DOI:10.12441/spyswjs.20240913001 [文章编号] 1673-1689(2025)05-0010-12

# 基于CRISPR/Cas系统的生物传感器在食源性致病菌检测中的应用

邹 淼 曾静怡 曾丹丹 富语涵 张 旭 赵 波 莫天录*

(上海理工大学健康科学与工程学院,上海 200093)

**摘要:**CRISPR/Cas系统可识别外源DNA,切割靶标并阻止沉默外源基因的表达。由于精确的靶向功能,CRISPR/Cas系统被开发成1种高效的基因编辑工具。基于其高度的特异性及可操作性,将其与生物传感器联用,提高了传感器的检测特异性及效率。作者介绍了CRISPR/Cas系统的特点和应用,分析了基于CRISPR/Cas系统的生物传感器在食源性致病菌检测方面的最新进展并对其应用进行了总结和展望。

**关键词:**CRISPR/Cas系统;生物传感器;食源性致病菌

## Application of CRISPR/Cas System-based Biosensors in Detection of Foodborne Pathogens

*ZOU Miao ZENG Jingyi ZENG Dandan FU Yuhan ZHANG Xu ZHAO Bo MO Tianlu**

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** The CRISPR/Cas system can recognize foreign DNA, cut the target, and block or silence the expression of the foreign gene. Due to its precise targeting function, the CRISPR/Cas system has been developed as a highly efficient gene editing tool. With high specificity and operability, the CRISPR/Cas system has been combined with biosensors to improve the detection specificity and efficiency of the sensors. This review introduces the characteristics and applications of CRISPR/Cas system, analyzes the latest progress in the application of CRISPR/Cas system-based biosensors in the detection of foodborne pathogens, and summarizes and prospects the application of such biosensors.

**Keywords:** CRISPR/Cas system; biosensor; foodborne pathogens

食源性致病菌是导致食品安全问题的原因之一,全球每年因食源性疾病导致的病例数约6亿,死亡人数约42万[1]。常见的食源性致病菌有大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*,*L. monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,*S. aureus*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*,*V. parahaemolyticus*)等。国内外食品安全事件频发,表明食源性致病菌对公共卫生安全有巨大威胁,因此,开发高灵敏度、高特异性的新型检测技术对保障公众卫生安全有重要意义。CRISPR/Cas系统被誉为“下一代分子诊断技术”,该系统主要靠自身的反式切割活性实现信号放大,凭借其高度的特异性、灵敏度和灵活性,在核酸、蛋白质和小分子物质的检测中有广泛的应用前景[2]。然而,如果靶标未扩增,该系统难以高效检测单个目标,限制了其在病原体检测和实际场景中的即时检测。因此,近年来,为了克服传统检测方法的局限性,研究者们开发了多种快速检测技术,诸如:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)、

**基金项目:**国家“十四五”重点研发计划项目(2023YFF1103600);国家自然科学基金面上项目(32370092);上海理工大学启动经费项目。

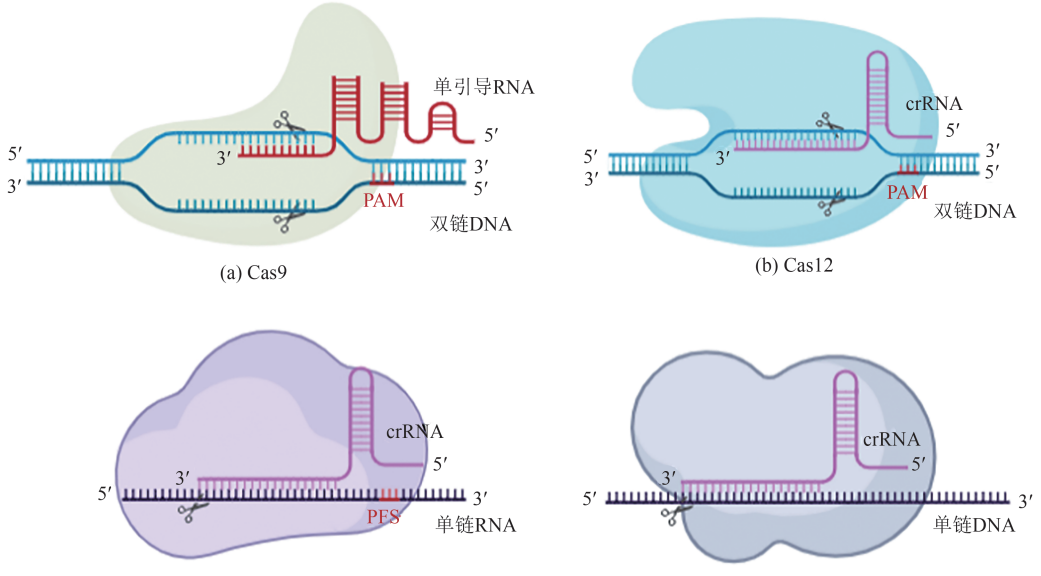
**通信作者:**莫天录(1988—),男,博士,副教授,博士研究生导师,主要从事微生物学和合成生物学研究。E-mail: motianlu@usst.edu.cn

**收稿日期:**2024-09-13 **修回日期:**2024-12-20

重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）、核酸序列扩增（nucleic acid sequence-based amplification，NASBA）、解旋酶依赖性扩增（helicase-dependent amplification，HDA）、滚环扩增（rolling circle amplification，RCA）等。这些技术与CRISPR/Cas系统联用，极大地提高了病原菌的快速检测能力[3-4]。LAMP技术因其灵敏度高、特异性强、可直接扩增DNA而备受推崇，但也面临着假阳性问题和引物设计复杂等挑战。RPA技术受到DNA浓度的限制，且在扩增过程中容易发生污染，产物纯化难度较大。NASBA技术涉及多种酶和复杂的反应体系，技术开发难度大，需要精确控制反应条件和酶活性，成本也相对较高。HDA技术需要2~3个不同的反应温度，而RCA技术中未成环的探针和未结合的模板DNA或RNA可以产生信号，这可能会降低检测的灵敏度。尽管基于CRISPR/Cas系统的生物传感器具备多种优势，但传统的信号放大系统往往只依赖单一信号路径，而双信号放大系统则通过同时激发2条不同的信号通路来实现信号增强。然而，双信号放大系统在病原体快速诊断中的协同效应研究的相关报道较少[5]。LAMP技术在基层快速检测中具有明显优势，但在多重检测和定量分析方面还存在局限。RPA技术在病原体早期检测中显示出巨大潜力，但在实际应用中需解决样品的预处理和检测控制等问题。Song等[6]结合LAMP与RPA技术开发了1种RAMP检测方法，提高了检测灵敏度和特异性，且操作简单，为病原体的快速检测提供了新方案。CRISPR/Cas系统能有效识别并切割靶标，已在各类生物传感器中用于检测病原体，此策略使系统在面对复杂样本环境时更有效，能够减少背景干扰，同时提升检测的稳定性与重复性。不同的CRISPR/Cas检测系统的原理见图1[7]。作者聚焦于CRISPR/Cas系统在食源性致病菌检测领域的应用状况，探讨各类生物传感器与CRISPR/Cas系统的优势及局限性，旨在为该领域的后续研究提供科学依据，为实际应用提供指导，推动食品安全检测技术的创新与优化。

