

# 基于CRISPR 2类V型系统的检测技术开发 与研究进展

李宏宇<sup>#</sup> 黄诗晴<sup>#</sup> 郑巍巍 欧阳松应<sup>\*</sup>

(福建师范大学生命科学学院, 福州 350117)

**摘要** 核酸检测技术以其灵敏度高、特异性强的特点, 广泛应用于病原体检测中, 在公共卫生管理和临床治疗决策等场景中发挥重要作用。基于CRISPR 2类V型系统的核酸检测技术, 同时还具备检测方式简单、检测时间短的特点, 具有良好的发展前景。该文简要介绍CRISPR 2类V型系统的组成、结构、功能与作用机制, 总结已开发的基于不同V型Cas蛋白的众多检测平台以及这些检测平台的应用场景, 并对其未来发展进行简要述评。

**关键词** CRISPR-Cas系统; 核酸检测; 病原微生物检测

## Development and Research of Nucleic Acid Detection Technology based on Class 2 Type V CRISPR-Cas System

LI Hongyu<sup>#</sup>, HUANG Shiqing<sup>#</sup>, ZHENG Weiwei, OUYANG Songying<sup>\*</sup>

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

**Abstract** Nucleic acid detection technology is widely used in pathogen detection due to its high sensitivity and strong specificity, and plays an important role in public health management and clinical treatment decision making. Moreover, detection technology based on Class 2 type V CRISPR-Cas system possesses attributes such as simplicity, rapidity, and exhibits promising potential for further applications. This review provides a concise overview of the composition, structure, function, and mechanism of the Class 2 type V CRISPR-Cas system. It further highlights the various nucleic acid detection platforms developed using different V-type Cas proteins and discusses their corresponding application scenarios, concluding with a brief outlook on their future prospects.

**Keywords** CRISPR-Cas system; nucleic acid detection; pathogenic microorganism detection

CRISPR-Cas系统是广泛存在于细菌和古细菌中的一种适应性免疫系统, 是原核生物天然的自我防御机制之一, 可对外界入侵的核酸类物质进行切割<sup>[1]</sup>。CRISPR-Cas系统根据效应蛋白的数量可分为两大类: 第一大类是由多个Cas蛋白组成的效应器复合体; 第二大类由单一Cas蛋白行使效应器复合体的

功能, 包括三个亚型: II型、V型和VI型(相应的效应蛋白分别为Cas9、Cas12和Cas13)<sup>[2-6]</sup>, 其中II型、V型具有脱氧核糖核酸酶活性, VI型具有核糖核酸酶活性。

2012年JINEK等<sup>[7]</sup>发现CRISPR-Cas9是由可编程的RNA指导并对特定靶标DNA位点进行切割的

收稿日期: 2023-11-08

接受日期: 2023-12-20

国家自然科学基金(批准号: 31770948)和福建省自然科学基金(批准号: 2022J01638)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通信作者。Tel: 0591-22868199, E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

Received: November 8, 2023

Accepted: December 20, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31770948) and Fujian Natural Science Foundation Project (Grant No.2022J01638)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-591-22868199, E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

核酸内切酶。2013年MALI等<sup>[8]</sup>首次实现CRISPR-Cas9在哺乳动物细胞中的基因编辑。自此基于CRISPR-Cas9的基因编辑工具在各方面得到广泛的应用<sup>[9]</sup>。由于CRISPR-Cas在基因组编辑领域的重要意义,该技术于2020年获得诺贝尔化学奖<sup>[10]</sup>。

2015年9月,ZHANG团队<sup>[11]</sup>发现了CRISPR-Cas系统二类V型的一名新成员,并将它命名为Cpf1(Cas12a)。与Cas9不同,Cas12a能够在不需要反式激活crRNA(*trans*-activating crRNA, tracrRNA)的帮助下独立介导前体crRNA(precursor CRISPR RNA, pre-crRNA)转变成crRNA(CRISPR RNA),这丰富了CRISPR-Cas系统在基因组编辑应用上的不同手段。2018年DOUDNA实验室<sup>[12]</sup>和LI等<sup>[13]</sup>发现Cas12a在识别并切割靶标序列的同时还附带对环境中的单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)进行非特异性的切割。利用Cas12a这一特性,该团队开发出CRISPR-Cas12a的检测平台DETECTR。自此,除在基因组编辑外,CRISPR-Cas系统在核酸检测<sup>[14]</sup>、化学递送、环境监测等方面<sup>[15]</sup>也显示出巨大的应用前景。2019年新冠疫情的全球蔓延,基于CRISPR 2类V型系统的核酸诊断平台显示出巨大的应用<sup>[16-17]</sup>潜力。它可以快速地、特异性地、灵敏地从样本中检测出目的核酸,并且这些诊断设备可便携移动<sup>[18-21]</sup>。本文就基于CRISPR 2类V型系统的核酸检测技术的开发与应用进展进行简要综述。

## 1 Cas12a

第二大类的CRISPR-Cas系统是由单个蛋白组成的效应器模块,约占CRISPR-Cas系统基因座的10%<sup>[22]</sup>。到目前为止,CRISPR-Cas V型家族包括Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas12j、Cas12k、Cas12l、Cas12m和Cas12n等多种效应蛋白<sup>[16,23]</sup>,这些蛋白中,Cas12f最小,400~700个氨基酸;Cas12a蛋白最大,有1 200~1 500个氨基酸,切割底物不同(大

