

基于CRISPR/Cas系统的即时诊断研究进展

杨赛男, 戴斌, 李平, 刘宾, 王诗琪, 何昱嫦, 吕圆*

湖南环境生物职业技术学院, 湖南 衡阳

收稿日期: 2023年9月25日; 录用日期: 2023年10月28日; 发布日期: 2023年11月7日

摘要

面对突发公共卫生事件, 快速、准确和便携的现场检测至关重要。基于CRISPR/Cas技术的分子诊断是目前现场检测主要方法, 可以与多种信号传感方法相结合, 集成到智能设备中, 开发多个检测新平台。本文介绍基于CRISPR/Cas系统的传感器发展和现场应用, 对CRISPR和现场检测的发展前景进行总结和展望。

关键词

CRISPR/Cas, 分子诊断, 现场检测

Progress in Point-of-Care Diagnosis Based on CRISPR/Cas System

Sainan Yang, Bin Dai, Ping Li, Bin Liu, Shiqi Wang, Yuchang He, Yuan Lyu*

Hunan Polytechnic of Environment and Biology, Hengyang Hunan

Received: Sep. 25th, 2023; accepted: Oct. 28th, 2023; published: Nov. 7th, 2023

Abstract

Fast, accurate and portable on-site testing is critical in the face of public health emergencies. Molecular diagnosis based on CRISPR/Cas technology is currently the main method of detection, which can be combined with a variety of signal sensing methods, integrated into smart devices, and develop multiple new detection platforms. This paper introduces the sensor development and field application based on CRISPR/Cas system, and summarizes and prospects the development prospect of CRISPR and field detection.

*通讯作者。

Keywords

CRISPR/Cas, Molecular Diagnostic, Point of Care

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

CRISPR-Cas 系统作为原核生物获得性免疫系统, 由成簇规则间隔的短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated proteins, Cas) 构成。因其识别和切割特定 DNA 或 RNA 序列, 是目前分子诊断领域研究的热点。利用 Cas 蛋白(Cas12、Cas13、Cas14、Cas3 等)结合信号放大和转化技术(荧光法、电位法、比色法、侧向流动技术等), 开发多种高灵敏度、高特异性、低成本的诊断平台, 为检测提供新途径。

2. CRISPR/Ca 系统概述

CRISPR/Cas 核酸技术因具有高效的靶向性和可编程性, 已经成为一种精准、高效、低价和高灵敏度的核酸检测方法[1] [2] [3]。CRISPR/Cas 系统是细菌的一种适应性免疫系统, 能够抵抗外源基因的入侵。CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 阵列和 CRISPR 相关蛋白组成。CRISPR 阵列包含重复序列和空间序列, 生成 CRISPR RNA(CrRNA)。CrRNA 与相应的 Cas 蛋白结合形成核糖核酸复合物(RNP), 作为基因组 DNA 编辑器[4]。CRISPR/Cas 系统可以分为两类, I 类 CRISPR/Cas 系统主要是由多个效应蛋白共同发挥作用; II 类 CRISPR/Cas 系统广泛使用, 只需要一种 Cas 蛋白(例如 Cas9、Cas12a、Cas13a)就能发挥作用。Emmanuelle Charpentier 和 Jennifer A.Doudna 研究小组阐明第二类 CRISPR 系统的 DNA 编辑机制, 使其广泛应用[5] [6] [7]。随着学者对 CRISPR/Cas 生物学的全面认识, Cas12a 和 Cas13a 反式剪切与单链 DNA (SsDNA)或单链 RNA(SsRNA)探针结合使用, 成为分子诊断的研究新方法[8] [9]。Cas12a 和 Cas13a 蛋白活化后, 表现出反式切割活性, 分别非特异性地切割单 ssDNA 和 ssRNA, 从而丰富检测的核酸种类(表 1)。Cas 蛋白具有强大的核酸结合能力和更广泛的切割能力, 用于多种检测模式, 包括荧光、电化学、电化学等。CRISPR/Cas 系统由于其高效性、灵敏性、精准性的特点广泛应用于生物工程和分子诊断。