## 1　基于CRISPR/Cas系统的核酸检测技术工作原理

CRISPR/Cas系统是细菌的防御机制，包括CRISPR、Cas蛋白以及向导RNA（gRNA），gRNA则包括CRISPR RNA（crRNA）和反式激活crRNA（tracrRNA）。CRISPR是细菌基因组中的1种结构，能捕获并记忆病毒DNA（获得阶段）；CRISPR先转录为前体crRNA，随后在特定酶（如Cas6或RNaseIII）的作用下，被切割加工为成熟的、包含间隔序列信息的crRNA。在天然II型系统中，成熟的crRNA与tracrRNA结合形成功能性RNA复合体（表达阶段），指导Cas蛋白识别并切割与crRNA互补的靶标序列（干扰阶段），帮助细菌抵




PAM指前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif)；PFS指前间隔序列侧翼序列(protospacer flanking sequence)。

图1　不同的CRISPR/Cas检测系统的原理图

Fig. 1　Schematic diagrams of different CRISPR/Cas detection systems

御外来遗传物质的侵染。王芳妹等[8]针对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,*P. aeruginosa*)的毒力基因*pcrL*和16S rRNA基因的V3—V4区扩增,设计特异性引物,并运用实时荧光定量PCR技术开发了1种高灵敏度的检测方法,检测限(limit of detection, LOD)低至10 CFU/mL。为了降低CRISPR/Cas系统中gRNA的合成成本,有学者开发了1种*Pf*Ago核酸酶介导的核酸检测技术[9],能特异性结合和切割靶标。*Pf*Ago与crRNA结合形成复合物,用于RNA的精确检测。Liu等[10]设计了RT-RPA-*Pf*Ago检测系统,解决了传统水稻病毒检测中灵敏度低、成本高、操作复杂和多重检测难的问题,LOD为$5.2\times10^{-24}$~$8.5\times10^{-24}$ mol/μL。

根据Cas蛋白的种类可将CRISPR/Cas系统分为2类:第一类具有多亚基效应蛋白,每种效应蛋白单独发挥其功能;第二类具有单效应蛋白,每种效应蛋白具有多种功能。Cas效应蛋白可以分为2个类别、6种类型、大量亚型(目前已发现超过80种)[11],其中Ⅰ型、Ⅲ型属于类别Ⅰ(Class Ⅰ);Ⅱ型、Ⅴ型和Ⅵ型属于类别Ⅱ(Class Ⅱ);最具代表性的效应蛋白为Cas9(Ⅱ型)[12]、Cas12(Ⅴ型)[13]、Cas13(Ⅵ型)[14],Ⅴ型系统负责切割DNA,而Ⅵ型系统负责切割RNA。CRISPR/Cas系统的分类不仅基于Cas蛋白的结构和功能模块,还深入到其在微生物免疫中的作用机制。Class Ⅰ系统通过多亚基复合体执行功能,而Class Ⅱ系统则依赖于单一的大型多域蛋白质作为效应物。此外,CRISPR/Cas系统的模块化特性主要体现为:功能模块(如适应模块和效应模块)通过可移动遗传元件(质粒、转座子等)介导的水平基因转移在微生物间传播重组;并通过保守分子接口(如重复序列间隔位点、Cas蛋白互作界面)实现功能耦合,保持高度可替换性(如Cas9、Cas12等效应蛋白的互换),使CRISPR/Cas系统具有高度的灵活性和适应性。根据效应蛋白的不同,用于病原菌快速检测的CRISPR/Cas系统可分为:仅识别并捕获靶标但无切割活性的突变蛋白dCas9[15];gRNA激活Cas效应蛋白使其对靶标进行特异性识别和切割的Cas9及其突变蛋白Cas9nD10A[16];以及gRNA激活后,在识别靶标的同时触发非特异反式切割活性的Cas12a和Cas13a。Cas12a可视化核酸快速检测方法的原理见图2[17]。不同Cas蛋白的结构特性及其在不同病原体检测中的应用见表1。Cas9可以通过将crRNA和tracrRNA整合为单引导RNA(sgRNA),简化为简单的双组分系统,使gRNA的核苷酸序列操纵更加容易。此外,Cas12和Cas13也展示了独特的酶切活性,可以识别并切割目标核苷酸序列,并随后切割邻近的非目标序列,作为"开关"激活各种类型的报告分子。CRISPR/Cas系统有多样化的效应蛋白和分类方式,在微生物适应性进化中发挥着重要作用。该系统与微流控芯片、侧流层析试纸条、智能化检测等技术结合,在现代基因编辑技术中展现出巨大的潜力和广阔的应用前景。

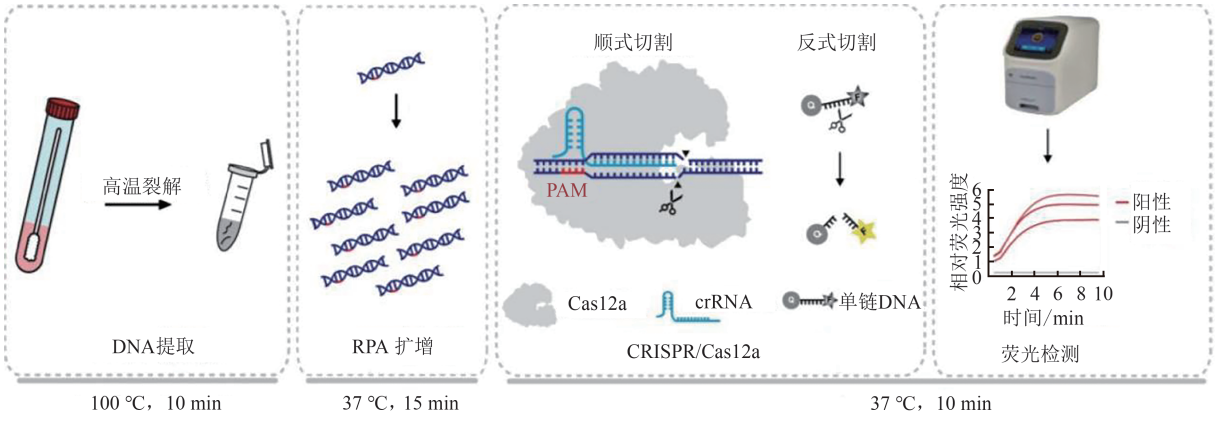



图2 Cas12a可视化核酸快速检测方法原理图

Fig. 2 Schematic diagram of Cas12a-based visual nucleic acid rapid detection method

不同的Cas效应蛋白对底物的切割存在差异,需要设计特定的gRNA来引导Cas蛋白顺式和反式切割靶标,并利用信号放大策略读取结果。其中有代表性的蛋白质为Cas9、Cas12a和Cas13a。CRISPR/Cas9系统通过gRNA和Cas9激活内切酶活性切割靶标,其中gRNA由crRNA和tracrRNA合并简化而来[18]。Cas12a和Cas13a则能分别切割DNA或RNA,展现出在目