部分识别并切割DNA,而Cas12g识别并切割RNA),大多都具有RuvC核酸酶结构域。下文以Cas12a作用机制为例,概述V型系统识别与剪切目的基因的原理。

### 1.1 Cas12a结构

Cas12a由核酸酶叶(nuclease lobe, NUC)和识别叶(recognition lobe, REC)组成双叶结构,两个叶之间通过WED(Wedge)结构域相连接。NUC叶由RuvC结构域、PI(PAM-interacting)结构域、WED结构域和NUC结构域共同组成(图1)。PI结构域在原间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)识别中起到重要作用;RuvC内切酶结构域由三个不连续部分(RuvC I~III)组成,介导底物切割的三个活性基团,D908、E993与D1263均位于RuvC结构域;处理自身crRNA的RNase位点位于WED-III亚结构域。REC叶由REC1结构域和REC2结构域共同组成,这两个结构域起到辅助crRNA靶向识别DNA的作用<sup>[24-26]</sup>。Cas12a的成熟crRNA长度为42~44 nt,其5'端为19~20 nt的重复序列(repeat sequence),重复序列在其3'端形成发夹结构;3'端为23~25 nt的间隔序列(spacer sequence),间隔序列通过碱基互补配对的方式识别靶DNA。

### 1.2 CRISPR-Cas12a抵御外源基因的作用机制

在CRISPR-Cas12a系统中,CRISPR-Cas12a系统的防御机制可以分为三个阶段。

适应阶段。当外源基因首次入侵细菌时,Cas1与Cas2蛋白复合体切割目的基因的原间隔序列(protospacer),并将它插入自身基因组的CRISPR阵列中。此外在外源基因中临近原间隔序列5'端的一段DNA序列被称为PAM,可用于区分自身基因组和外来核酸片段。Cas12a的PAM序列富含胸腺嘧啶<sup>[11,27]</sup>。

crRNA形成阶段。当CRISPR阵列转录形成pre-crRNA时,Cas12a会在重复区域发夹结构的上游4 nt处将pre-crRNA切割,产生中间crRNA(intermediate crRNA),这些中间crRNA分子在体内进一步加工成成熟的crRNA,成熟的crRNA与Cas12a结合形成

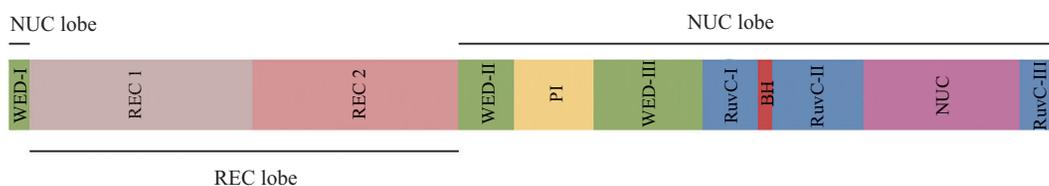


图1 Cas12a结构域划分示意图(根据参考文献[24]修改)

Fig.1 Domain organization of Cas12a (modified from reference [24])

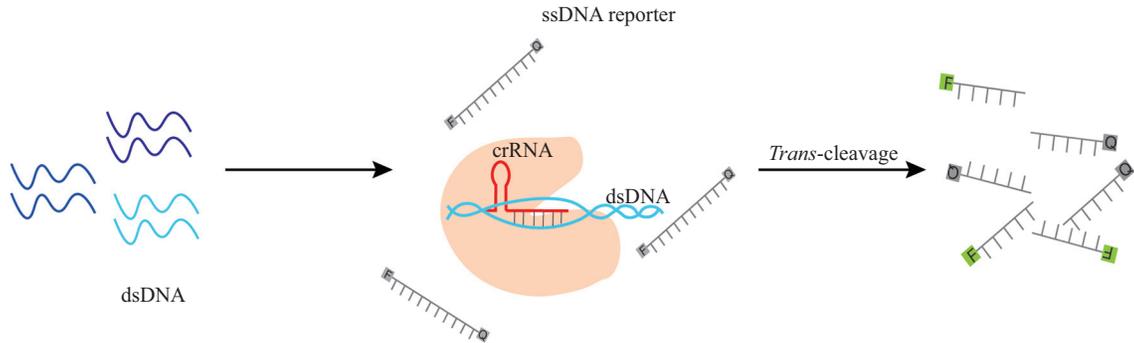


图2 CRISPR-Cas系统核酸检测原理示意图

Fig.2 Nucleic acid detection principle based on CRISPR-Cas system

crRNA-Cas12a效应复合体<sup>[28]</sup>。

基因干扰阶段。当外源基因再次入侵细菌时,位于外源基因上的PAM区被crRNA-Cas12a效应复合体中Cas12a蛋白的REC I、WED和PI结构域识别;进而,Cas12a将外源双链DNA解旋,crRNA的间隔序列通过碱基互补配对的方式识别靶DNA链;若靶DNA链与crRNA上的间隔序列互补,则激活Cas12a的核酸酶活性。Cas12a的核酸酶RuvC结构域行使双链DNA切割功能,对外源核酸进行切割<sup>[29]</sup>。

### 1.3 CRISPR-Cas12a应用于核酸检测的工作原理

1.3.1 CRISPR-Cas12a应用于核酸检测的作用机制 CRISPR-Cas12a系统检测核酸片段主要利用Cas12a的反式切割活性(也被称为附带切割活性)。当系统识别并结合到靶DNA上时,Cas12a的反式切割活性被激活,非特异性地切割环境中的ssDNA。根据CRISPR-Cas12a这一特性,科学家们人为地在检测体系中加入两端分别带有荧光基团和淬灭基团的ssDNA作为报告分子。当CRISPR-Cas12a识别到目的基因后,激活Cas12a的反式切割核酸酶活性,ssDNA被非特异性地切割。ssDNA裂解后,荧光基团与淬灭基团分离,这时通过检测荧光信号就可以检测目的核酸是否存在(图2)<sup>[13,19]</sup>。基于CRISPR-Cas12a系统进行核酸检测有诸多优点,比如检测时不需要使用昂贵的仪器,检测成本通常更低廉,而且检测结果肉眼可视<sup>[30]</sup>。基于CRISPR-Cas12a系统已开发便携式微流控试剂盒和冻干试剂,它们可以应用于机场或当地急诊科和诊所以及其他地点进行医疗现场测试<sup>[1]</sup>。

