-TTTN-3′	20/23	crRNA
Cas13a	ssRNA	HEPN	5′-A/U/C-3′	28	crRNA
Cas14	ssDNA	RuvC	无需求	20	tracrRNA 和 crRNA

2.1 Cas9

Cas9 是一种双 gRNA 的 II 型 Cas 效应子,其 gRNA 包含一个 crRNA 和一个 tracrRNA。crRNA 的 3′端与 tracrRNA 配对,crRNA 的 5′端是游离的靶标序列[13]。当外源 dsDNA 片段进入时,Cas9 结合 tracrRNA 形成复合体,然后将 crRNA 引导至其与靶标序列的前间隔序列结合,而这个结合取决于前间隔序列和 PAM。与其他 II 型 CRISPR 系统不同。Cas9 中有两部分起识别作用的结构域,分别是 HNH 结构域和 RuvC 结构域[14]。以含有 PAM 序列的 dsDNA 作为催化底物,在 gRNA 的指导下,以 PAM 位点介导,使得 Cas9 的 HNH 结构域和 RuvC 结构

域分别切割靶标链和非靶标链（与靶标链互补的链），从而对目的基因进行编辑[1,15]。

2.2 Cas12

Cas12 和 Cas9 结构和功能相似，Cas9 和 Cas12b 的 gRNA 包括 crRNA 和 tracrRNA[16]，而 Cas12a 的 gRNA 只包括 crRNA，且只包含 RuvC 单个核酸内切酶结构域。Cas12a 在 crRNA 介导下特异性识别靶 DNA 序列，结合后触发 Cas12a 的构象变化，导致 RuvC 的活性位点暴露，特异性识别靶标 dsDNA，激活其特异性顺式切割活性和非特异性反式切割活性[17]，形成黏性末端并非特异性反式切割任意ssDNA[18]。Cas12 中完整的 crRNA 长度一般为 42~44 nt[16]，一般包含 19 nt 的重复序列和 23~25 nt 的间隔区，其中第 19 个 U 碱基是严格保守的[15]。

2.3 Cas13a

与 2 类中的其他 Cas 效应子相比，Cas13a 对单链 RNA（single stranded RNA，ssRNA）具有顺式和反式切割活性[19]。Cas13a 含有两个 HEPN 结构域，在 crRNA 的引导下，特异性切割带有互补间隔序列的 ssRNA。当 Cas13a 结合到 ssRNA 靶标后，Cas13a 蛋白被激活并转化为非特异性内切酶，对附近的非靶标 ssRNA 具有反式切割活性。Cas13a 的前间隔序列一般为 20 nt[20]，一般没有特定的切割位点，但显示出对 U 碱基的切割偏好。

2.4 Cas14

相较于其他典型的 2 类蛋白，Cas14 效应子相对分子质量较小，只有大约 400~700 个氨基酸，包含一个与 Cas12a 类似的 RuvC 区域[21]，通过与 crRNA 和 tracrRNA 结合切割靶标 DNA。在体外检测中，Cas14 只能识别和切割 ssDNA，但其核酸内切酶活性的激发不需要依赖于 PAM 序列[22]，此外，Cas14在与靶序列结合后也可非特异切割任意 ssDNA。

Cas 效应子可以特异性结合靶核酸，以 20~30 nt 的 gRNA 为“向导者”。而 PAM 序列识别是 Cas 效应子检测 dsDNA 目标的先决条件[19,23-24]，与 gRNA 互补的 ssDNA 也可以被 Cas12a 切割，并且以不依赖于 PAM 序列的方式激活 Cas12a 的反式切割活性[12]。对于 ssRNA 检测，则需要一个 3′PFS（非 G，相当于 PAM 序列）来激活 Cas13a 的切割活性[13,25]。对于 Cas9、dCas9 和 Cas12 来说，gRNA 和靶标核酸的复合物对PAM 序列附近的 10 个碱基对非常敏感[19,24,26-27]，而 Cas13a 则对中心碱基对敏感[13,28]。当碱基对错配发生在中心碱基（即为敏感区域）时，Cas 效应子的切割效率会显著降低，从而可以用于进行单碱基错配检测。

3 CRISPR 传感技术在分子诊断中的应用

在分子诊断方面，Cas 效应子的切割活性（包括顺式切割和反式切割）引起了广泛关注与研究，尤其是 Cas 效应子的反式切割活性[12,29-31]。报告分子被 Cas 效应子切割后，检测体系将发生显著的信号变化（如电化学或者光学信号）。基于此，CRISPR/Cas 系统成功实现了对包括核酸靶标和非核酸靶标在内的多种生物分子的检测。各种基于 CRISPR/Cas 生物传感系统的总结如图 1 所示。

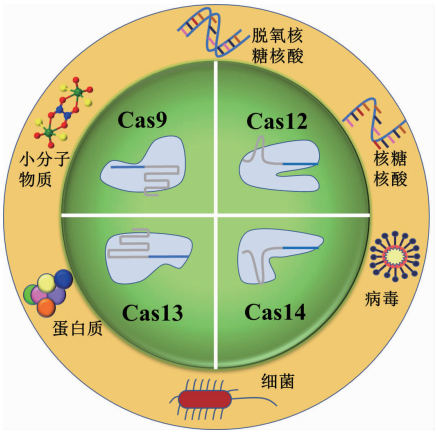


图 1 基于 CRISPR/Cas 的生物传感系统示意图

Fig. 1 Schematic representation of CRISPR/Cas-based systems for biosensing

3.1 脱氧核糖核酸检测

单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）与全基因组关联鉴定的复杂性状和疾病相关，是人类基因组中最常见的变异之一[32]。Li 等建立了基于 LbCas12a 的低成本高效检测系统，被称为一种单小时低成本多用途高效体系（an one-hour low-cost multipurpose highly efficient system，HOLMES）用于检测人类 SNP。该体系通过 PCR 扩增靶 DNA，并通过设计的引物引入 PAM 序列，得到的 dsDNA 产物会与Cas12a-crRNA 组装形成三元复合物，切割标记有荧光基团和猝灭剂的 ssDNA 探针，从而导致荧光基团与猝灭剂分离，并产生显著增加的荧光信号。HOLMES 可以快速精准地检测人类 SNP，并高特异性区分纯合和杂合基因型[18]。Li 等为了简化操作程序，还构建了基于AsCas12b 的