标识别和切割方面的巨大潜力。Cas12a和Cas13a具有反式切割活性，可分别高效切割双链DNA（double-stranded DNA，dsDNA）和单链RNA（single-stranded RNA，ssRNA）。有的Cas12a被用于切割与靶标DNA互补的单链DNA（single-stranded DNA，ssDNA）报告分子[19]。具体来说，Cas12a有旁路链切割活性，当目标DNA序列存在时，它会进行非特异性跨链切割，此特性使其在生物传感系统中应用广泛。Li等[20]开发了1种基于RPA-CRISPR/Cas12a系统的新型双重信号可视化检测平台，能快速检测蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*，*B. cereus*）的6个肠毒素基因，此平台可结合荧光读取和侧流层析试纸条，LOD分别为$1\times10^{-3}$ ng/μL和$1\times10^{-4}$ ng/μL，仅需60 min即可完成检测。Guo等[21]开发了1种基于RPA-CRISPR/Cas12a系统的电化学生物传感器，结合导电纳米复合材料提高了DNA的扩增效率，实现了对食品中*S. aureus*的特异性检测，并提高了现场快速检测的可行性。Cas13a主要针对ssRNA序列，通过非特异性切割来放大信号，从而实现病毒RNA的检测。Tao等[22]开发了1种基于CRISPR/Cas13a系统的化学发光共振能量转移检测平台，通过核酸适配体和crRNA的复合物特异性识别*S. aureus*。Cas13a切割检测探针并产生化学信号，结合免疫层析试纸条，可在饮用水和牛奶中检测*S. aureus*，LOD为$1\times10^{2}$ CFU/mL。此外，超小的Cas12（如Cas12f，Cas12f即Cas14。）在核酸检测的生物传感器方面有较大潜力，被用于开发Cas12f-DETECTR核酸检测技术，可通过PT引物扩增DNA并检测ssDNA。在gRNA指引下，Cas12f切割目标DNA并触发荧光信号，实现核酸检测[23]。CRISPR/Cas系统为细菌和古菌提供了1种强大的防御外源核酸的免疫机制，也因编辑效率高和特异性强等特点，在核酸检测和基因编辑领域展现出巨大潜力[24]。

## 2　不同信号读取方法的CRISPR/Cas系统的食源性致病菌检测系统

CRISPR/Cas系统利用Cas蛋白的反式切割活性切除检测系统中的荧光信号，Cas蛋白可与各类

表1　不同Cas蛋白的结构特性及在不同病原体检测中的应用

Table 1　Structural characteristics of different Cas proteins and their application in the detection of different pathogens

| Cas蛋白 | Cas蛋白类型 | 序列类型 | gRNA类型 | 核酸酶结构域 | 靶标 | 反式切割活性 | 顺式裂解活性 | 结合技术类型 | 扩增方式 | 检测对象 | 检测时间 | LOD | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cas9 | Ⅱ | PAM | sgRNA | RuvC和HNH | dsDNA | — | dsDNA | 电化学生物传感器 | RCA | 金黄色葡萄球菌 | 1.5 h | 7 CFU/mL | [25] |
| | | PAM | sgRNA | RuvC和HNH | dsDNA | — | dsDNA | 电化学生物传感器 | RCA | 大肠杆菌 | 84 min | 10 CFU/mL | [26] |
| | | PAM | sgRNA | RuvC和HNH | dsDNA | — | dsDNA | 拉曼光谱生物传感器 | RPA | 金黄色葡萄球菌 | 45 min | 1 CFU/mL | [27] |
| | | PAM | sgRNA | RuvC和HNH | dsDNA | — | dsDNA | 拉曼光谱生物传感器 | LAMP | 沙门氏菌 | 50 min | 1 CFU/mL | [28] |
| Cas12a | Ⅴ | PAM | crRNA | RuvC | dsDNA和ssDNA | ssDNA | dsDNA或ssDNA | 比色生物传感器 | PCR | 沙门氏菌 | 45 min | 1 CFU/mL | [29] |
| | | PAM | crRNA | RuvC | dsDNA和ssDNA | ssDNA | dsDNA或ssDNA | 比色生物传感器 | LAMP | 副溶血性弧菌 | 2.5 h | 490 CFU/mL | [30] |
| | | PAM | crRNA | RuvC | dsDNA和ssDNA | ssDNA | dsDNA或ssDNA | 荧光生物传感器 | LAMP | 鼠伤寒沙门氏菌 | 2 h | 1 CFU/mL | [31] |
| | | PAM | crRNA | RuvC | dsDNA和ssDNA | ssDNA | dsDNA或ssDNA | 荧光生物传感器 | — | 鼠伤寒沙门氏菌 | 3 h | 23 CFU/mL | [32] |
| | | PAM | crRNA | RuvC | dsDNA和ssDNA | ssDNA | dsDNA或ssDNA | 拉曼光谱生物传感器 | PCR/RAA | 沙门氏菌 | 105 min | 20 CFU/mL | [33] |
| | | PAM | crRNA | RuvC | dsDNA和ssDNA | ssDNA | dsDNA或ssDNA | 拉曼光谱生物传感器 | — | 鼠伤寒沙门氏菌 | 2 h | 110 CFU/mL | [34] |
| | | PAM | crRNA | — | — | — | — | 电化学生物传感器 | RAA | 单核细胞增生李斯特菌 | 115 min | 26 CFU/mL | [24] |
| | | PAM | crRNA | — | — | — | — | 电化学生物传感器 | — | 鼠伤寒沙门氏菌 | 60 min | 160 CFU /mL | [35] |

续表

| Cas蛋白 | Cas蛋白类型 | 序列类型 | gRNA类型 | 核酸酶结构域 | 靶标 | 反式切割活性 | 顺式裂解活性 | 结合技术类型 | 扩增方式 | 检测对象 | 检测时间 | LOD | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cas12a | Ⅴ | — | — | — | — | — | — | 电化学发光生物传感器 | 等温扩增 | 沙门氏菌 | 100 min | 37 CFU/mL | [36] |
| | | PAM | crRNA | RuvC | dsDNA | ssDNA | dsDNA | 微流控生物传感器 | RPA | 鼠伤寒沙门氏菌 | 45 min | 3~4 CFU/mL | [37] |
| | | — | crRNA | — | — | — | — | 微流控生物传感器 | RAA | 金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、副溶血性弧菌、铜绿假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、阪崎克罗诺杆菌 | 1 h | ≤500 CFU/mL | [38] |
| | | PAM | — | — | ssDNA | — | — | 微流控生物传感器 | RCA | 鼠伤寒沙门氏菌 | 2 h | 19.3 CFU/mL | [39] |
| | | PAM | — | — | ssDNA | — | — | 微流控生物传感器 | LAMP | 副溶血性弧菌 | 50 min | 50 CFU/mL | [40] |
| | | — | — | — | — | — | — | 测流层析试纸条 | RAA | 金黄色葡萄球菌 | 70 min | 540 CFU/mL | [41] |
| | | — | — | — | — | — | — | 测流层析试纸条 | RAA | 金黄色葡萄球菌 | 1 h | 20 CFU/mL | [42] |
| | | — | — | — | — | — | — | 测流层析试纸条 | LAMP | 沙门氏菌属 | 90 min | 1.22 CFU/mL | [43] |
| | | — | — | — | — | — | — | 测流层析试纸条 | RPA | 蜡样芽孢杆菌 | 55 min | 10 CFU/mL | [20] |
| | | PAM | — | — | dsDNA | — | — | 微流控生物传感器 | RAA | 鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌O157:H7、单核细胞增生李斯特菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、蜡样芽孢杆菌 | 70 min | $1.66\times10^{-23}$ mol/μL | [44] |
| Cas13a | Ⅵ | PFS | crRNA | HENP | ssRNA | ssRNA | ssRNA | 微流控生物传感器 | RAA | 李斯特菌属、单核细胞增生李斯特菌、英诺克李斯特菌、伊氏李斯特菌 | 60 min | 李斯特菌属：96 CFU/mL；单核细胞增生李斯特菌：40 CFU/mL；英诺克李斯特菌：26 CFU/mL；伊氏李斯特菌：32 CFU/mL | [45] |
| | | — | crRNA | HENP | ssRNA | ssRNA | ssRNA | 荧光生物传感器 | — | 蜡样芽孢杆菌 | 20 min | 10 CFU | [46] |
| | | — | crRNA | HENP | ssRNA | — | — | 荧光生物传感器 | PCR | 金黄色葡萄球菌 | 4 h | 1 CFU/mL | [47] |