3. 基于 CRISPR/CA 检测传感器

3.1. 基于荧光信号检测的传感器

基于 CRISPR 的核酸检测通常分为四个步骤。首先, 核酸提取与扩增; 第二, 等温放大; 第三, 根据不同的核酸类型选择 CRISPR 系统; 最后, 信号输出。Cas 效应蛋白通过 Cas12a 或 Cas13a 识别目标序列后, 剪切含有荧光团和猝灭剂的短 ssDNA 或 ssRNA, 产生荧光信号[10] [11]。根据这个原理开发特异性、高敏感性酶报告和 DNA 内切酶靶向 CRISPR 反转录报告基因[12]。基于荧光信号的 CRISPR 诊断与等温扩增技术结合系统在公共卫生事件方面具有很大优势, 可以在等温条件下快速检测感染性疾病, 用于可视化检测。同时, 避免致病性核酸的气凝胶污染, 降低检测成本(如图 1(A)) [13] [14] [15]。

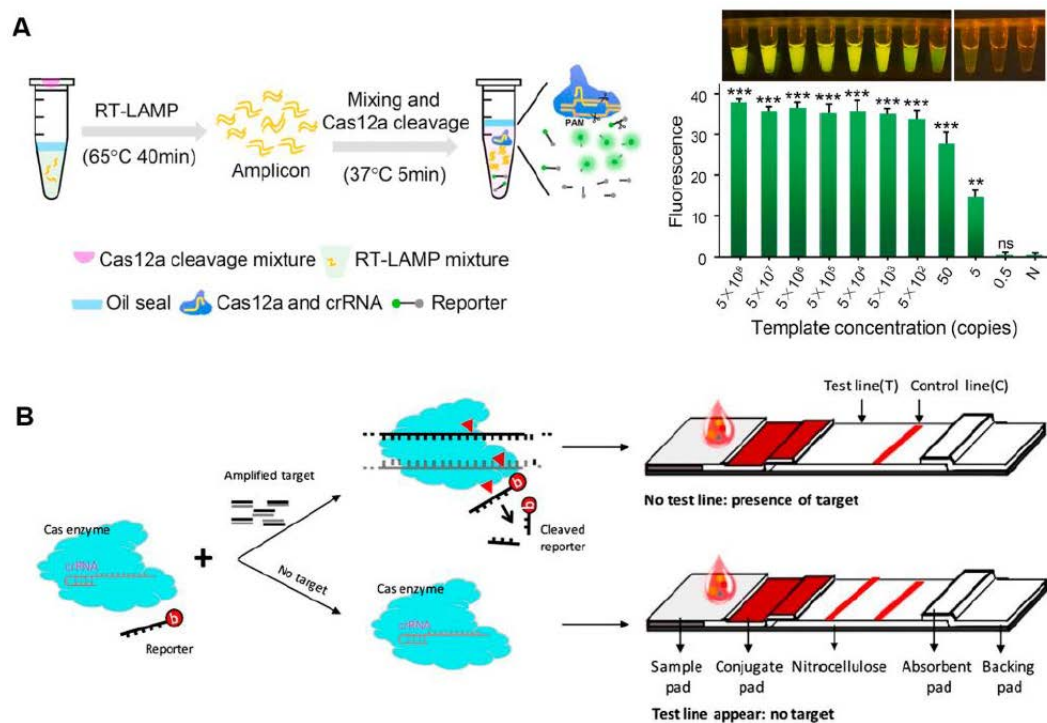
更好地现场应用 CRISPR/Cas 诊断技术, 学者将侧流检测技术与 CRISPR/Cas 系统相结合, 建立更为方便的检测平台[16]。羧基荧光素(FAM) - 生物素报告器是基于侧向流动分析法的 CRISPR/Cas12a 检测分

析方法。第一条控制线捕获未降解的细胞，而第二条测试线检测 Cas12 反切活性的信号[16]。在靶标存在的情况下，Cas12a 剪切生物素化 ssDNA 报告基因，无法连接到已经固定 DNA 探针，使其在测试线上不可见(图 1(B))。基因组释放、等温扩增和 CRISPR/Cas 检测相结合，可以相对较快地完成病原体核酸检测。LED 灯激发 CRISPR/Cas 裂解的荧光分子，从而实现检测信号的可视化。这种检测模式运用于多种病原体的检测，如 SARS-CoV-2、疟原虫、非洲猪瘟病毒等[17] [18] [19]。