1.3.2 crRNA的设计、筛选及优化 根据以往的研究表明,crRNA识别目的基因,会启动Cas蛋白的反式切割能力,因此crRNA与靶基因的匹配程度及选

择对CRISPR-Cas进行核酸检测至关重要。

目前有超过30个网站(如CRISPick<sup>[31]</sup>、REGN Cas-Designer<sup>[32]</sup>和CHOPCHOP<sup>[33-34]</sup>等crRNA设计网站)可以实现crRNA的设计。crRNA设计时要考虑其靶向活性,并回避其脱靶效应。大部分crRNA设计工具都会提供靶向评分或者相应参数,根据这些参数排列不同候选crRNA的优先级。例如CHOPCHOP会提供crRNA的潜在脱靶信息以及GC含量,脱靶可能性小且GC含量为30%~70%的更为优先。这些信息可以辅助科学家们对crRNA进行初步筛选。针对性地筛选crRNA还需要进行相关实验辅助验证。

为了提升CRISPR-Cas系统的反式切割能力,不少科学家们选择优化crRNA,化学修饰法改造的crRNA比天然crRNA更加稳定,从而增强其基因编辑效率和反式切割能力<sup>[35-37]</sup>。OOI等<sup>[35]</sup>在2021年通过在crRNA的repeat区5'端延长9 nt可以有效增强CRISPR-Cas12a系统的反式切割活性。也可以通过在crRNA中引入DNA的方式提升检测灵敏度。NGUYEN等<sup>[38]</sup>发现,添加一部分DNA序列至crRNA的3'末端尾,可以增强LbCas12a效应复合体检测灵敏度,但是该方法并不适用于所有的Cas蛋白。结合使用不同crRNA优化策略或许也可以进一步提升CRISPR-Cas系统的反式切割能力。PARK等<sup>[39]</sup>将Cas12a延长的crRNA进行化学修饰,发现这种组合可以提升CRISPR-Cas12a系统在小鼠体内的基因编辑效率,但该方法是否可以应用到体外核酸检测中还有待进一步确认。

## 2 目前已开发的基于CRISPR 2类V型系统的检测方法

目前,基于CRISPR-Cas V型系统核酸检测技术

开发诸多检测平台。这些检测平台预扩增方式不同,检测时长和灵敏度也不尽相同。下面将系统性地对这些检测平台进行比较。

## 2.1 CRISPR-Cas12a

2018年 DOUDNA 的团队<sup>[12]</sup>基于 CRISPR-Cas12a 系统开发一种名为 DETECTR(DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter)的诊断方法。DETECTR 检测平台是基于 Cas12a 的反式切割活性,当 crRNA-Cas12a 复合体遇到与 crRNA 互补的靶 DNA 时,crRNA-Cas12a 复合体被激活,激活的 crRNA-Cas12a 复合体附带地对体系中存在的 ssDNA 荧光报告分子进行切割,从而释放荧光信号。同时,DETECTR 检测平台引入重组聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)等温扩增系统,对靶 DNA 进行预扩增,以放大荧光信号,进一步提升检测灵敏度。整个检测过程在 1 h 左右可以完成。DETECTR 检测平台可以分析来自细胞、血液、唾液、尿液和粪便的样本。样本检测内容包括基因突变、细菌感染、病毒感染、癌症和抗生素耐药性。同时该团队证实 DETECTR 检测平台可检测出样品中的人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV),并对其进行分型(HPV-16 或 HPV-18),这表明 DETECTR 检测平台具有极高的特异性,使 DETECTR 检测平台能更广泛地应用于不同的检测环境。

同年 LI 等<sup>[13]</sup>将聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)与 CRISPR-Cas12a 系统相结合,建立用于快速检测靶 DNA 和靶 RNA 的一小时低成本多用途高效系统(an one-hour low-cost multipurpose highly efficient system, HOLMES)检测平台。HOLMES 检测平台具有高度特异性,可以区分毒株。虽然 HOLMES 检测平台的特异性较强,但是检测方式相对复杂。由于其采用 PCR 而不是等温扩增作为靶基因的预扩增方式,仍需要复杂实验仪器完成检测流程。

此时基于 CRISPR-Cas12a 系统检测的方法,多采取多步式反应。检测方式为:先预扩增检测样品,再开盖,将扩增产物加入 CRISPR-Cas12a 检测体系,因此扩增产物不可避免地会以气溶胶的形式扩散,从而产生核酸污染问题。为解决这一问题,2019 年,由 WANG 等<sup>[40]</sup>开发的基于 Cas12a 的可视化检测平台(Cas12a-based visual detection, Cas12aVDet)和由 WANG 等<sup>[41]</sup>开发的一管式逆转录 CRISPR 可视

化[one-pot visual reverse transcription (RT)-LAMP-CRISPR, OpvCRISPR]检测平台,均可以进行一管式(one-pot)反应,即整个检测过程在一根试管中就可以完成,反应中途无需开盖,避免了气溶胶污染的问题。两种检测平台均采用物理隔离的方式将靶 DNA 等温扩增与 CRISPR-Cas12a 检测的两个过程分隔,预扩增过程结束后,通过离心等方式将两个体系混合,从而完成一管式反应。OpvCRISPR 检测平台结合环介导等温扩技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),将 LAMP 试剂或 RT-LAMP 试剂在试管底部孵育,在盖子上加入 CRISPR-Cas12a 反应试剂,当 LAMP(或 RT-LAMP)预扩增结束后,再摇动试管使试管盖上的 CRISPR-Cas12a 掉落,从而进行检测。Cas12aVDet 检测平台则是将 RPA 技术与 CRISPR-Cas12a 系统相结合,该检测平台将 Cas12a 加在离心管管壁上,在离心管底部 RPA 反应结束后,通过离心的方式将 Cas12a 加入底部共同反应。结合预扩增的时间,Cas12aVDet 产生荧光信号的时间为 30 min,OpvCRISPR 结合预扩增产生荧光信号的时间为 45 min,并且都采取蓝光下肉眼可见的方式进行结果读取。