注：“—”表示无；RAA指重组酶介导扩增；等温扩增指变构探针触发的等温扩增（allosteric probe-triggered isothermal amplification）；阪崎克罗诺杆菌指*Cronobacter sakazakii*；HENP指高等真核生物和原核生物核苷酸结合；英诺克李斯特菌指*Listeria innocua*；伊氏李斯特菌指*Listeria ivanovii*。

生物传感器结合，基于各类元器件识别靶标，再通过信号转换装置将生物敏感元件与靶标分子间的相互作用转化为不同信号，借由等温核酸扩增等技术放大信号，实现检测结果可视化，检测原理见图3[48]。

CRISPR/Cas系统在生物传感器领域有2种应用：光学生物传感器和电化学生物传感器。这些传感器借助CRISPR/Cas系统对食源性致病菌特定核酸序列的精准识别能力，将生物信号高效地

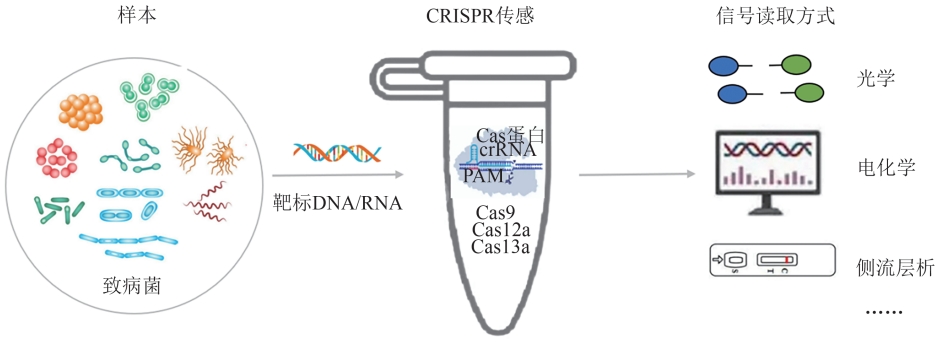



图3　基于CRISPR/Cas系统的检测原理图

Fig. 3　Detection schematic diagram based on CRISPR/Cas system

转化为光学或电化学信号，从而达成对致病因子的检测判定。

### 2.1　光学信号读取

光学生物传感器依据不同的检测原理和信号输出形式可以进一步细分，主要分为比色生物传感器、荧光生物传感器以及拉曼光谱生物传感器。比色生物传感器通过颜色变化直观地指示食源性致病菌的存在；荧光生物传感器依靠荧光信号的产生或变化来精确定位靶标致病菌；拉曼光谱生物传感器则利用拉曼光谱的特征峰识别与食源性疾病相关的生物分子。这些光学生物传感器的应用，为食源性致病菌的检测提供了多样化的方法，增强了食品安全检测的准确性和便捷性。

#### 2.1.1　比色生物传感器

CRISPR/Cas系统比色生物传感器利用反应系统产生的颜色变化定量检测病原体[49]。在食源性致病菌检测领域，基于纳米材料的生物传感器在食源性致病菌检测中备受关注。Ma等[29]利用纳米金等良好的比色和光热特性，结合CRISPR/Cas12a系统开发了1种双模式生物传感器，通过扩增*Salmonella*的特异型基因*invA*，激发Cas12a与ssDNA相连的AuNP探针产生荧光，见图4(a)。该传感器的LOD低至1 CFU/mL。Chen等[30]开发了1种基于CRISPR/Cas12a系统和G-四链体过氧化物酶的生物传感器，用于检测虾中的*V. parahaemolyticus*。该技术能通过颜色变化实现对靶标的检测，此类技术便于现场使用，为食品安全检测提供了新的工具。

#### 2.1.2　荧光生物传感器

基于CRISPR/Cas系统的荧光生物传感器可实现食源性致病菌的高灵敏度检测。根据是否进行靶标扩增，可分为需要核酸扩增和无需核酸扩增2类。核酸扩增生物传感器通过LAMP等技术提高灵敏度，Ma等[31]开发了1种比例荧光生物传感器，见图4(b)，可检测食物中的*S. typhimurium*，检测范围为$1\times10^{0}$~$1\times10^{8}$ CFU/mL，检测时间为2 h。该传感器利用LAMP技术扩增基因*invA*，激活Cas12a的反式切割活性，LAMP技术以其快速、简便、成本低廉的特点，在基层快速检测中有显著优势，尤其适合资源有限的地区[50]。Chen等[32]开发了1种基于CRISPR/Cas12a系统与*Pf*Ago介导级联信号放大的双酶级联扩增(double-enzyme cascade amplification，DECA)的核酸检测平台，见图4(c)。该平台利用*Pf*Ago核酸酶放大信号实现对*S. typhimurium*的检测，当*S. typhimurium*与Cas12a-crRNA复合物结合后，可激活DECA平台的级联反应，该方法的LOD为23 CFU/mL。基于CRISPR/Cas系统的荧光生物传感器在食源性致病菌检测中具有较大的应用潜力。这种结合了生物识别和信号转换技术的传感器，在食品安全检测、疾病诊断和环境监测等领域展现出广泛的应用前景。

#### 2.1.3　拉曼光谱生物传感器

拉曼光谱生物传感器是1种基于拉曼散射效应的生物传感器，能够提供物质的分子信息，具有高灵敏度、高选择性等特点。目前，拉曼光谱生物传感器在食品安全领域应用广泛，此类传感器利用表面增强拉曼光谱(surface enhanced raman spectroscopy，SERS)技术，实现了食品和饮用水中有机小分子等物质的高灵敏度检测。Jiang等[28]建立了dCas9介导的比色和SERS双模式检测平台，可检测卷心菜、牛奶、鸡蛋等样品中的*Salmonella*，LOD低至1 CFU/mL，检测时间不超过50 min。Wang等[27]采用拉曼报告基因修饰金属表面的传感策略，将金纳米星包被Ag，并与巯基化的DNA偶联成AuNS@Ag探针，结合侧流层析试纸条，开