Table 1. An overview of key features of CRISPR system

表 1. CRISPR 系统的关键特征

Features	Type			
	Cas9	Cas12a	Cas13a	Cas14
PAM	NGG	TTTN	—	—
Target	dsDNA	(ds/ss)DNA	ssRNA	ssRNA
Trans-Cleavage	No	Yes	Yes	Yes
Trans-Cleavage Substrates	—	ssDNA	ssRNA	ssDNA



(A) 基于 CRISPR/Cas 系统荧光检测示意图 (B) 基于 CRISPR/Cas 系统侧向流动分析法测示意图。

Figure 1. Detects fluorescent sensors based on the CRISPR/Cas system

图 1. 基于 CRISPR/Cas 系统检测荧光传感器

3.2. 基于比色分析法的传感器

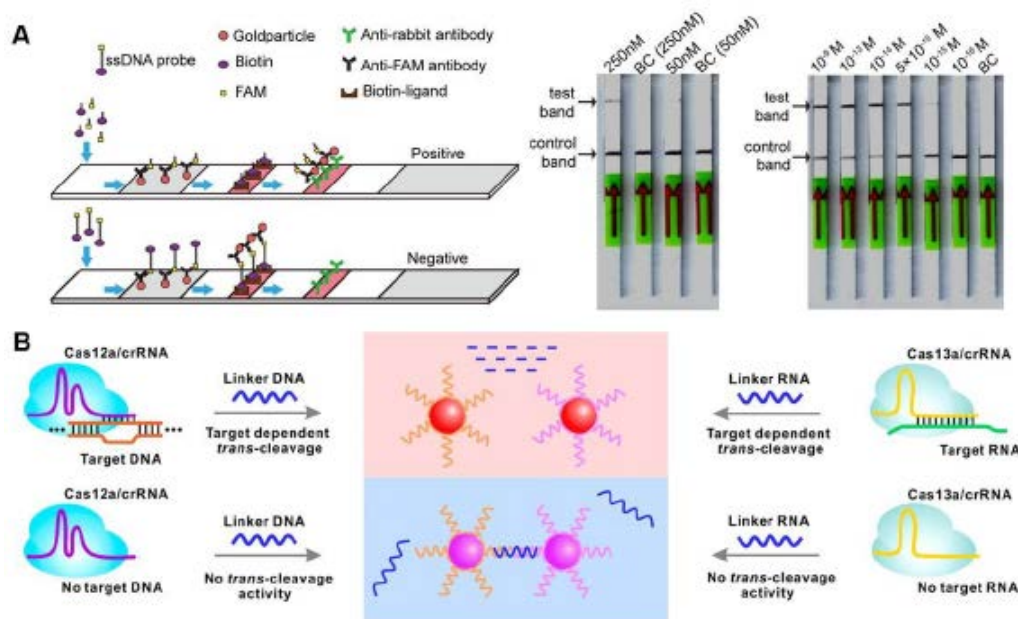
3.2.1. 侧向流动分析法

比色分析法具有结果易判读、使用便捷、成本低等优点，在分子检测领域是常用的方法。侧向流动分析法(lateral flow assay, LFA)又称为免疫层析分析法，是一种用于检测液体中是否存在目标物质的便捷检测装置。CRISPR/Cas 系统与侧向流动分析法相结合，开发出新的检测平台(图 2(A))。试纸的样品垫、