HU 等<sup>[42]</sup>在 2022 年于 *PNAS* 上发表光控 crRNA 激活 CRISPR-Cas12a 的检测方法。他们预先在反应体系中加入 RPA 反应试剂与 CRISPR-Cas12a 检测体系试剂,由于 CRISPR-Cas12a 的活性被含有保护性核酸链的光裂解连接子[PC (photocleavable) linkers]阻断,从而暂时沉默 crRNA 的功能。这样,在 RPA 和 CRISPR 检测系统中,两种反应可以及时分离,避免 CRISPR-Cas12a 裂解靶 DNA 而造成 RPA 反应被抑制。电化学技术因其操作简单、成本低、灵敏度高等优点而备受关注。LI 等<sup>[43]</sup>基于 CRISPR-Cas12a 系统而开发的电化学检测平台 RAA-based E-CRISPR(recombinase-assisted amplification-based CRISPR/Cas12a into an E-DNA biosensor platform),是将 CRISPR-Cas12a 的反式切割活性引入到电化学生物传感器,并结合重组酶介导等温核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA),建立的一种经济、特异和超敏感的方法。基于 RAA 扩增技术的 E-CRISPR 检测平台可以在纯培养物中检测到低至 0.68 amol/L 的基因组 DNA。

## 2.2 CRISPR-Cas12b

CDetection(Cas12b-mediated DNA detection)

一种基于CRISPR-Cas12b系统的检测平台,于2019年由TENG等<sup>[44]</sup>发明。该检测平台采用AaCas12b-sgRNA-dsDNA-激活剂系统,与RPA预扩增技术结合,该检测平台可检测浓度低至1 amol/L的底物。研究人员还发现,CDetection能够在DNA检测中进行单碱基突变检测,未来可以应用至检测临床样本中的细胞游离DNA(cell-free DNA, cfDNA)。

2021年LI等<sup>[45]</sup>开发CRISPR-Cas12b系统的检测平台HOLMESv2,该平台可进行SNP分型以及RNA病毒、人类细胞mRNA和环状RNA等物质的检测,还可以对不同人类细胞系中的靶DNA及其甲基化程度进行定量检测。HOLMESv2检测平台是由CRISPR-Cas12b系统与LAMP等温扩增技术结合形成的一步法检测平台,有效地避免了样品之间的交叉污染。该检测平台可在2 h内有效地检测低至10 amol/L的DNA样品。

### 2.3 CRISPR-Cas12c

2021年,WANG等<sup>[46]</sup>开发基于CRISPR-Cas12c的检测平台Cas12c-DETECTOR,该平台为首个基于Cas12c的检测平台。由于Cas12c识别一个较短的5'-TG PAM,因此扩大了靶点的选择范围。Cas12c-DETECTOR检测平台具有高的灵敏度和特异性。研究者将该平台分别进行了不同病原菌的检测,该平台可检出新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)并区分不同毒株;同时Cas12c-DETECTOR检测平台还可用于植物病原菌(猕猴桃溃烂病的病原菌)的检测;此外,该平台还可用于SNP分型。研究者将Cas12c-DETECTOR与切向流检测试纸(lateral flow strip, LFS)和视觉荧光检测(visual fluorescence detection, VFD)相结合,做到核酸检测结果肉眼直接可视。

### 2.4 CRISPR-Cas12f

2023年,ZHOU等<sup>[47]</sup>开发基于CRISPR-Cas12f(即Cas14a)的荧光传感平台HARRY(highly sensitive aptamer-regulated Cas14 R-loop for bioanalysis),该平台将检测的靶标从核酸扩大到多种物质,包括代谢物[腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)与组胺等]、金属离子(Cd<sup>2+</sup>)、毒素类物质(黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)和酶类(凝血酶)在内的多种类型。HARRY对于不同样品的检测灵敏度不同,在样品的分析中,HARRY检测Cd<sup>2+</sup>、组胺、AFB1和凝血酶的最低限度分别为4 nmol/L、30 nmol/L、16 nmol/L和36 nmol/L。

### 2.5 其余待开发检测平台

除了目前开发出的检测平台外,还有许多Cas12蛋白(比如Cas12e、Cas12g、Cas12i、Cas12j、Cas12l等蛋白)也具有新型检测工具的潜力。根据文献报道,这些蛋白都具有反式切割活性,特别是Cas12g<sup>[23]</sup>特异性识别RNA靶标,有望成为新型检测RNA病毒的工具。

此外,14bp-16bp的靶标双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)或13~16 nt的ssDNA靶标就可以激活Cas12i的反式切割活性<sup>[48]</sup>。Cas12j不仅可以应用于核酸检测,其突变体nCasΦ的检测下限还可低至pmol/L级<sup>[49]</sup>。Cas12l也显示出不弱于Cas12a的反式切割能力。而Cas12e的反式切割活性相较于Cas12a和Cas12b更弱<sup>[50]</sup>,若将其应用于核酸检测,需要寻找合适的高活性突变体。