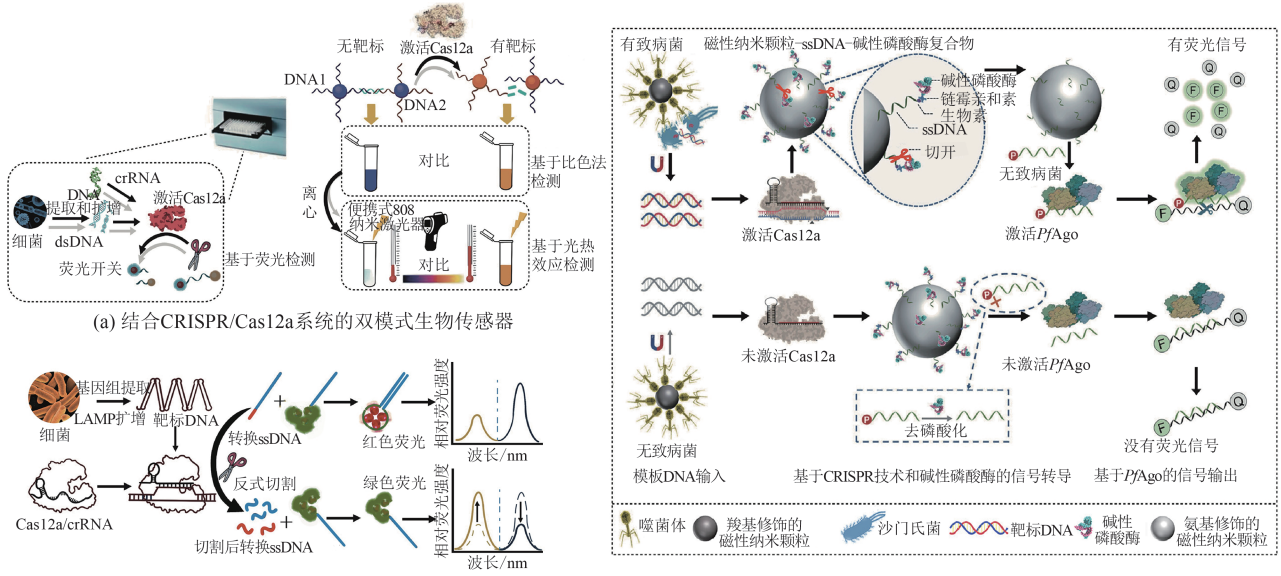



图 4　基于 CRISPR/Cas 系统的光学生物传感器

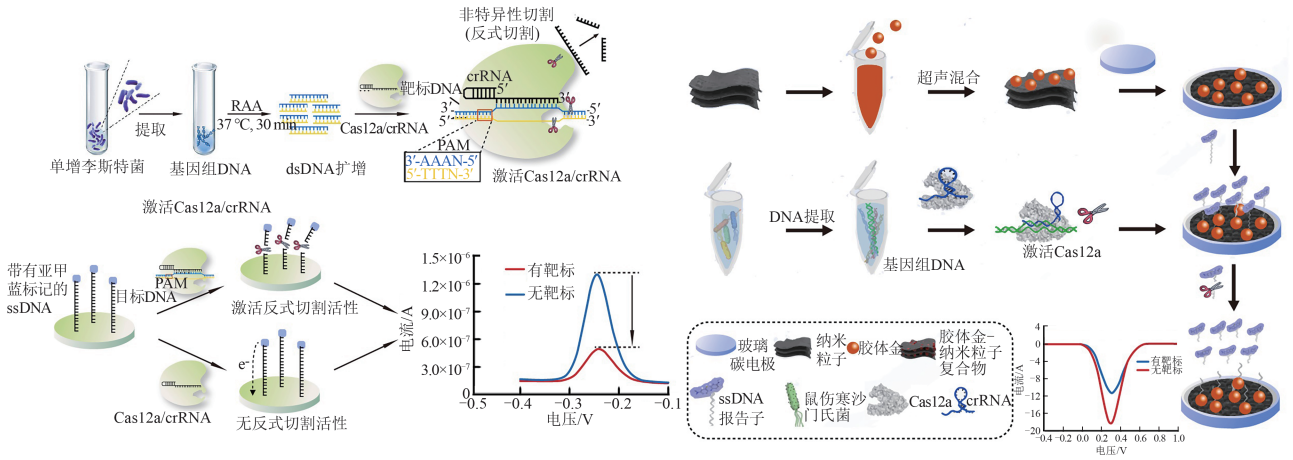
Fig. 4　Optical biosensors based on CRISPR/Cas system

发了 1 种 CRISPR/Cas9 系统介导的 SERS 比色双模式平台。此平台可检测样品中 *S. aureus* 的含量，检测时间少于 45 min，LOD 低至 1 CFU/mL。CRISPR-SERS 生物传感器结合了 2 种技术的优点，极大提高了检测的灵敏度和特异性，有良好的发展前景。

### 2.2　电化学信号读取

基于 CRISPR/Cas 系统的电化学生物传感器是将 CRISPR/Cas 系统的分子识别能力与电化学信号转换相结合，用于检测病原体。电化学生物传感器通过分析靶标表面探针的构象变化和接触介导的电子传递距离变化来诱导检测器电化学信号的改变，实现其对靶标的检测。Li 等[24]开发了 1 种基于 CRISPR/Cas12a 系统的超灵敏电化学生物传感器，见图 5(a)；该传感器可检测 *L. monocytogenes*，LOD 为 26 CFU/mL，检测范围为 $2.6\times10^{1}$~$6.0\times10^{9}$ CFU/mL。Duan 等[35]开发了 1 种胶体金-纳米粒子复合物驱动的电化学生物传感器，可检测样品中的 *S. typhimurium*，见图 5(b)；该传感器 LOD 为 160 CFU/mL，且对其他病原体有高特异性。该研究还通过在鸡肉样品中模拟带菌情况，评估了传感器的实用性。与基于 CRISPR/Cas 系统的光学生物传感器相比，电化学生物传感器可通过修改电极显著提升性能，具有高特异性、高灵敏度、低检测成本的特性。此外，此类传感器无需对样品进行前处理，操作简便，适合现场快速检测。

微流控技术通过在微电极阵列上对离散液滴进行精准操控，实现了样本处理和分析的自动化和微型化。该技术具有试剂消耗少、反应体积小、传热速率快等优点。曹宁等[51]基于磁珠核酸提取法，设计了 1 种微流控芯片，用于提取多种食源性致病菌的 DNA。该技术实现了多种病原体的核酸提取，为后续的 PCR 扩增和凝胶电泳检测提供了可靠的基础。此外，通过将 CRISPR/Cas 系统与微流控芯片相结合，可开发出在单一平台上执行多个操作单元的智能化生物传感器[52-54]。Xiang 等[45]建立了 1 种基于 RAA 和 CRISPR/Cas13a 系统的双信号放大高通量微流控生物传感器，可同时检测 4 个靶标，见图 6(a)。该传感器 LOD 为 $1\times10^{-18}$ mol/L，可在 60 min 内完成检测。此外，该团队还利用 CRISPR/Cas12a 系统、免疫磁分离和 RCA 等技术与微流控芯片结合，开发出 1 种可用于现场检测 *S. typhimurium* 的手指驱动微流控生物传感器，见图 6(b)。该传感器使 *S. typhimurium* 的检测时间缩短到 2 h 以内，且 LOD 为 11 CFU/mL[39]。Xing 等[38]利用 RAA-CRISPR/Cas12a 设计了 1 种手指驱动微流控生物传感器，可多重检测 7 种食源性致病菌，检测时间少于 1 h，LOD 低至 500 CFU/mL。Shang 等[44]将 3 种颜色的染料组合，基于 CRISPR/Cas13a 系统开发的微流控生物传感器也可同时检测 7 种食源性致病菌，该传感器的 LOD 为 $1.66\times10^{-23}$~$1.66\times10^{-19}$ mol/μL。