HOLMESv2 系统，实现了对 SNP 和 DNA 甲基化的一步核酸检测[20]。

人乳头瘤病毒（human papillomavirus,HPV)是一种 dsDNA 病毒，与多种恶性肿瘤和癌症有关[33]。70%的宫颈癌由 HPV16 和 HPV 18 引起[34]。目前市售 DNA 试剂盒不能有效地识别所有致癌的人乳头瘤病毒类型。Chen 等建立了基于 Cas12a 的DNA 内切酶靶向 CRISPR 反式切割报告方法（DNA endonuclease -targeted CRISPR transreporter,DETECTR),该方法以 LbCas12a 为效应蛋白,采用 RPA 等温扩增构建了通用型检测平台。RPA 的优势在于可在 37 ℃的条件下快速进行指数扩增，减少了对设备的依赖性。该检测平台可以准确地区分 HPV16 和 HPV18,灵敏度可以达到 amol/L 级别。此外该平台还可以用于检测环境 DNA,可成功区分出 *Salmo salar* 和 *Salmo trutta* 线粒体基因重组质粒,基因组检测的灵敏度为 1×10^{-5} ng/μL[12]。Harrington 等基于 Cas14 相关特性,构建了 Cas14-DETECTR。因 Cas14 靶向 ssDNA,为扩增产生 ssDNA,在扩增时,将一条引物进行硫代磷酸酯修饰，扩增完成后,未被硫代磷酸酯修饰的链会被 T7 核酸酶降解，只保留 ssDNA 靶序列[30]。Cas14 具有更高的特异性和更低的脱靶率，且可以识别没有 PAM 序列的外源 DNA,被广泛应用于 SNP 检测,例如,目前 Cas14 已被成功用于眼球颜色相关基因 *HERC2* 的 SNP 检测[35]。

非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)是一种大型有包膜的 dsDNA 病毒[36],会导致非洲猪瘟病(African swine fever,ASF)。ASF 是一种严重的出血性急性传染病，在家猪和野猪中死亡率接近 100%。Wang 等开发了一种 CRISPR/Cas9 介导的侧向流动核酸测定法（CRISPR/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay,CASLFA)检测 ASFV。通过重新设计 sgRNA 并引入额外的茎环,以实现金纳米粒子(gold nanoparticles,AuNPs)-DNA 探针的结合。靶 DNA 在 PCR 或 RPA 扩增过程中首先被生物素化并与 Cas9-sgRNA 二元复合物预孵育。当检测液添加到横向流动试纸条后，所得产物与 AuNPs-DNA 探针杂交,在结合垫上形成生物素化的扩增子 Cas9-sgRNA-AuNPs-DNA 复合物,该复合物被预先包被的链霉亲和素捕获。当有 ASFV 存在时,金纳米粒子便会在检测线上聚集,该方法在 40 min 内可以完成检测，检出限为 4 copies/mL，与 PCR 检测 ASFV 的准确度相当，说明 CRISPR/Cas9 在现场即时检测中具有极强的潜力[37]。为了进一步提高灵敏度,Wang 等研究了一种 CRISPR/Cas12a 横向流动检测方案。扩增的 ASFV 激活 Cas12a 以切割标有地高辛和生物素的 ssDNA 报告基因。地高辛标记的 ssDNA 可以与样品垫上的 AuNPs-地高辛抗体复合物结合，总检测时间为 60 min，可检测低至 0.4 copies/mL 的靶 DNA[38]。Fu 等将基于 Cas12a、RPA 和荧光团猝灭剂(FQ)标记的ssDNA 相结合,用于快速可视化检测 AFSV。基于 Cas12a 设计的 5 种 crRNAs 均显示出显著荧光强度的特异性。在 20 min 内,2 copies DNA 的初始浓度下,在实验组和阴性组之间产生显著差异,该方法具有较高灵敏度且反应时间短[39]。

食品安全问题与人们身体健康息息相关,为有效防控食品安全风险,开发特异、灵敏、快速的食源性致病菌、转基因作物和肉类掺假的核酸检测技术势在必行。Liu 等利用 Cas12a 的非特异性 ssDNA 切割特性,结合 RPA 设计了一种食品安全通用检测平台,称为 RPA-Cas12a-FS[40]。*CaMV35S* 启动子广泛用于转基因作物,如转基因玉米、转基因大豆[41]。目前消费者对转基因生物的接受度仍然很低,一些国家已经强制要求商家在转基因成分上标注阈值[42]。Wu 等通过 Cas12a 系统和设计的反应容器,建立了一种超快速和方便的可视化检测 *CaMV35S* 启动子的方法[43]。通过 LAMP 和 PCR 分别与 Cas12a 结合,在大豆粉中可检测到低至 0.05%(质量分数)的转基因含量,该方法设计的反应容器有可能成为基于仪器的超高灵敏度方法的补充,并为现场快速检测提供新的解决方案[43]。

食源性致病菌引起食源性疾病,对人们的身体健康造成了极大威胁。Zhang 等基于 Cas12a 系统,建立了一种新颖、特异和可视化的核酸检测方法,在虾样品中对副溶血性弧菌的检出限为 1.02×10^{2} copies/μL[44]。大肠杆菌可能导致出血性结肠炎、血性腹泻和肾衰竭等[45],也可以感染水、果汁、牛奶、水果和蔬菜[46]。Sun 等研究了一种 Cas9 触发的两步等温扩增方法,用于检测大肠杆菌 O157:H7。该方法使用金属有机框架 UiO66 作为荧光猝灭剂，在目标 dsDNA 存在的情况下,Cas9-sgRNA 复合物被激活,在 dsDNA 的非靶标链上引入两个 DNA 断裂，触发新链的合成和延伸，然后通过 RCA 反应产生包含

靶标的长 ssDNA 与 DNA 探针杂交，从而恢复荧光信号，该方法能够以高特异性检测 40 CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7[47]。全球抗生素耐药性以及食品和环境污染的发生率持续增加，特别是由病毒和多重耐药细菌引起的感染。多重耐药金黄色葡萄球菌（multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）是最重要的多重耐药病原体之一，对多种抗生素耐药。MRSA 感染导致严重发病率和死亡率的风险极高[48]。Guk 等构建了一种简便、灵敏和快速的方法，称为 CRISPR 介导的 DNA 荧光原位杂交（FISH），用于检测 MRSA。该方法中将 dCas9-sgRNA 复合物用作识别元件，SYBR Green I 用作 dsDNA 染色的报告分子，sgRNA 的易编程性使得 dCas9-sgRNA 能够选择性地与 MRSA 基因结合，该方法能够检测低至 10 CFU/mL 的 MRSA 裂解物[49]。Curti 等应用 Cas12a 来识别与碳青霉烯类耐药基因相对应的靶序列，如 *blaKPC*、*blaNDM* 和 *blaOXA*。通过无标记阻抗分析，检测时间缩短至 60 min 以内，且结果与 qPCR 的结果相当，并通过便携式试纸条进行了验证[50]。