## 3 基于CRISPR 2类V型系统检测技术的应用

### 3.1 CRISPR 2类V型系统检测病原体

3.1.1 CRISPR 2类V型系统检测人类疾病病毒 传染病仍是人类面临的严峻威胁之一,它的快速传播会对人类社会造成巨大死亡负担。因此,对病原进行快速鉴定有助于疾病的控制与治疗<sup>[53]</sup>。已有许多研究报道基于CRISPR-Cas V型系统的检测技术可以特异性地检测病原体,如HPV病毒、乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)、SARS-CoV-2病毒等。

DOUDNA团队<sup>[12]</sup>在最初报道DETECTR检测平台时以HPV为靶标鉴定了该检测平台的特异性。研究者首先在三种不同细胞株(BJAB, HPV阴性; SIHA, HPV16阳性; HeLa, HPV18阳性)中验证了DETECTR检测平台可以鉴定出样本中是否含有HPV病毒,并且可区分HPV16、HPV18亚型。他们进一步在25例临床患者样本中验证了该检测平台检测的准确性,均得到与PCR鉴定一致的结果。

HBV是导致人类急性和慢性肝病的最危险和最流行的病原体之一,每年大约有2.57亿人患有慢性乙肝病毒感染<sup>[54]</sup>,准确了解感染患者的乙肝病毒基因分型对临床治疗决策非常重要。B型和C型是最常见的乙肝病原体,为检测这两种不同的乙肝病毒,CHEN等<sup>[55]</sup>创立CRISPR-HBV检测平台。该平台将CRISPR-Cas12b检测与多重交叉置换扩增方法(multiple cross displacement amplification, MCDA)相

结合,可对两种主要的HBV型(HBVB和HBVC型)进行超灵敏、高特异性和快速检测。整个检测过程可在1 h内完成,检测下限低至10拷贝。由于这种检测方式不需要额外的大型仪器设备,因此在某些资源匮乏的地区也能完成检测。

在短时间内对SARS-CoV-2早期检测,是控制SARS-CoV-2蔓延的重要方式。在过去的几年中,CRISPR技术在高灵敏度和高特异性的分子诊断方面显示出巨大的潜力,CRISPR-Cas12技术可以为SARS-CoV-2提供一种快速、灵敏和特异的检测方法,并且不需要大型仪器。到目前为止,已经有多种基于CRISPR-Cas12系统检测平台可以准确地检测SARS-CoV-2,检测的灵敏度可至5拷贝,并且结合荧光或者切向流检测试纸,检测结果可通过肉眼直接读取<sup>[19,51,56-57]</sup>。

**3.1.2 CRISPR 2类V型系统检测动物病毒** 在动物病毒检测方面,Cas12a检测系统也表现出良好的检测能力。非洲猪瘟病毒(african Swine fever virus, ASFV)是一种在猪类中高传染性的、导致猪类高死亡率的DNA病毒。2020年WU等<sup>[58]</sup>结合PCR扩增、CRISPR-Cas12a系统和基于探针的切向流试纸,开发ASFV的检测平台,该平台可同时检测七种ASFV。该平台检测流程为:样品经过PCR预扩增后添加至Cas12a检测系统中,Cas12a和crRNA复合物识别靶标DNA切割报告分子,最终通过切向流试纸读取检测结果。该检测平台可在2 h内得到检测结果,检测下限低至1 000拷贝。

**3.1.3 CRISPR 2类V型系统检测植物病毒** 基于CRISPR 2类V型系统的检测平台还可以检测RNA病毒。大部分感染植物的病毒都是RNA病毒,RNA病毒具有很强的侵略性,严重危害农作物,给人类造成巨大的经济损失。这些病毒或单独或协同侵染植株,因此区分出植物被何种病毒侵染再进行针对性治疗,对防止植物减产和缩减经济损失起到关键作用<sup>[59]</sup>。虽然基于CRISPR的核酸检测方式在病毒疾病的分子诊断中显示出巨大的优势,但很少应用到植物RNA病毒的检测和类病毒的检测。JIAO等<sup>[60]</sup>于2021年开发一种新的基于CRISPR-Cas12a的CRISPR检测平台,这种检测平台可以在1 h内快速灵敏地检测苹果的五种RNA病毒或者类病毒:苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)、苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus, ASGV)、苹果褪绿叶斑病毒(Apple

chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、苹果坏死花叶病毒(apple necrotic mosaic virus, ApNMV)和苹果锈果类病毒(apple scar skin viroid, ASSVd)。其中对于ASPV和ASGV的检测下限为每反应250个病毒拷贝,对其他病毒拷贝数为2 500个拷贝。这种可以同时检测多种病毒的方式极大地降低了生产试剂盒时产生的经济成本,更加利于生产销售。

### 3.2 CRISPR 2类V型系统应用于肿瘤检测和生物标志物

CRISPR 2类V型系统检测不仅可以用于疾病病原体的检测,还可以检测人体自身基因组是否存在突变,比如利用CRISPR-Cas12a检测血液中*JAK2*基因是否存在V617F突变。*JAK2*的V617F基因突变是驱动骨髓增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPNs)发展的关键突变之一<sup>[61]</sup>。此外,Cas12a在人类细胞中还可用于混合、组合遗传筛选的优化<sup>[62]</sup>。