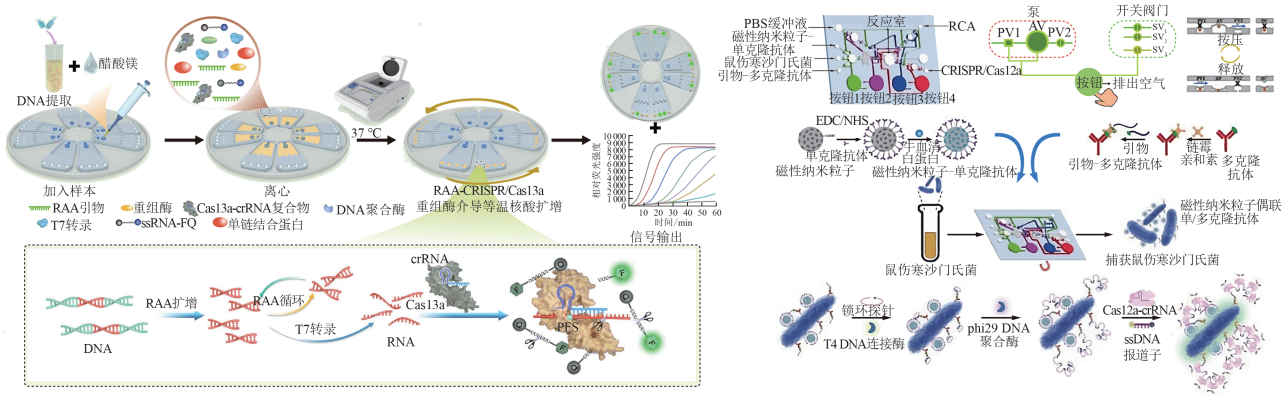



(a) 基于CRISPR/Cas12a系统的电化学生物传感器　　(b) 胶体金-纳米粒子复合物驱动的电化学生物传感器

图5　基于CRISPR/Cas系统的电化学生物传感器

Fig. 5　Electrochemical biosensors based on CRISPR/Cas system

将微流控平台与CRISPR/Cas系统结合开发生物传感器有巨大的潜力，但仍面临一些挑战，例如进一步提高靶标检测的灵敏度和特异性。未来可以探索建立新的CRISPR/Cas系统或开发新型生物传感技术，以提高传感器的检测灵敏度和特异性，获得成本低、效益高的即时检测设备。




(a) 高通量微流控生物传感器　　(b) 手指驱动微流控生物传感器

图6　基于CRISPR/Cas系统的微流控生物传感器

Fig. 6　Microfluidic biosensors based on CRISPR/Cas system

## 2.3　侧向流动读数

传统的侧流层析技术在致病菌检测中有一定的局限：易产生假阳性结果，操作复杂，需要长时间的增菌过程等，这些都将限制此类技术的推广。为解决此类问题，有研究者将CRISPR/Cas9系统与侧流层析技术结合，开发出CRISPR/Cas9系统介导的侧流核酸分析法[55]，胶体金试纸条装配图见图7(a)。此技术能在1 h内检测多种病原体，如*L. monocytogenes*，且具有高特异性、低成本、快速、便携等优点。基于CRISPR/Cas系统的侧流层析试纸条可利用Cas9或Cas12a，通过特定gRNA识别并切割靶标DNA，实现对特定靶标的高灵敏度检测。Qian等[42]将CRISPR/Cas12a系统与胶体金侧流层析试纸条结合建立了*S. aureus*的快速检测平台，CRISPR-侧流试纸条检测平台(CRISPR-lateral flow strip detection platform，CRISPR-LF)，提高了试纸条的检测灵敏度，见图7(b)。Zhou等[41]以量子点为荧光材料，结合CRISPR/Cas12a系统与RAA设计了1种基于CRISPR/Cas-重组酶辅助扩增的侧流生物传感器(CRISPR/Cas-recombinase-assisted amplification based lateral flow biosensor，CRA-LFB)，可即时检测食物中的*S. aureus*，见图7(c)。该检测平台

操作简单、成本低、几乎不需要使用设备，完全符合食品和临床诊断现场的检测要求。综上，基于CRISPR/Cas系统开发的侧流层析试纸条在病原体检测中具有高灵敏度、强特异性、低成本、快速且便携的优点，这将对病原体的即时检测提供技术支撑，见图8。

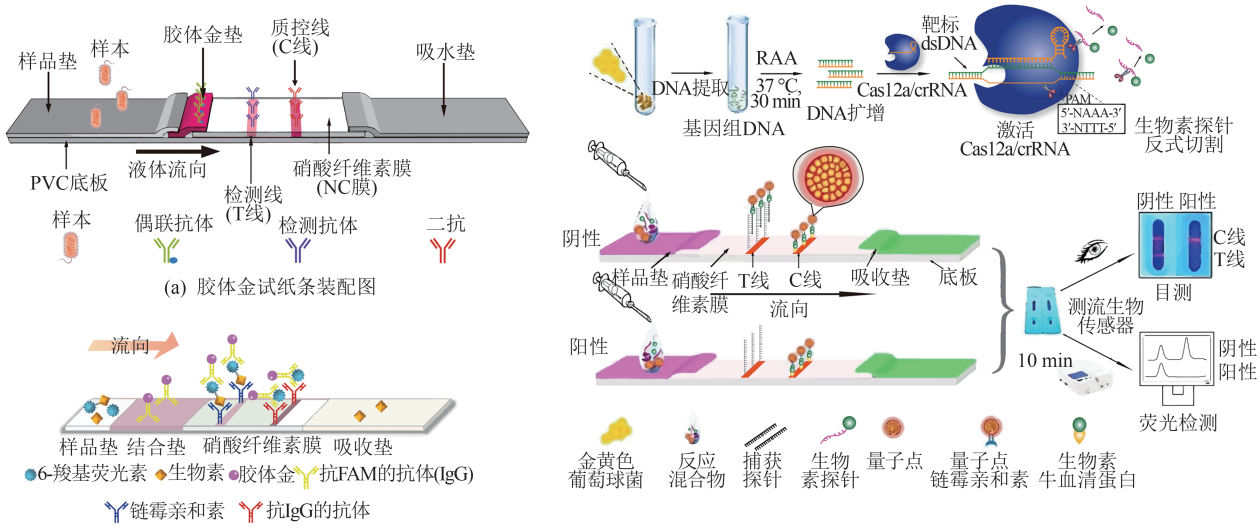



图7　基于CRISPR/Cas系统的侧流层析试纸条

Fig. 7　Side-flow chromatography strips based on CRISPR/Cas system

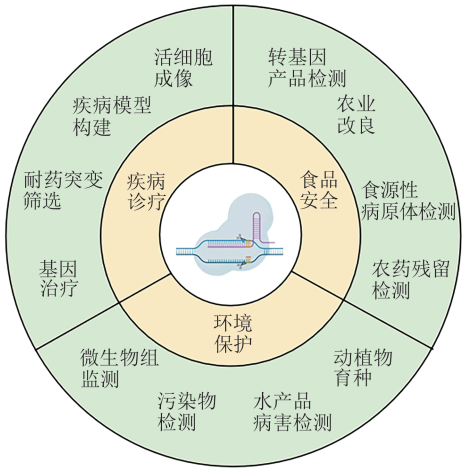



图8　基于CRISPR/Cas系统的生物传感器的检测领域

Fig. 8　The detection fields of biosensors based on CRISPR/Cas system

## 3　展望

与传统的检测技术相比，基于CRISPR/Cas系统的生物传感器可实现高特异性和高灵敏度的快速检测。通过与多种快速扩增技术结合，CRISPR/Cas系统实现了检测结果的可视化和高通量处理。然而，该领域仍面临以下挑战。

1）食品基质的复杂性。食源性致病菌检测易受到Cas蛋白的活性和检测灵敏度的限制。例如，食品中的蛋白质、多糖和其他生物分子可能与Cas蛋白相互作用，从而影响其对靶标的识别和切割效率。因此，未来的研究方向可以包括筛选对食品基质具有更高稳定性和特异性的Cas蛋白。

2）样本中靶标数目和低检测限的需求。为了实现靶标的检测，往往需要长时间的预扩增过程，这不仅增加了时间成本，还可能引入非特异性扩增产物。因此，开发免扩增的基于CRISPR/Cas系统的检测方法是解决此问题的有效手段。例如，利用多重crRNA策略增强CRISPR/Cas12a系统的检测灵敏度[56]，以及开发基于微孔阵列的数字CRISPR/Cas系统辅助检测技术实现单分子水平的RNA检测[57]。这些方法均无需复杂的样本预处理和扩增步骤。