3.2 核糖核酸检测

Cas13a 在相应的 crRNA 的引导下，可特异性识别RNA，因此多通过 Cas13 构建生物传感系统以实现核糖核酸的检测。有研究者利用 Cas13a 的反式切割活性，构建了一种基于 Cas13a 的生物传感平台，称为特异性高灵敏度酶报告系统（specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking，SHERLOCK）。通过逆转录重组酶聚合酶扩增（reverse transcription recombinase polymerase amplification，RT-RPA）技术扩增 RNA 或 RPA 扩增 dsDNA，再经过 T7 转录生成 RNA 产物，用于激活 Cas13a 以产生荧光信号[51]。SHERLOCK 能够在患者血清或尿液样本中检测到寨卡病毒和登革热病毒，并区分不同地区的寨卡病毒。第 1 代 SHERLOCK 存在一定的局限性，无法达到便携、多重检测和高灵敏度的性能要求[52]。为了解决这些问题，张锋所在团队再次构建了 SHERLOCKversion2 系统（SHERLOCKv2）[35]，利用不同的 Cas 酶表现出不同程度的“偏爱”切割特性，同时将多种不同特异性荧光探针引入检测系统，进行多种核酸检测，可在 1 份样本中同时检测多种病毒[52]。SHERLOCKv2 还利用侧流层析方法实现了快速检测，当 Cas13a 切割 RNA 荧光探针时，探针两端连接的 6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein，FAM）与生物素分别结合到试纸条的不同区域，在 2 h 内即可将结果直观地展现在试纸条上，摆脱了检测体系对荧光读数仪器的依赖，该方法可通过冻干试剂在室温使用，从而实现了现场即时检测。

微小 RNA（microRNAs，miRNA）是具有 18~24 个核苷酸的小的非编码 RNA[53]，其对于基因表达的转录后调节是必需的[54]。miRNA 被发现各种疾病的发生和发展与其异常表达水平密切相关，被广泛作为诊断的生物标志物[55]。对于 miRNA 检测，最常见的策略是基于 Cas13 的生物传感系统。Shan 等利用 CRISPR/LbuCas13a 的高特异性和简单性直接检测 miRNA，这种一步法在 30 min 内实现了使检测限低至 4.5 amol/L，线性范围为 10 amol/L~100 fmol/L[56]。更重要的是，单核苷酸的变化，甚至是目标 miRNA 末端的变化，都可以通过合理改变 crRNA 进行鉴别。此外，这种基于 Cas13a-crRNA 的信号放大策略的实际应用能力通过在复杂生物样品中的 miRNA 定量检测得到了证明，其具有良好的可靠性、敏感性和方便快捷等特点，有望在与 miRNA 相关疾病的早期诊断中发挥巨大的潜力。Wang 等利用 Cas9 开发了一种用于 miRNA 检测的滚环 DNA 扩增（RCA）-CRISPR-split-HRP（RCH）方法。靶 miRNA 可解开哑铃探针以进行 RCA 反应，从而产生重复的反义序列和规则的茎环结构，其融合的 split-HRP-dCas9 复合物将通过sgRNA 装配在 RCA 产物上。因此，split-HRP 催化3′3′5′5′-四甲基联苯胺（TMB）进行氧化以产生颜色变化，该方法可以达到 fmol/L 水平的检测灵敏度和单碱基水平的特异性[57]。同 Cas9 相似，Cas12a 生物传感系统也需要将 miRNA 转化为 DNA 底物再进行检测。Wang 等构建了一种新的生物传感系统，称为 Cas12a 自供电和滚环转录（rolling circle transcription，RCT）-释放实时 crRNA 募集系统（Cas12a-SCR）。miRNA 作为引物，沿着挂锁探针启动 RCT，不断产生具有 pre-crRNA 重复的 ssRNA。这些 pre-crRNA 与 Cas12a 形成 Cas12a-crRNA 复合物，能以 amol/L 水平的灵敏度检测 miRNA-21。Cas12a-SCR 中的 pre-crRNA 是实时循环生成的，不再需要 Cas12a-crRNA 的预组装，显著提高了miRNA 检测的信噪比[58]。

2019 新型冠状病毒（2019-nCoV）可在人与人之间广泛传播[59-60]，导致新型冠状病毒肺炎的疫情难以控制，研究人员针对该病毒的快速检测方法展

开了研究[61]。Ding 等利用 Cas12a 结合 RT-RPA 扩增来检测 2019-nCoV(SARS-CoV-2),可在 20 min 内得到单拷贝的灵敏度[62]。为了实现一步到位、简单、快速地对 2019 新型冠状病毒现场检测,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)设计并授权了一种称为"一锅法 SHERLOCK"(SHERLOCK testing in one pot,STOP)来检测 2019-nCoV,该方法简称 STOPCovid。STOPCovid 将 LAMP 和 AapCas12b 酶结合,使得两步法 SHERLOCK 转化为一步法,通过 LAMP 扩增的 2019-nCoV 的 RNA,激活 AapCas12b 以切割 LAMP 生物素标记的 ssDNA 报告分子。STOPCovid 在 70 min 和 40 min 内分别实现比色读数和荧光读数。STOPCovid 通过鼻咽拭子取样,具有 97%的准确性和 100%的特异性[63]。为了进一步简化RNA 提取,Joung 等使用磁珠进行目标富集,在 15 min 内即可实现目标物的浓缩,对 2019-nCoV(SARS-CoV-2)检出限为 33 copies/mL[64]。

埃博拉病毒(Ebola virus,EBOV)是一种 ssRNA 病毒,属于丝状病毒科[65],可引起致死率很高的埃博拉病毒病(Ebola virus disease,EVD)[66],早期诊断和治疗对于控制 EBOV 至关重要。有研究者利用可编程 CRISPR 系统,并应用聚丙烯酰胺-DNA 水凝胶设计微流体纸基分析装置(μPAD),该装置包括具有拓扑排列亲水区域的多层结构,特定 dsDNA 的存在可激活 Cas12a 以切割第二层中的 ssDNA 交联剂,从而抑制水凝胶的形成。当缓冲液流经整个装置,在染料存在的情况下可以实现可视化检测。同时,通过比色长度测量,5 min 即可定量检测病毒的浓度,检出限低至 11 amol/L[67]。此外,该体系使用的无线识别模块被整合到 μPAD 中进行数据处理,可实现数据的即时反馈,基于 CRISPR/Cas 的 μPAD 在便携性、灵敏度和低成本方面表现出优异的性能。