人和动物的血清和器官中广泛存在微小RNA(microRNAs, miRNAs),miRNA参与调节基因的表达。越来越多的研究表明,miRNAs是一类生物标志物,有助于疾病的早期诊断、生物修饰和农业生产。例如,在人血清中发现了植物miR168a和miR156a<sup>[63]</sup>,植物miR159具有抑制乳腺肿瘤生长的作用<sup>[64]</sup>。YANG等<sup>[65]</sup>于2021年将CRISPR-Cas12f系统结合滚换扩增技术(rolling circle amplification, RCA)开发检测miR156a的检测平台Cas14R,该检测平台可以在2 h检出下限为1.839 pmol/L的miR156a。

miR-21等miRNAs的水平与胆管癌的发生有关<sup>[66]</sup>,胆管癌是一种肝脏类疾病,是一种难以检测的高度恶性肿瘤,通常患者发病时已进展至胆管癌晚期<sup>[67]</sup>。2022年GHI等<sup>[68]</sup>基于首次利用CRISPR-Cas12f系统结合链置换扩增技术(strand-displacement amplification, SDA)开发出了一种快速等温检测胆管癌肿瘤生物标志物miR-21的检测平台Cas14SDA。该检测平台可以在1 h内检测到低至680 fmol/L的miR-21。

### 3.3 CRISPR 2类V型系统应用于食品安全和环境监测

CRISPR 2类V型系统也可以应用到人们日常生活中。针对不良厂家利用猪肉造假牛肉进行售卖的问题,WU等<sup>[69]</sup>关注到这个问题并利用CRISPR-Cas12a靶向检测体系特异性地鉴定猪肉细胞色素b(cytochrome b, Cytb),这种检测方式可以于37 °C在一个试管中完成检测,将猪肉与其他种类的肉进行

区分。CRISPR-Cas12a检测体系还可以区分转基因作物与非转基因作物。以CRISPR-Cas12a为基础的检测系统isoCRISPR检测平台可以做到检测下限低至45 pmol/L, 可以灵敏地从多种样品中检测到是否存在外源基因成分。

有害藻华(harmful algal blooms, HABs)污染环境, 危害公众健康, 对经济造成负面影响, 因此及时发现并对它们进行处理至关重要。WANG等<sup>[70]</sup>利用CRISPR-Cas12a作为生物监测工具, 利用检测平台对相关水域中HAB的进行检测。这种检测方式将RPA等温扩增和CRISPR-Cas12a检测相结合, 可以在低至9.8 amol/L的浓度下检测目的样品, 在低至 $3.6 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L的浓度下检测到米氏凯伦藻(*Karenia*

*mikimotoi*, *K. mikimotoi*)(该藻为形成有害藻华的著名物种之一)基因组DNA, 并且, 他们简化了提取样品基因组DNA的方法, 提取样品之中基因组DNA的时间缩短到30 s以下, 整个检测流程时间为1 h以内。

#### 4 不足以及待解决的问题

基于CRISPR 2类V型系统的核酸检测平台(表1)可快速、准确、灵敏和选择性地检测病毒DNA(或RNA), 在病原体检测、医疗诊断、环境监测方面变得越来越重要, 尽管如此, 它目前还面临一些挑战。

在靶点的选择方面, CRISPR-Cas系统识别靶DNA具有一定的PAM限制, 开发探索新型V型效应

表1 目前已开发基于CRISPR 2类V型系统的检测方法总结

检测平台	Cas蛋白种类	预扩增	检测时长	检测下限	检测对象	检测温度	读取方式	参考文献
Detection platform	Cas type	Pre-amplification	Detection duration	LOD	Targets	Detection temperature	Signal readout	References
DETECTR	Cas12a	RPA	60 min	10 amol/L	HPV	37 °C	Fluorescence	[12]
HOLMES	Cas12a	PCR	60 min	10 amol/L	DNA	PCR program temperature	Fluorescence	[13]
Cas12aVDet	Cas12a	RPA	30 min	10 amol/L	DNA	37 °C	Naked eyes under blue light	[40]
OpvCRISPR	Cas12a	LAMP	45 min	5 copy	SARS-CoV-2	65 °C and 37 °C	Naked eyes under blue light	[41]
AIOD-CRISPR	Cas12a	RPA	20 min	5 copy	SARS-CoV-2	37 °C	Naked eyes	[51]
RAA-based E-CRISPR	Cas12a	RAA	120 min	$6.8 \times 10^{-1}$ amol/L	<i>L. monocytogenes</i>	37 °C	Squarewave voltammetry signal	[43]
photocontrolled CRISPR detection technology	Cas12a	RPA	30 min	10 copy	SARS-CoV-2	37 °C	Fluorescence*	[42]
CRISPR/Cas-LFB	Cas12a	PCR	120 min	1 000 copy	ASFV	PCR program temperature	Lateral flow biosensor	[52]
HOLMESv2	Cas12b	LAMP	120 min	10 amol/L	SNP	55 °C	Fluorescence	[45]
CDetection	Cas12b	RPA	60 min	1 amol/L	HPV	37 °C	Fluorescence	[44]
Cas12c-DETC-TOR	Cas12c	RPA	120 min	/	SARS-CoV-2	37 °C	Fluorescence, naked eyes under blue light and lateral flow strip	[46]
HARRY	Cas12f	/	90 min	$0.4 \times 10^{10}$ - $3.6 \times 10^{10}$ amol/L	ATP, Cd <sup>2+</sup> , Histamine, AFB1 and thrombin	Mixed system with sample at 25 °C, heat deactivation at 80 °C	Fluorescence	[47]

\*荧光结果需要紧凑型光控CRISPR-Cas12a检测装置检测。

\*The results can be directly observed by fluorescence imaging of the reaction tube or by monitoring fluorescence curves required by a compact photo-controlled CRISPR-Cas12a detection device.