3）区分死菌和活菌的难题。虽然有研究通过结合*Pf*Ago和CRISPR/Cas12a系统实现了对活菌的超灵敏检测，但这种方法的应用仍需进一步优化。CRISPR/Cas12a系统识别靶标后，会激活其非特异性ssDNA的切割活性，该特性可用于开发具有双重或多重检测模式的生物传感器。Fu等[58]通过结合不同的信号输出机制，如颜色变化或光热效应，成功区分了活菌和死菌，为未来检测技术的发展提供了新的思路。

4）集成化CRISPR/Cas系统生物传感器平台的开发。目前多数检测技术依赖于专业设备，为了解决此问题，国内外学者正积极开发集成化的CRISPR/Cas系统生物传感器平台，例如芯片实验室技术等。这类平台的开发不仅能检测单一样本，还能快速精准地把控食品质量与安全，满足大规模样本检测的需求，推动食品行业健康发展。

5）扩增和Cas蛋白对报道子切除的阈值选择是限制该项技术应用的瓶颈。未来可通过合理设计gRNA和对Cas蛋白进行工程化改造，提高CRISPR/Cas系统的特异性，降低其脱靶效率。例如，开发不同种类的Cas蛋白，如Cas12f、Cas12c等，以提高酶切活性；发展多种适配体结合技术分析检测样本中死菌、活菌的数目；结合不同类型的微流控芯片，实现单靶标或单细胞检测。基于CRISPR/Cas系统的生物传感器与不同技术的交叉，有望开发出检测限低、成本低、灵敏度高且集成化的快速检测平台，以满足未来的检测需求。

总之，基于CRISPR/Cas系统的食源性致病菌靶标检测技术的开发和应用，对检测领域尤为重要。尽管这些技术应用范围很广，但目前利用CRISPR系统来检测食源性致病菌仍然面临巨大挑战。在未来的研究中，核酸扩增技术需持续以集成化、高通量、多通道与便捷化为核心发展方向。一方面，应深度融合电化学、荧光等信号读取技术，推动其向实际检测场景落地应用；另一方面，需通过优化样本前处理策略、创新多靶标协同检测及新技术应用思路、开发集成化定量便携式设备等路径，全面提升检测效率，从而精准满足食源性致病菌实际检测的多样化需求。

## 参考文献


[1] MATHER A E，GILMOUR M W，REID S W J，et al. Foodborne bacterial pathogens：genome-based approaches for enduring and emerging threats in a complex and changing world[J]. Nature Reviews Microbiology，2024，22(9)：543-555.

[2] 孙秀兰，付旭冉，鲍琦，等. 新一代诊断技术：CRISPR系统及其在分子诊断中的应用[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(7)：57-70.
SUN X L，FU X R，BAO Q，et al. Next generation diagnostic technology：CRISPR system and its application in molecular diagnostics[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(7)：57-70.(in Chinese)

[3] LI X，ZHANG X L，SHI X L，et al. Review in isothermal amplification technology in food microbiological detection[J]. Food Science and Biotechnology，2022，31(12)：1501-1511.

[4] LI R，SHI J X，LIU B，et al. Inter-laboratory validation of visual loop-mediated isothermal amplification assays for GM contents screening[J]. Food Chemistry，2019，274：659-663.

[5] ZENG D D，JIAO J L，MO T L. Combination of nucleic acid amplification and CRISPR/Cas technology in pathogen detection[J]. Frontiers in Microbiology，2024，15：1355234.

[6] SONG J Z，LIU C C，MAUK M G，et al. Two-stage isothermal enzymatic amplification for concurrent multiplex molecular detection[J]. Clinical Chemistry，2017，63(3)：714-722.

[7] VAN DONGEN J E，BERENDSEN J T W，STEENBERGEN R D M，et al. Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection：recent advances，challenges and opportunities[J]. Biosensors and Bioelectronics，2020，166：112445.

[8] 王芳妹，徐越，林丹，等. 包装饮用水中铜绿假单胞菌实时荧光定量PCR快速检测[J]. 食品与机械，2023，39(6)：75-80.
WANG F M，XU Y，LIN D，et al. Study on the rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time fluorescence quantitative PCR in packaged drinking water[J]. Food & Machinery，2023，39(6)：75-80.(in Chinese).

[9] LI G D，WANG J J，TIAN L，et al. Rapid and ultrasensitive detection of *Staphylococcus aureus* by a one-pot system integrating *Pyrococcus furiosus* argonaute with loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology，2025，35：e2504034.

[10] LIU Y，XIA W Q，ZHAO W，et al. RT-RPA-*Pf*Ago system：a rapid，sensitive，and specific multiplex detection method for rice-infecting viruses[J]. Biosensors，2023，13(10)：941.

[11] MAKAROVA K S，WOLF Y I，IRANZO J，et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems：a burst of class 2 and derived variants[J]. Nature Reviews Microbiology，2020，18(2)：67-83.

[12] MACHUCA B，BIANCHI J. Aplicação do CAR-T cell e CRISPR/Cas9 no tratamento de mieloma múltiplo recidivado e/ou refratário[J]. Hematology，Transfusion and Cell Therapy，2023，45(Suppl.4)：S410-S411.

[13] LI S Y，CHENG Q X，LIU J K，et al. CRISPR-Cas12a has both *cis*- and *trans*-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. Cell Research，2018，28：491-493.

[14] 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.

[15] YANG Y，ZHAI S S，ZHANG L，et al. A gold nanoparticle-enhanced dCas9-mediated fluorescence resonance energy transfer for nucleic acid detection[J]. Talanta，2025，282：126978.

[16] NAWALY H，TSUJI Y，MATSUDA Y. Rapid and precise

genome editing in a marine diatom, *Thalassiosira pseudonana* by Cas9 nickase (D10A)[J]. Algal Research, 2020,47:101855.

[17] YU D H, LIANG B, XU H P, et al. CRISPR/Cas12a-based assay for the rapid and high-sensitivity detection of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant women with premature rupture of membrane[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2023, 22(1):8.

[18] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18:67-83.

[19] CHEN J S, MA E B, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360 (6387):436-439.

[20] LI P R, WANG Z X, XU Z K, et al. An RPA-assisted CRISPR/Cas12a assay combining fluorescence and lateral flow strips for the rapid detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(24):14000-14010.

[21] GUO Y Q, LI C, GUO W, et al. Advanced electrochemical biosensing toward *Staphylococcus aureus* based on the RPA-CRISPR/Cas12a system and conductive nanocomposite[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(41):22918-22925.

[22] TAO X Q, YUE L, TIAN T, et al. Sensitive and on-site detection of *Staphylococcus aureus* based on CRISPR/Cas 13a-assisted chemiluminescence resonance energy transfer[J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(22):9270-9277.

[23] 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.

[24] LI F, YE Q H, CHEN M T, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 179:113073.

[25] ZHEN D S, ZHANG S Q, YANG A F, et al. A supersensitive electrochemical sensor based on RCA amplification-assisted "silver chain" -linked gold interdigital electrodes and CRISPR/Cas9 for the detection of *Staphylococcus aureus* in food[J]. Food Chemistry, 2024, 440:138197.

[26] ZHANG J L, ZHOU M, MAO B Y, et al. The construction of COFs functionalized CRISPR electrochemical sensor for ultrasensitive detection of bacteria by hyper-branched rolling circle amplification[J]. Sensors and Actuators B:Chemical, 2024, 409:135610.