3.3 蛋白质检测

CRISPR/Cas 系统也用于检测非核酸目标,如蛋白质、酶、金属离子和小分子物质等。通常 CRISPR/Cas 系统被用作信号放大器,因为非核酸的靶标分子不能被直接识别,通常需要掺入识别元件,如功能性核酸(脱氧核酶和适体)、抗体和细菌变构转录因子。

Dai 等利用蛋白质适配体的优异识别能力,构建了一种基于 CRISPR/Cas12a 的电化学生物传感器(E-CRISPR)。蛋白质(TGF-β1)适配体复合物的形成可以阻止 Cas12a 切割 ssDNA 报告基因,从而导致电流强度迅速降低,获得报告信号,检测限低至 0.2 nmol/L[68]。此外,该测定方法可用于人间充质干细胞软骨分化过程中的 TGF-β1 的检测,无须复杂的样品预处理。Chen 等开发了一种 CRISPR/Cas13a 的酶联免疫吸附测定(Cas13a signal amplification linked immunosorbent assay,CELISA)方法,采用双抗体来捕获蛋白质。输出荧光信号可以通过 T7 RNA 聚合酶转录和 CRISPR/Cas13a 反式切割活性进行双倍放大,对白细胞介素 6(interleukin,IL-6)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的检测限分别为 2.29 fmol/L 和 0.81 fmol/L,检测灵敏度是传统 ELISA 试剂盒的 100 倍[69]。Du 等设计了一个基于 CRISPR/Cas 生物传感系统的哑铃形尿嘧啶-DNA 糖基化酶(uracil-DNA glycosylase,UDG)作用底物(eSUDG)。哑铃形尿嘧啶-DNA 糖基化酶在茎部含有一个尿嘧啶碱基,UDG 可以特异性地去除尿嘧啶碱基以产生无嘧啶位点,该位点可以被 Endo.IV 核酸酶进一步切割,这会产生带有 3′OH 末端的游离 ssDNA。随后,在脱氧核苷酸转移酶(terminal transferase,TdT)的介导下聚合以形成长的 PolyT 序列。由于 Cas12a 的 crRNA 本身具有 Poly(A)序列,因此 Cas12a 效应子可以被激活并对 ssDNA 探针进行切割,从而产生荧光信号[70]。所提出的生物传感器实现了 UDG 和 Dam MTase 两种酶活性的检测,检测限分别为 5×10^{-6} U/mL 和 1×10^{-4} U/mL[70-71]。

3.4 小分子物质检测

开发特异性、简单且可推广的小分子检测方法对于生物应用具有很强的吸引力,包括环境监测、医学诊断和法医甄别[72-74]。然而,光谱和质谱技术等"金标准"分析过程耗时,且依赖大型仪器[75]。Liang 等报道了一种 CRISPR/Cas12a 和细菌变构转录因子(allosteric transcription factor,aTF)介导的小分子检测器,称为 CaT-SMelor。该系统需要与 dsDNA 探针和 Cas12a-crRNA 介导的荧光报告基因结合的固定化 aTF。当存在靶标分子的情况下,aTF 通过改变其构象以将 dsDNA 从 aTF 结合结构域解离,之后 dsDNA 与 Cas12a 的结合可以激活 Cas12a 非特异性切割 ssDNA 报告基因,从而产生恢复的荧光[72]。该系统的检测时间只需要 25 min,且检测限可达到

0.25 nmol/L,满足实际样品(166.4~546.7 mmol/L)尿酸分析的要求[76-77]。

对于非核酸物质的检测通常需要利用特殊的适体将非核酸信号转化为核酸信号。Abnous 等基于 AuNPs、CRISPR/Cas12a 和 RCA 催化活性开发的比色适体传感器，将 RCA、CRISPR/Cas12a 和 AuNPs 组合使得在黄曲霉毒素 M_1(AFM_1)存在时形成大的 DNA 结构，作为显色剂的 4-硝基苯酚无法进入 AuNPs 表面;而当 AFM_1 不存在时,4-硝基苯酚可自由到达 AuNPs 表面，此时的 AuNPs 表面仅保留非常短的寡核苷酸，通过 4-硝基苯酚对 AuNPs 表面的结构和光谱的影响,可灵敏地识别加标牛奶样品中的 AFM_1[78]。Mao 等构建了一种上转换纳米粒子(up conversion nanoparticles,UCNP)探针来检测赭曲霉毒素 A (OTA)。基于 OTA 适体构建毒素的 dsDNA 探针，当存在 OTA 时,OTA 适体与 OTA 竞争结合并释放激活链(OTA 适体互补链),激活链被 CRISPR/Cas12a 复合物识别并激活 Cas12a 反式切割 ssDNA 的活性。结果表明,OTA 浓度与激活链和荧光值成正比并用于检测玉米粉中的 OTA[79]。Wu 等通过将 CRISPR/Cas14a 系统与二维卟啉金属有机框架纳米片 (2D porphyrin metal-organic framework,pMOFs)相结合,研究了一种新型多功能的 Cas14-pMOFs 荧光传感器用于检测饮用水和自来水中的微囊藻毒素-LR,在 3.5 h 内可达到 19 pg/mL 的检测灵敏度[80]。

4 展 望

作为基因编辑工具的固有特性,CRISPR 靶向识别活性已经实现了广泛应用,包括生物传感分析和成像分析等,Cas 效应子的反式切割活性为超灵敏和便携式核酸检测提供了有效的信号输出系统。CRISPR 检测方案有几个共同的特征,如快速、恒温和便捷，几乎所有的 CRISPR 系统都可以在短时间内(如几分钟)在温和的条件下完成反应,这是基于 CRISPR 的核酸检测工具最突出的优势。总之,从表 3 中可以看出，基于结合活性和切割活性,CRISPR/Cas 系统已经成为多种目标检测的通用工具，包括核酸、蛋白质、金属离子、细菌和小分子。CRISPR/Cas 技术简单,具有特异性,灵敏度高,可结合多种技术实现目标检测,其性能等同于或优于传统检测方法。虽然已经取得了显著的进步,但 CRISPR 诊断工具仍然面临一些挑战。目前存在问题及解决措施如下所示：