系统可以有效解决这一难题。据报道新型V型Cas蛋白Cas12h的PAM区为5'-RTR(R为A和G)<sup>[23]</sup>, Cas12n的PAM区为5'-AAN<sup>[71]</sup>, 这两种新型蛋白都可识别富含A的PAM序列; Asp2Cas12I可识别的PAM区为CCY(Y为C和T)<sup>[72]</sup>、CnCas12f1可识别的PAM区为5'-NCCD(D为A、G和T)<sup>[73]</sup>, 这两种Cas蛋白可以识别富含C的PAM序列。而传统的V型Cas蛋白, Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12e、Cas12f和Cas12j等都识别富含T的PAM序列。开发新的V型CRISPR-Cas系统有利于其应用于核酸检测, 可进一步扩大靶点的选择范围。

在灵敏度方面, 无论是荧光可视化还是侧向层析试纸条读取结果, 接近检测下限时, 由于CRISPR-Cas核酸检测系统无法定量检测, 从而无法获取定量的检测结果; 未来或许可以将定量检测与可视化检测相结合, 从而准确地读取检测信息。

在特异性方面, 各种预扩增方式和crRNA的独特设计, 都使得CRISPR-Cas核酸检测系统特异性高, 但是当面临多重检测时, 由于总Cas-crRNA蛋白复合体浓度需与单靶标检测时一致, 即对于特定靶标, 相应的Cas-crRNA蛋白复合体浓度下降<sup>[74]</sup>, 因此在保证特异性的前提下其灵敏度会有所降低, 如何将二者进一步结合, 也是未来要摸索的方向之一。

在一管式反应的优化上, LU等<sup>[75]</sup>检测带有次优PAM作为靶位点, HU等<sup>[42]</sup>引入光控crRNA, 这些方式实现了预扩增与检测体系真正的在一管内反应, 避免了二次加样带来的气溶胶污染。如果可以进一步改进, 将一管式反应与定量检测相结合, 则可无污染地真实量化传递样品信息。

总而言之, 基于CRISPR 2类V型系统的检测方法来分析病原微生物、小分子和生物标志物等, 这些检测平台也逐渐商业化发展。相信在不远的将来, 可以让基于CRISPR 2类V型检测系统的且具有剪接性强、剪接度高、免除预扩增、价格低廉、操作简单等诸多优点的检测产品进入千家万户。

### 参考文献 (References)

- [1] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-12.
- [2] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-36.
- [3] 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]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(2): 67-83.
- [4] JACKSON S A, MCKENZIE R E, FAGERLUND R D, et al. CRISPR-Cas: adapting to change [J]. *Science*, 2017, 356(6333): eaal5056.
- [5] MCGINN J, MARRAFFINI L A. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(1): 7-12.
- [6] KOONIN E V, MAKAROVA K S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374(1772): 20180087.
- [7] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [8] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6.
- [9] SHARMA G, SHARMA A R, BHATTACHARYA M, et al. CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(2): 571-86.
- [10] LEDFORD H, CALLAWAY E. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel [J]. *Nature*, 2020, 586(7829): 346-7.
- [11] ZETSCHKE 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): 759-71.
- [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): 436-9.
- [13] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. *Cell Discov*, 2018, 4: 20.
- [14] WANG M, ZHANG R, LI J M. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: principles and methods [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112430.
- [15] BARRANGOU R, HORVATH P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications [J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 17092.
- [16] TONG B, DONG H, CUI Y, et al. The versatile type V CRISPR effectors and their application prospects [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 622103.
- [17] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(7): e204.
- [18] AMAN R, MAHAS A, MAHFOUZ M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(6): 1226-33.
- [19] BROUGHTON J P, DENG X, YU G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 870-4.
- [20] ZHANG W S, PAN J B, LI F, et al. Reverse transcription recombinase polymerase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for facile and highly sensitive colorimetric SARS-CoV-2 detection [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(8): 4126-33.
- [21] CHUNG Y S, LEE N J, WOO S H, et al. Validation of real-time RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in the early stages of the COVID-19 outbreak in the Republic of Korea [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 14817.
- [22] SHMAKOV S, SMARGON A, SCOTT D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(11): 722-36.