控制线(C线)和测试线(T线)分别用抗 FAM 抗体、生物素配体和抗兔抗体进行预处理。当 CRISPR/Cas 系统激活时, T 线切割捕获, 显示阳性结果, C 线捕获时, 结果显示为阴性[20]。这一方法已经运用于铜绿假单胞菌、斑疹细螺旋体、非洲猪瘟病毒检测[21] [22] [23]。这种方法的缺点是难以量化, 优点是快速检测和高灵敏度。基于 Cas9 的侧向流动分析法, 通过等温扩增后, 目标序列经生物素修饰的引物导入, 同时与亲和素修饰 T 线结合。另一种基于 Cas9 的侧向流动分析法在等温处理过程中使用具有特定修饰的化学引物, 向目标序列引入特殊的化学基团(地高辛、生物素和异硫氰酸荧光素异构体)。Cas9nAR 选择等温扩增位点, 化学修饰的引物将特定的基团引入扩增子, 这些基团可以由 T-线捕获, 从而检测出结果。

3.2.2. 金纳米粒

金纳米粒子溶液由于其电磁特性, 在粒子聚集后由红色变为紫色。通过巯基修饰金纳米颗粒表面的 ssDNA 或 ssRNA, 防止纳米粒子的聚集。用 Cas12a/13a 对 ssDNA 或 ssRNA 进行反式切割后, 金纳米颗粒聚集在一起, 溶液颜色的变化可作为检测(图 2(B)) [24] [25]。采用该方法, 可以检测出 SARS-CoV-2 [26]。纳米酶是常用的一种纳米探针。纳米酶作为可视化 CRISPR 为基础的检测方法。基于纳米酶的免疫吸附实验结合 CRISPR/Cas13a 系统, 可以通过纳米酶的催化反应, 放大检测信号, 提高灵敏度, 实现无扩增 RNA 检测[27]。比色传感器使 CRISPR 诊断具有高灵敏性、高效性的特点, 使其广泛应用与分析检测, 如表 2 所示。



(A) 基于 CRISPR/Cas 系统侧向流动分析法检测示意图 (B) 基于 CRISPR/Cas 系统金纳米颗粒检测示意图。

Figure 2. A colorimetric sensor based on the CRISPR/dCas9 system

图 2. 基于 CRISPR/dCas9 系统的比色传感器

Table 2. An overview of the performance of CRISPR detection based on colorimetric signal sensing

表 2. 基于比色信号传感的 CRISPR 检测性能

Method	Target	Test Time	Sensitivity
RAA-Cas12a based system	African Swine Fever Virus	60 min	1fM
RPA-CRISPR/Cas12a system	L. maculans	45 min	4.7 copies per test

Continued

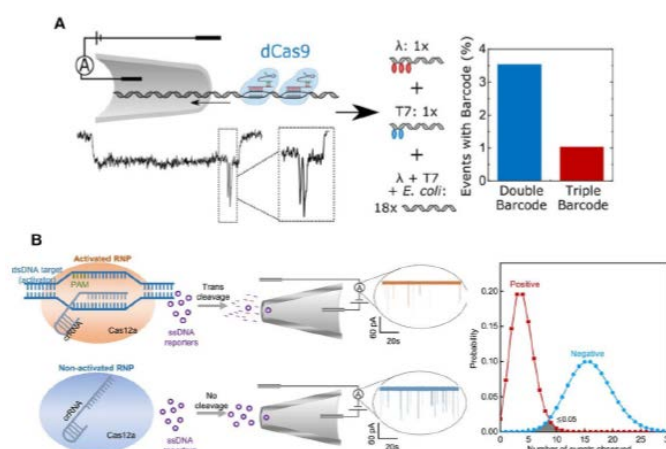
RISPR/Cas9-Mediated Lateral	African Swine Fever Virus	60 min	20 copies per test
Flow Nucleic Acid Assay (CASLFA)	Modified Organisms (GMOs), African Swine Fever Virus	60 min	10 ² copies per test
Lateral Flow Strip Combined with Cas9	Double Food-Borne Pathogens	3 h	10 ² CFU mL ⁻¹
Combines the Cas12a with Universal AuNPs	SARS-CoV-2	20 min	2.7 × 10 ² CFU mL ⁻¹
RT-RPA-Coupled CRISPR/Cas12a Colorimetric Assay	SARS-CoV-2	60 min	1 copy per test