1)脱靶效应　在 CRISPR/Cas 系统中,脱靶效应一直受到关注。在检测过程中,需要仔细考虑脱靶效应可能导致假阴性或假阳性结果。多种因素影响脱靶效应，如 Cas 效应子本身对错配的容忍度、crRNA 与 Cas 效应子的结合没有发生在“敏感区域”、设计的向导 RNA 序列具有兼容性[81]和靶核酸序列与向导 RNA 序列之间的碱基错配程度[82]等。对于 Cas 效应子，不同 Cas 效应子的结构特征和来源对脱靶效应有显著影响。靶标和 gRNA 序列之间的碱基错配也是产生脱靶效应的主要原因,完全或部分互补的核酸序列导致了脱靶的可能性,特别是当非种子区域中存在错配的碱基对时,致使一些非靶标序列可能激活 Cas 效应子,产生背景信号,并导致 CRISPR/Cas 生物传感系统的整体灵敏度相对较低[76,83]。目前也有一些措施用于减少脱靶效应,如通过人工突变构建了高保真 Cas9 效应子[84]、使用 Cas9 镍酶和成对的向导 RNA 来最大化降低脱靶效应[85]。此外，新发现的 Cas 效应子也可以提高靶向活性,如 Cas12b[86]、Cas13d[87]。机器学习在脱靶预测和优化向导 RNA 设计方面等具有较大的潜力[88-91]。通过对 CRISPR 数据库的不断学习和训练，脱靶效应将得到精确预测,该方法可广泛应用于 CRISPR/Cas 系统。

2)检测目标物的有限性　为了准确识别靶序列,大多数 Cas 效应子,如 Cas9、Cas12a 和 Cas13a,需要包含短序列基序(PAM 或 PFS)的靶标[25]。虽然这一要求可以显著增加 CRISPR/Cas 系统的特异性,但也限制了靶标区域的选择。此外,不同类型和来源的 Cas 效应子具有各自的短序列基序(如 LbCas12a 的 5′TTTN 和 SpCas9 的 3′NGG)，这意味着一个特定的靶序列只能被一个 Cas 效应子识别,并降低了 CRISPR/Cas 系统的灵活性。因此,当CRISPR/Cas 系统直接检测目标序列时,可选择的目标序列可能很少,尤其是检测短序列或区分单核苷酸多态性。此外,为了实现非核酸的检测,一些功能核酸通常被用来将非核酸信号转换成核酸信号。但是,对短序列基序的要求可能需要在一定程度上改变功能核酸的结构,并进一步影响它们的特异性或检测灵敏度。减少对短序列的依赖性同时保证其特异性,或许是扩大检测范围的重点。最近有研究者构建了一个名为 SpG 的近似无须 PAM 的 SpCas9 变体,能够

表 3 基于 CRISPR/Cas 的生物传感平台概述

Table 3 Overview of CRISPR/Cas–based biosensing platforms

目标物	效应子	扩增方式	灵敏度	信号读出	检测时间/min	参考文献
SNP 和 DNA 病毒	LbCas12a	PCR	–	荧光	60	[18]
SNP、DNA 甲基化、RNA	AsCas12b	PCR 或 LAMP	1×10^{-8} nmol/L	荧光	120	[20]
HPV、环境 DNA	LbCas12a	RPA	amol/L 级别	荧光	–	[12]
SNP	Cas14a	T7 核酸酶	–	荧光	–	[30]
ASFV	Cas9	PCR 或 RPA	4 copies/mL	比色	40	[37]
ASFV	LbCas12a	RAA	0.4 copies/mL	比色和荧光	60	[38]
ASFV	Cas12a	RPA	2 copies	比色	20	[39]
食源性致病菌、转基因作物和肉类掺假	Cas12a	RPA	10 copies	荧光	45	[40]
CaMV35S 启动子	Cas12a	LAMP 和 PCR	0.05%	荧光	40	[43]
副溶血性弧菌	Cas12a	PCR	1.02×10^{2} copies/μL	荧光	5	[44]
大肠杆菌	Cas9	RCA	40 CFU/mL	荧光	–	[47]
MRSA	dCas9	–	31 ng/mL	荧光	30	[49]
耐药基因	LbCas12a	–	amol/L 级别	电化学	60	[50]
寨卡病毒和登革热病毒	LwaCas13a	RT–RPA 或 RPA	2 amol/L	荧光	30	[51]
多路复用	LwaCas13a、PsmCas13b、CcaCas13b、AsCas12a	RT–RPA 或 RPA	2 amol/L	荧光和比色	60	[35]
miRNA	LbuCas13a	–	4.5 amol/L	荧光	30	[56]
miRNA	Cas9	RCT	fmol/L 级别	荧光	60	[57]
miRNA	Cas12a	RCT	amol/L 级别	荧光	80	[58]
2019–nCoV	Cas13a	RT–PCR	单拷贝	荧光	20	[62]
2019–nCoV	AapCas12b	LAMP	33 copies/mL	荧光和比色	70、40	[63]
EBOV	Cas12a	–	11 amol/L	比色	5	[67]
TGF–β1	AsCas12a、LbCas12a	–	0.2 nmol/L	电化学信号	30	[68]
白细胞介素 6(IL–6)和血管内皮生长因子	Cas13a	T7 RNA 聚合酶	2.29、0.81 fmol/L	比色	30	[69]
UDG 和 Dam MTase	Cas12a	TdT	5×10^{-6}、1×10^{-4} U/mL	荧光	210	[70]
aTF	Cas12a	–	0.25 nmol/L	荧光	25	[76]
AFM_1	Cas12a	RCA	0.05 ng/L	比色检测	150	[78]
OTA	Cas12a	–	1.564 1 ng/mL	荧光	60	[79]
微囊藻毒素 LR	Cas14	–	19 pg/mL	荧光	210	[80]

靶向具有非 G 的 PAM[92]。随着对 Cas 效应子结构的不断研究,更多的 Cas 效应子将满足对短序列的检测需求,扩大应用范围。

3)多靶点检测 虽然通过 CRISPR/Cas 系统已经成功开发了许多用于各种目标物的检测方法,但从单个样品中同时检测多个目标物仍然难以实现[93–94]。原因主要归因于一旦 Cas 效应子和 gRNA 的复合物被靶标激活,Cas 效应子就表现出非特异性反式切割活性,所以依靠 CRISPR/Cas 系统本身进行多重检测可能不是一个好的选择。相反,通过物理分离将 Cas 效应子、gRNA 或它们的混合物分离到不同的区域来进行检测应该是更好的解决方案[95]。但是,仍有许多工作需要考虑,包括设计合适的分离结构(如二氧化硅/玻璃微阵列或硝酸纤维素膜),建立便携式读出技术(如比色读数或荧光读数)等。