[27] WANG J F, JIANG H, CHEN Y H, et al. CRISPR/Cas9-mediated SERS/colorimetric dual-mode lateral flow platform combined with smartphone for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2024, 249:116046.

[28] JIANG H, CHANG W, ZHU X F, et al. Development of a colorimetric and SERS dual-signal platform *via* dCas9-mediated chain assembly of bifunctional Au@Pt nanozymes for ultrasensitive and robust *Salmonella* assay [J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(31):12684-12691.

[29] MA L, PENG L, YIN L J, et al. CRISPR-Cas12a-powered dual-mode biosensor for ultrasensitive and cross-validating detection of pathogenic bacteria[J]. ACS Sensors, 2021, 6(8):2920-2927.

[30] CHEN X Y, WANG L, HE F, et al. Label-free colorimetric method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* by trimming the G-quadruplex DNAzyme with CRISPR/Cas12a[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(42):14300-14306.

[31] MA L, WANG J J, LI Y R, et al. A ratiometric fluorescent biosensing platform for ultrasensitive detection of *Salmonella typhimurium via* CRISPR/Cas12a and silver nanoclusters[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 443:130234.

[32] CHEN R, ZHAO J P, HAN M J, et al. DNA extraction- and amplification-free nucleic acid biosensor for the detection of foodborne pathogens based on CRISPR/Cas12a and argonaute protein-mediated cascade signal amplification [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(46):18037-18045.

[33] WANG Y S, DU P F, SHAO Y C, et al. An innovative and efficient fluorescent detection technique for *Salmonella* in animal-derived foods using the CRISPR/Cas12a-HCR system combined with PCR/RAA[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(15):8831-8839.

[34] JIA F, LI B Y, HE Y W, et al. An amplification-free CRISPR-SERS biosensor for specific, sensitive and rapid detection of *Salmonella typhimurium* in poultry[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 189:115476.

[35] DUAN M L, LI B Y, HE Y W, et al. A CG@MXene nanocomposite-driven E-CRISPR biosensor for the rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* in food [J]. Talanta, 2024, 266(1):125011.

[36] WANG C Y, ZHANG Y T, LIU S S, et al. Allosteric probe-triggered isothermal amplification to activate CRISPR/Cas12a for sensitive electrochemiluminescence detection of *Salmonella*[J]. Food Chemistry, 2023, 425:136382.

[37] ZHUANG J W, ZHAO Z Y, LIAN K, et al. 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.

[38] XING G W, SHANG Y T, WANG X R, et al.

Multiplexed detection of foodborne pathogens using one-pot CRISPR/Cas12a combined with recombinase aided amplification on a finger-actuated microfluidic biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics，2023，220：114885.

[39] XIANG X R，XING G W，LIU Y T，et al. Immunomagnetic separation combined with RCA-CRISPR/Cas12a for the detection of *Salmonella typhimurium* on a figure-actuated microfluidic biosensor [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2023，71(36)：13518-13526.

[40] WU H，CHEN Y J，YANG Q Q，et al. A reversible valve-assisted chip coupling with integrated sample treatment and CRISPR/Cas12a for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Biosensors and Bioelectronics，2021，188：113352.

[41] ZHOU B Q，YE Q H，LI F，et al. CRISPR/Cas12a based fluorescence-enhanced lateral flow biosensor for detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Sensors and Actuators B：Chemical，2022，351：130906.

[42] QIAN J J，HUANG D，NI D S，et al. A portable CRISPR Cas12a based lateral flow platform for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* with double insurance [J]. Food Control，2022，132：108485.

[43] LEE S Y，OH S W. Lateral flow biosensor based on LAMP-CRISPR/Cas12a for sensitive and visualized detection of *Salmonella* spp.[J]. Food Control，2023，145：109494.

[44] SHANG Y T，XING G W，LIN J X，et al. Multiplex bacteria detection using one-pot CRISPR/Cas13a-based droplet microfluidics[J]. Biosensors and Bioelectronics，2024，243：115771.

[45] XIANG X R，LI F，YE Q H，et al. High-throughput microfluidic strategy based on RAA-CRISPR/Cas13a dual signal amplification for accurate identification of pathogenic *Listeria* [J]. Sensors and Actuators B：Chemical，2022，358：131517.

[46] ZHANG T，ZHOU W H，LIN X Y，et al. Light-up RNA aptamer signaling-CRISPR-Cas13a-based mix-and-read assays for profiling viable pathogenic bacteria [J]. Biosensors and Bioelectronics，2021，176：112906.

[47] ZHOU J，YIN L J，DONG Y N，et al. CRISPR-Cas13a based bacterial detection platform：sensing pathogen *Staphylococcus aureus* in food samples [J]. Analytica Chimica Acta，2020，1127：225-233.

[48] 陈欢，王宇，黄钰，等. 基于CRISPR/Cas系统的病原微生物检测体系构建研究进展[J]. 微生物学报，2022，62(9)：3271-3288.
CHEN H，WANG Y，HUANG Y，et al. Research progress in construction of pathogenic microorganism detection system based on CRISPR/Cas system[J]. Acta Microbiologica Sinica，2022，62（9）：3271-3288.（in Chinese）

[49] YANG Y J，LI X Y，WANG X B，et al. CRISPR-Cas-based colorimetric strategies for nucleic acids detection[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry，2025，182：118058.

[50] CREGO-VICENTE B，DEL OLMO M D，MURO A，et al. Multiplexing LAMP assays：a methodological review and diagnostic application [J]. International Journal of Molecular Sciences，2024，25(12)：6374.

[51] 曹宁，申炳阳，喻梓瑄，等. 用于3种食源性致病菌核酸提取的微流控芯片制备[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(1)：28-35.
CAO N，SHEN B Y，YU Z X，et al. Microfluidic chip for nucleic acid extraction of three food-borne pathogenic bacteria[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(1)：28-35.（in Chinese）

[52] SHU T W，YIN X E，XIONG Q Y，et al. Lift-CM：an integrated lift-heater centrifugal microfluidic platform for point-of-care pathogen nucleic acid detection using isothermal amplification and CRISPR/Cas12a [J]. Biosensors and Bioelectronics，2025，274：117178.

[53] GHRERA A S，PANDEY C M，MALHOTRA B D. Multiwalled carbon nanotube modified microfluidic-based biosensor chip for nucleic acid detection[J]. Sensors and Actuators B：Chemical，2018，266：329-336.

[54] LI X T，WANG T Y，LIU X H，et al. Advances of engineered microfluidic biosensors *via* CRISPR/Cas in bacteria and virus monitoring[J]. Chemical Engineering Journal，2024，491：152038.

[55] BOEHRINGER H R，O'FARRELL B J. Lateral flow assays in infectious disease diagnosis [J]. Clinical Chemistry，2022，68(1)：52-58.

[56] ZENG M C，KE Y Q，ZHUANG Z Y，et al. Harnessing multiplex crRNA in the CRISPR/Cas12a system enables an amplification-free DNA diagnostic platform for ASFV detection [J]. Analytical Chemistry，2022，94（30）：10805-10812.

[57] WANG D，WANG X D，YE F D，et al. An integrated amplification-free digital CRISPR/Cas-assisted assay for single molecule detection of RNA[J]. ACS Nano，2023，17(8)：7250-7256.

[58] FU R J，XIANYU Y L. Gold nanomaterials-implemented CRISPR-Cas systems for biosensing[J]. Small，2023，19(21)：2300057.

（责任编辑：金文苑）