- biol, 2017, 15(3): 169-82.
- [23] YAN W X, HUNNEWELL P, ALFONSE L E, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems [J]. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91.
- [24] YAMANO T, NISHIMASU H, ZETSCHKE B, et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA [J]. *Cell*, 2016, 165(4): 949-62.
- [25] ZHANG H, LI Z, DACZKOWSKI C M, et al. Structural basis for the inhibition of CRISPR-Cas12a by anti-CRISPR proteins [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(6): 815-26.e4.
- [26] DONG D, REN K, QIU X, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA [J]. *Nature*, 2016, 532(7600): 522-6.
- [27] NISHIMASU H, YAMANO T, GAO L, et al. Structural basis for the altered PAM recognition by engineered CRISPR-Cpf1 [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(1): 139-47.e2.
- [28] FONFARA I, RICHTER H, BRATOVIC M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA [J]. *Nature*, 2016, 532(7600): 517-21.
- [29] YAMANO T, ZETSCHKE B, ISHITANI R, et al. Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1 [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(4): 633-45.e3.
- [30] YIN L, MAN S, YE S, et al. CRISPR-Cas based virus detection: Recent advances and perspectives [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 193: 113541.
- [31] DOENCH J G, HARTENIAN E, GRAHAM D B, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(12): 1262-7.
- [32] BAE S, PARK J, KIM J S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(10): 1473-5.
- [33] LABUN K, MONTAGUE T G, KRAUSE M, et al. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W171-W4.
- [34] MONTAGUE T G, CRUZ J M, GAGNON J A, et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, doi: 10.1093/nar/gku410.
- [35] OOI K H, LIU M M, TAY J W D, et al. An engineered CRISPR-Cas12a variant and DNA-RNA hybrid guides enable robust and rapid COVID-19 testing [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1739.
- [36] LI B, ZHAO W, LUO X, et al. Engineering CRISPR-Cpf1 crRNAs and mRNAs to maximize genome editing efficiency [J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1(5): 0066.
- [37] YANG Z, EDWARDS H, XU P. CRISPR-Cas12a/Cpf1-assisted precise, efficient and multiplexed genome-editing in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00112.
- [38] NGUYEN L T, SMITH B M, JAIN P K. Enhancement of trans-cleavage activity of Cas12a with engineered crRNA enables amplified nucleic acid detection [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4906.
- [39] PARK H M, LIU H, WU J, et al. Extension of the crRNA enhances Cpf1 gene editing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3313.
- [40] WANG B, WANG R, WANG D, et al. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(19): 12156-12161.
- [41] WANG R, QIAN C, PANG Y, et al. opvCRISPR: one-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112766.
- [42] HU M, QIU Z, BI Z, et al. Photocontrolled crRNA activation enables robust CRISPR-Cas12a diagnostics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(26): e2202034119.
- [43] LI F, YE Q H, CHEN M T, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 179: 113073.
- [44] TENG F, GUO L, CUI T, et al. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity [J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 132.
- [45] LI L, LI S, WU N, et al. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(10): 2228-37.
- [46] WANG Z, ZHONG C. Cas12c-DETECTOR: a specific and sensitive Cas12c-based DNA detection platform [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 193(Pt A): 441-9.
- [47] ZHOU B, YANG R, SOHAIL M, et al. CRISPR/Cas14 provides a promising platform in facile and versatile aptasensing with improved sensitivity [J]. *Talanta*, 2023, 254: 124120.
- [48] ZHANG B, LUO D, LI Y, et al. Mechanistic insights into the R-loop formation and cleavage in CRISPR-Cas12i1 [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3476.
- [49] PAUSCH P, SOCZEK K M, HERBST D A, et al. DNA interference states of the hypercompact CRISPR-CasPhi effector [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28(8): 652-61.
- [50] LIU J J, ORLOVA N, OAKES B L, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors [J]. *Nature*, 2019, 566(7743): 218-23.
- [51] DING X, YIN K, LI Z Y, et al. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4711.
- [52] WU J, MUKAMA O, WU W, et al. A CRISPR/Cas12a based universal lateral flow biosensor for the sensitive and specific detection of african swine-fever viruses in whole blood [J]. *Biosensors*, 2020, 10(12): 203.
- [53] LI H, BAI R, ZHAO Z, et al. Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20181170.
- [54] WORLD HEALTH O. Global hepatitis report 2017 [M]. Geneva: World Health Organization, 2017.
- [55] CHEN X, TAN Y, WANG S, et al. A CRISPR-Cas12b-based platform for ultrasensitive, rapid, and highly specific detection of hepatitis B virus genotypes B and C in clinical application [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 743322.
- [56] CHEN Y, SHI Y, CHEN Y, et al. Contamination-free visual detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: a promising method in the point-of-care detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 169: 112642.
- [57] GUO L, SUN X, WANG X, et al. SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 34.
- [58] WU J H, MUKAMA O, WU W, et al. A CRISPR/Cas12a based universal lateral flow biosensor for the sensitive and specific detection of african swine-fever viruses in whole blood [J]. *Biosensors*, 2020, 10(12): 203.
- [59] AMAN R, MAHAS A, MARSIC T, et al. Efficient, rapid, and sensitive detection of plant rna viruses with one-pot RT-RPA-

- CRISPR/Cas12a assay [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 610872.
- [60] JIAO J, KONG K K, HAN J M, et al. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay [J]. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19(2): 394-405.
- [61] CHEN M, ZHANG C, HU Z, et al. CRISPR/Cas12a-based ultrasensitive and rapid detection of JAK2 V617F somatic mutation in myeloproliferative neoplasms [J]. *Biosensors*, 2021, 11(8): 247.
- [62] DEWEIRD T P C, SANSON K R, SANGREE A K, et al. Optimization of AsCas12a for combinatorial genetic screens in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 94-104.
- [63] ZHANG L, HOU D, CHEN X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 107-26.
- [64] CHIN A R, FONG M Y, SOMLO G, et al. Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159 [J]. *Cell Res*, 2016, 26(2): 217-28.
- [65] YANG H, CHEN J, YANG S, et al. CRISPR/Cas14a-based isothermal amplification for profiling plant microRNAs [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(37): 12602-8.
- [66] LIU C H, HUANG Q, JIN Z Y, et al. Circulating microRNA-21 as a prognostic, biological marker in cholangiocarcinoma [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(1): 220-5.
- [67] RIZVI S, GORES G J. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(6): 1215-29.
- [68] CHI Z, WU Y, CHEN L, et al. CRISPR-Cas14a-integrated strand displacement amplification for rapid and isothermal detection of cholangiocarcinoma associated circulating microRNAs [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1205: 339763.
- [69] WU Y, DONG Y, SHI Y, et al. CRISPR-Cas12-based rapid authentication of halal food [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(35): 10321-8.
- [70] WANG L, CHEN X Y, PAN F F, et al. Development of a rapid detection method for by using CRISPR-Cas12a [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1205765.
- [71] CHEN W, MA J, WU Z, et al. Cas12n nucleases, early evolutionary intermediates of type V CRISPR, comprise a distinct family of miniature genome editors [J]. *Mol Cell*, 2023, 83(15): 2768-80, e6.
- [72] URBAITIS T, GASIUNAS G, YOUNG J K, et al. A new family of CRISPR-type V nucleases with C-rich PAM recognition [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(12): e55481.
- [73] SU M, LI F, WANG Y, et al. Molecular basis and engineering of miniature Cas12f with C-rich PAM specificity [J]. *Nat Chem Biol*, 2023, doi: 10.1038/s41589-023-01420-4.
- [74] 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): 439-44.
- [75] LU S, TONG X, HAN Y, et al. Fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using suboptimal protospacer adjacent motifs for Cas12a [J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(3): 286-97.