4)便携式检测平台的设计　为了使 CRISPR/Cas 系统更有吸引力，更广泛地应用于不同目标物的检测，特别是在资源有限的地区，利用 CRISPR/Cas 系统建立一些简单、低成本、方便的检测平台是非常重要的。在最近的新型冠状病毒肺炎疫情中，基于 CRISPR 的 2019 新型冠状病毒检测方法已被广泛研究，并因其高灵敏度和特异性而在控制新型冠状病毒肺炎疫情方面发挥了重要作用[64,96-97]，但这些检测方法主要限于实验室使用。对于通常使用的基于荧光的 CRISPR 传感系统，构建具有高效的光信号收集的小型荧光探测器对于便携式信号读取非常有必要。目前已有研究者设计了一个口袋大小的荧光检测器用于读取荧光信号变化[98]。在处理大规模检测时，样本之间可能的交叉污染仍然是一个挑战。在这种情况下，将 CRISPR 检测与工程、微电子和小型化相结合可能会提高检测通量和自动化程度。微流控平台可以在几平方厘米的系统上集成大型测试实验室的所有功能，包括处理样品、转移溶液、混合试剂、加热等。未来的工作可能需要专注于建立基于 CRISPR 的便携式微流控检测平台，携带所有必要的试剂，整个操作过程可以自动或半自动完成。此外，便携式检测平台中的 CRISPR/Cas 系统试剂可以冻干或脱水，便于运输和储存[31]，据报道，脱水的 Cas12a 比 Cas12a 溶液具有更好的热稳定性[99]。样本处理对于目标检测也非常重要，在未来发展中，将 CRISPR 检测与工程、材料和人工智能相结合的多学科联合将使 CRISPR/Cas 系统更加强大。

5)可穿戴设备的研究与应用　将 CRISPR 诊断和检测系统集成到可穿戴设备中，可以无创监测生理状况、疾病状态，检测可能接触到的病原体或毒素。CRISPR/Cas 系统与水凝胶耦合构建刺激响应材料，可以将生物信息转化为材料性质的变化[67]，为智能生物传感器的发展提供了一条途径。此外，最近有研究者研制了一种带有冻干 CRISPR 传感器的面罩[100]，是一种可以实现耐储存、基因可编程和高灵敏度的可穿戴生物传感器，将这些生物传感器集成到与无线网络兼容的服装中，并使用定制的智能手机应用程序提供实时动态。

目前，尽管仍有一些挑战需要克服，但随着对每个 CRISPR/Cas 系统机制的不断了解和更多 Cas 效应子的发现，CRISPR/Cas 系统将以其独特的优势在未来的各种目标检测中变得更加完善。

参考文献：

[1] 王紫怡，黄迪，徐颖华，等. CRISPR 核酸检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2021，12(17)：6711-6719.
[2] MARRAFFINI L A，SONTHEIMER E J. CRISPR interference：RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea[J]. **Nature Reviews Genetics**，2010，11(3)：181-190.
[3] FU X R，SUN J D，LIANG R，et al. Application progress of microfluidics-integrated biosensing platforms in the detection of foodborne pathogens[J]. **Trends in Food Science & Technology**，2021，116：115-129.
[4] KOONIN E V，MAKAROVA K S. CRISPR/Cas：evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes[J]. **RNA Biology**，2013，10(5)：679-686.
[5] 幸宇云，杨强，任军. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在农业动物中的应用[J]. 遗传，2016，38(3)：217-226.
[6] BARRANGOU R，MARRAFFINI L. CRISPR-Cas systems：prokaryotes upgrade to adaptive immunity[J]. **Molecular Cell**，2014，54(2)：234-244.
[7] KOONIN E V，MAKAROVA K S，ZHANG F. Diversity，classification and evolution of CRISPR/Cas systems[J]. **Current Opinion in Microbiology**，2017，37：67-78.
[8] 宋时洋. 敲除根瘤中特异表达基因对蒺藜苜蓿结瘤的影响[D]. 泰安：山东农业大学，2019.
[9] 张庆颜，董小玉，臧乃亮，等. CRISPR/Cas9 系统在人类疾病中的研究应用进展[J]. 分子诊断与治疗杂志，2018，10(3)：206-211.
[10] ZETSCHE B，GOOTENBERG J S，ABUDAYYEH O O，et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR/Cas system[J]. **Cell**，2015，163(3)：759-771.
[11] SWARTS D C，JINEK M. Mechanistic insights into the *cis*- and *trans*-acting DNase activities of Cas12a[J]. **Molecular Cell**，2019，73(3)：589-600.
[12] CHEN J S，MA E，HARRINGTON L B，et al. CRISPR/Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase

activity[J]. **Science**,2018,360(6387):436-439.
[13] ABUDAYYEH O O,GOOTENBERG J S,KONERMANN S,et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. **Science**,2016,353(6299):1-23.
[14] ZHOU W,HU L,YING L,et al. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection[J]. **Nature Communications**,2018,9(1):1-11.
[15] PIEPENBURG O,WILLIAMS C H,STEMPLE D L,et al. DNA detection using recombination proteins[J]. **PLoS Biology**,2006,4(7):1115-1121.
[16] WILLIAMS M A,O'GRADY J,BALL B,et al. The application of CRISPR/Cas for single species identification from environmental DNA[J]. **Molecular Ecology Resources**,2019,19(5):1106-1114.
[17] TSOU J H,LENG Q,JIANG F. A CRISPR test for detection of circulating nuclei acids[J]. **Translational Oncology**,2019,12(12):1566-1573.
[18] LI S Y,CHENG Q X,WANG J M,et al. CRISPR/Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. **Cell Discovery**,2018,4(1):1-4.
[19] YAMANO T,NISHIMASU H,ZETSCHE B,et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA[J]. **Cell**,2016,165(4):949-962.
[20] LI L X,LI S Y,WU N,et al. HOLMESv2:a CRISPR/Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation[J]. **ACS Synthetic Biology**,2019,8(10):2228-2237.
[21] QIAN C,WANG R,WU H,et al. Uracil mediated new PAM of Cas12a to realize visualized DNA detection at single-copy level free from contamination[J]. **Analytical Chemistry**,2019,91(17):11362-11366.
[22] WANG B,WANG R,WANG D,et al. Cas12aVDet:a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection [J]. **Analytical Chemistry**,2019,91(19):12156-12161.
[23] SWARTS D C,JOHN V,JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR/Cas12a[J]. **Molecular Cell**,2017,66(2):221-233.
[24] NISHIMASU H,SHI X,ISHIGURO S,et al. Engineered CRISPR/Cas9 nuclease with expanded targeting space[J]. **Science**,2018,361(6408):1259-1262.
[25] GLEDITZSCH D,PAUSCH P,MÜLLER-ESPARZA H,et al. PAM identification by CRISPR/Cas effector complexes:diversified mechanisms and structures[J]. **RNA Biology**,2019,16(4):504-517.
[26] STERNBERG S H,REDDING S,JINEK M,et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9[J]. **Nature**,2014,507(7490):62-67.
[27] HSU P D,SCOTT D A,WEINSTEIN J A,et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. **Nature Biotechnology**,2013,31(9):827-832.
[28] ABUDAYYEH O O,GOOTENBERG J S,ESSLETZBICHLER P,et al. RNA targeting with CRISPR/Cas13[J]. **Nature**,2017,550(7675):280-284.
[29] YAN W X,HUNNEWELL P,ALFONSE L E,et al. Functionally diverse type V CRISPR/Cas systems[J]. **Science**,2019,363(6422):88-91.
[30] HARRINGTON L B,BURSTEIN D,CHEN J S,et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR/Cas14 enzymes[J]. **Science**,2018,362(6416):839-842.
[31] GOOTENBERG J S,ABUDAYYEH O O,LEE J W,et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. **Science**,2017,356(6336):438-442.
[32] SHASTRY B S. SNP alleles in human disease and evolution[J]. **Journal of Human Genetics**,2002,47(11):561-566.
[33] ZUR H H. Papillomaviruses and cancer:from basic studies to clinical application[J]. **Nature Reviews Cancer**,2002,2(5):342-350.
[34] MUÑOZ N,BOSCH F X,DE SANJOSÉ S,et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. **New England Journal of Medicine**,2003,348(6):518-527.
[35] GOOTENBERG J S,ABUDAYYEH O O,KELLNER M J,et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13,Cas12a,and Csm6[J]. **Science**,2018,360(6387):439-444.
[36] NETHERTON C L,CONNELL S,BENFIELD C T O,et al. The genetics of life and death:virus-host interactions underpinning

resistance to African swine fever, a viral hemorrhagic disease[J]. **Frontiers in Genetics**, 2019, 10: 1-12.

[37] WANG X, XIONG E, TIAN T, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. **ACS Nano**, 2020, 14(2): 2497-2508.

[38] WANG X, JI P, FAN H, et al. CRISPR/Cas12a technology combined with immunochromatographic strips for portable detection of African swine fever virus[J]. **Communications Biology**, 2020, 3(1): 1-8.

[39] FU J, ZHANG Y, CAI G, et al. Rapid and sensitive RPA-Cas12a-fluorescence assay for point-of-care detection of African swine fever virus[J]. **PLoS One**, 2021, 16(7): 1-12.

[40] LIU H, WANG J, ZENG H, et al. 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: 1-8.

[41] BECKER R, ULRICH A. Improved detection and quantification of cauliflower mosaic virus in food crops: assessing false positives in GMO screening based on the 35S promoter[J]. **European Food Research and Technology**, 2018, 244(10): 1861-1871.

[42] BROEDERS S R, DE KEERSMAECKER S C, ROOSENS N H. How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed[J]. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012, 2012: 1-11.

[43] WU H, HE J S, ZHANG F, et al. 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.

[44] ZHANG M, LIU C, SHI Y, et al. Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application[J]. **Talanta**, 2020, 214: 1-7.

[45] OSTROFF S M, TARR P I, NEILL M A, et al. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157: H7 infections[J]. **The Journal of Infectious Diseases**, 1989, 160(6): 994-998.

[46] NATARO J P, KAPER J B. Diarrheagenic *Escherichia coli*[J]. **Clinical Microbiology Reviews**, 1998, 11(1): 142-201.

[47] SUN X, WANG Y, ZHANG L, et al. 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.

[48] BOUCHER H, MILLER L G, RAZONABLE R R. Serious infections caused by methicill-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. **Clinical Infectious Diseases**, 2010, 51(2): 183-197.

[49] GUK K, KEEM J O, HWANG S G, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex[J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2017, 95: 67-71.

[50] CURTI L A, PEREYRA-BONNET F, REPIZO G D, et al. CRISPR-based platform for carbapenemases and emerging viruses detection using Cas12a(Cpf1) effector nuclease[J]. **Emerging Microbes & Infections**, 2020, 9(1): 1140-1148.

[51] KELLNER M J, KOOB J G, GOOTENBERG J S, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. **Nature Protocols**, 2019, 14(10): 2986-3012.

[52] 陈佳灵, 黄颖而, 邓昊, 等. CRISPR/Cas13a 系统在基因编辑和分子诊断领域中的研究进展[J]. 检验医学 2022, 37(1): 97-100.

[53] 秦兵. MicroRNA-184 调控视网膜色素上皮细胞分化机制的研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2018.

[54] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. **Cell**, 2004, 116(2): 281-297.

[55] LU J, GETZ G, MISKA E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. **Nature**, 2005, 435(7043): 834-838.

[56] SHAN Y, ZHOU X, HUANG R, et al. High-fidelity and rapid quantification of miRNA combining crRNA programmability and CRISPR/Cas13a *trans*-cleavage activity[J]. **Analytical Chemistry**, 2019, 91(8): 5278-5285.

[57] WANG R, ZHAO X, CHEN X, et al. Rolling circular amplification (RCA)-assisted CRISPR/Cas9 cleavage (RACE) for highly specific detection of multiple extracellular vesicle microRNAs[J]. **Analytical Chemistry**, 2020, 92(2): 2176-2185.

[58] WANG G, TIAN W, LIU X, et al. New CRISPR-derived microRNA sensing mechanism based on Cas12a self-powered and rolling circle transcription-unleashed real-time crRNA recruiting[J]. **Analytical Chemistry**, 2020, 92(9): 6702-6708.

[59] BAI Y, YAO L, WEI T, et al. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19[J]. **The Journal of the American Medical Association**, 2020, 323(14): 1406-1407.

[60] ROTHE C, SCHUNK M, SOTHMANN P, et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in germany [J]. **New England Journal of Medicine**, 2020, 382(10): 970-971.

[61] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. **New England Jour–**

nal of Medicine,2020,382(8):727-733.

[62] DING X,YIN K,LI Z,et al. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR/Cas12a assay[J]. **Nature Communications**,2020,11(1):1-10.

[63] JOUNG J,LADHA A,SAITO M,et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics[J]. **medRxiv**,2020,8:1-21.

[64] JOUNG J,LADHA A,SAITO M,et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. **New England Journal of Medicine**,2020,383(15):1492-1494.

[65] FELDMANN H,NICHOL S T,KLENK H D,et al. Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein[J]. **Virology**,1994,199(2):469-473.

[66] GIRE S K,GOBA A,ANDERSEN K G,et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak[J]. **Science**,2014,345(6202):1369-1372.

[67] ENGLISH M A,SOENKSEN L R,GAYET R V,et al. Programmable CRISPR-responsive smart materials[J]. **Science**,2019,365(6455):780-785.

[68] DAI Y,SOMOZA R A,WANG L,et al. Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR/Cas12a(Cpf1) for the development of a universal electrochemical biosensor[J]. **Angewandte Chemie International Edition**,2019,58(48):17399-17405.

[69] CHEN Q,TIAN T,XIONG E,et al. CRISPR/Cas13a signal amplification linked immunosorbent assay for femtomolar protein detection[J]. **Analytical Chemistry**,2019,92(1):573-577.

[70] DU Y C,WANG S Y,WANG Y X,et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase combined CRISPR/Cas12a amplification strategy for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase with zero background [J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2021,171:1-6.

[71] CHEN X,CAO G,WANG X,et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase induced activators to unlock the *trans*-cleavage of CRISPR/Cpf 1(TdT-IU-CRISPR/Cpf 1):an ultrasensitive biosensor for Dam MTase activity detection[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2020,163:1-7.

[72] LIANG M,LI Z,WANG W,et al. A CRISPR/Cas12a-derived biosensing platform for the highly sensitive detection of diverse small molecules[J]. **Nature Communications**,2019,10(1):1-9.

[73] LONG F,ZHU A,SHI H. Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning[J]. **Sensors**,2013,13(10):13928-13948.

[74] GU B,ZHANG Q. Recent advances on functionalized upconversion nanoparticles for detection of small molecules and ions in biosystems[J]. **Advanced Science**,2018,5(3):1-16.

[75] LIU D,WANG Z,JIANG X. Gold nanoparticles for the colorimetric and fluorescent detection of ions and small organic molecules[J]. **Nanoscale**,2011,3(4):1421-1433.

[76] BRENNWALD M S,SCHMIDT M,OSER J,et al. A portable and autonomous mass spectrometric system for on-site environmental gas analysis[J]. **Environmental Science & Technology**,2016,50(24):13455-13463.

[77] MESSERLI F H,FROHLICH E D,DRESLINSKI G R,et al. Serum uric acid in essential hypertension:an indicator of renal vascular involvement[J]. **Annals of Internal Medicine**,1980,93(6):817-821.

[78] ABNOUS K,DANESH N M,RAMEZANI M,et al. A novel colorimetric aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin M_1 based on the combination of CRISPR/Cas12a,rolling circle amplification and catalytic activity of gold nanoparticles[J]. **Analytica Chimica Acta**,2021,1165:1-8.

[79] MAO Z,WANG X,CHEN R,et al. Upconversion-mediated CRISPR/Cas12a biosensing for sensitive detection of ochratoxin A [J]. **Talanta**,2022,242:1-8.

[80] WU P,YE X,WANG D,et al. A novel CRISPR/Cas14a system integrated with 2D porphyrin metal-organic framework for microcystin-LR determination through a homogeneous competitive reaction[J]. **Journal of Hazardous Materials**,2022,424:1-11.

[81] DOENCH J G,FUSI N,SULLENDER M,et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9[J]. **Nature Biotechnology**,2016,34(2):184-191.

[82] BOYLE E A,ANDREASSON J O L,CHIRCUS L M,et al. High-throughput biochemical profiling reveals sequence determinants

of dCas9 off-target binding and unbinding[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2017, 114(21): 5461-5466.

[83] TIAN B, MINERO G A S, FOCK J, et al. CRISPR/Cas12a based internal negative control for nonspecific products of exponential rolling circle amplification[J]. **Nucleic Acids Research**, 2020, 48(5): 1-7.

[84] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR/Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. **Nature**, 2016, 529(7587): 490-495.

[85] SHEN B, ZHANG W, ZHANG J, et al. Efficient genome modification by CRISPR/Cas9 nickase with minimal off-target effects [J]. **Nature Methods**, 2014, 11(4): 399-402.

[86] STRECKER J, JONES S, KOOPAL B, et al. Engineering of CRISPR/Cas12b for human genome editing[J]. **Nature Communications**, 2019, 10(1): 1-8.

[87] ZHANG B, YE Y, YE W, et al. Two HEPN domains dictate CRISPR RNA maturation and target cleavage in Cas13d[J]. **Nature Communications**, 2019, 10(1): 1-11.

[88] LIN J, WONG K C. Off-target predictions in CRISPR/Cas9 gene editing using deep learning[J]. **Bioinformatics**, 2018, 34(17): 656-663.

[89] CHUAI G, MA H, YAN J, et al. DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning[J]. **Genome Biology**, 2018, 19(1): 1-18.

[90] WANG D, ZHANG C, WANG B, et al. Optimized CRISPR guide RNA design for two high-fidelity Cas9 variants by deep learning[J]. **Nature Communications**, 2019, 10(1): 1-14.

[91] KIM H K, KIM Y, LEE S, et al. SpCas9 activity prediction by DeepSpCas9, a deep learning-based model with high generalization performance[J]. **Science Advances**, 2019,5(11): 1-9.

[92] WALTON R T, CHRISTIE K A, WHITTAKER M N, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants[J]. **Science**, 2020, 368(6488): 290-296.

[93] BRUCH R, URBAN G A, DINCER C. CRISPR/Cas powered multiplexed biosensing[J]. **Trends in Biotechnology**, 2019, 37 (8): 791-792.

[94] LI Y, LIU L, LIU G. CRISPR/Cas multiplexed biosensing: a challenge or an insurmountable obstacle?[J]. **Trends in Biotechnology**, 2019, 37(8): 792-795.

[95] WU H, QIAN C, WU C, et al. End-point dual specific detection of nucleic acids using CRISPR/Cas12a based portable biosensor [J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2020, 157: 1-7.

[96] BROUGHTON J P, DENG X, YU G, et al. CRISPR/Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. **Nature Biotechnology**, 2020, 38 (7): 870-874.

[97] PATCHSUNG M, JANTARUG K, PATTAMA A, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA[J]. **Nature Biomedical Engineering**, 2020, 4(12): 1140-1149.

[98] KATZMEIER F, AUFINGER L, DUPIN A, et al. A low-cost fluorescence reader for *in vitro* transcription and nucleic acid detection with Cas13a[J]. **PLoS One**, 2019, 14(12): 1-17.

[99] QIAN C, WU H, SHI Y, et al. Dehydrated CRISPR-mediated DNA analysis for visualized animal-borne virus sensing in the unprocessed blood sample[J]. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2020, 305: 1-7.

[100] NGUYEN P Q, SOENKSEN L R, DONGHIA N M, et al. Wearable materials with embedded synthetic biology sensors for biomolecule detection[J]. **Nature Biotechnology**, 2021, 39(11): 1366-1374.