3.3. 基于电子系统的传感器

3.3.1. 电信号

基于等温扩增的 CRISPR/Cas 技术具有高灵敏度特点, 常用于扩增核酸分子。但是, 等温扩增试剂的成本较高, 提高 CRISPR/Cas 检测的成本。学者开发电信号传感作为 CRISPR/Cas 检测的新平台。基于电信号的 CRISPR/Cas 检测平台通常使用有 dCas9 蛋白, 这种蛋白只能结合而不能切割靶核酸分子。Hajian 等人将 CRISPR/dCas9 固定在石墨烯场效应晶体管上, 当识别并结合目标核酸分子, 电导率发生变化, 从而检测出结果[28]。带电 DNA 分子可以由固定在石墨烯上捕获 dCas9, 降低系统的电阻, 产生电流响应。使用时, 滴 1 滴样品到仪器上; 将其放置, 同时进行孵育、清洗, 最终通过两个铂电极评估平台的导电性, 完成样品检测。该方法在无扩增的情况下检出限为 15 fM, 检测时间约为 15 min。

纳米孔传感器基于 CRISPR/dcas9 技术进行电信号传感, 其原理是 dCas9 与 DNA 结合, 通过纳米孔时的孔隙的离子电流下降, 电信号发生变化[29]。dCas9 不同结合位点的纳米孔信号(离子电流)可以分解, 这能用于不同样品同时检测。设计不同的 crRNA 来区分 DNA 不同序列, 这些 crRNA 可以结合到同一 DNA 的不同位点(图 3(A)) [30]。这种方法在 DNA 混合物中区分不同 DNA 序列, 证明该方法的特异性。若含有较少的 DNA, 目标 DNA 链通过纳米孔的概率降低, 那么需要更长的测量时间。为了解决这个问题, 开发基于 Cas12a 反式切割的纳米孔传感器, Cas12a 反式切割可降解纳米孔的 DNA 探针, 使 DNA 探针的电信号发生明显变化, 用于检测。基于 Cas12 的纳米孔传感技术可以放大检测信号, 利用其反式切割活性实现对 HIV-1 和 SARS-CoV-2 的快速敏感检测(图 3(B)) [31]。



(A) 基于 CRISPR/dCas9 系统纳米孔检测示意图 (B) 基于 CRISPR/Cas12a 纳米孔检测示意图。

Figure 3. Based on the CRISPR/Cas system electrical sensor

图 3. 基于 CRISPR/Cas 系统电传感器

3.3.2. 电化学信号

亚甲基蓝是一种经典的电化学标记。通过巯基将 ssDNA-亚甲基蓝固定在金电极表面，在目标序列激活 CRISPR/Cas12a 后反式切割 ssDNA 释放亚甲基蓝，随着亚甲基蓝的释放电流峰值而减小[32]。使用 ssDNA 将亚甲基蓝标签定位在靠近电极表面的位置，从而产生初始电流峰值，结合 CRISPR/ Cas12 检测，电流峰值变化更为显著(图 4(A)) [33]。

使用氧化酶放大电信号是一种常用的方法。Bruch 等人用 ssRNA 将葡萄糖氧化酶固定在电极表面，经靶序列激活后，Cas13a 切割 ssRNA，释放葡萄糖氧化酶(图 4(B))。葡萄糖氧化酶能把溶液中氧化葡萄糖水解，产生 D-葡萄糖-内酯和 H_2O_2 ，电流发生变化用于检测。如果存在靶 RNA，则电流信号将低于空白[34]。不使用电化学标记，改用电化学阻抗谱作为检测信号，可以提高电化学 CRISPR 的诊断灵敏度。用 ssDNA 修饰电极表面，在 CRISPR/Cas12a 系统识别目标序列后进行降解，并将电极的电化学阻抗谱跃迁作为检测信号[35]。基于 CRISPR/Cas 的电化学检测技术已经实现了对人乳头瘤病毒 16 型(HPV-16)、人体免疫缺陷病毒(HIV)、细小病毒 B19 (PB-19)和单核细胞增生李斯特氏菌等病原体的高度敏感检测[36] [37]。表 3 概述了基于电化学传感的 CRISPR 检测方法的性能，具有较高的灵敏度，不需要核酸扩增即可检测。

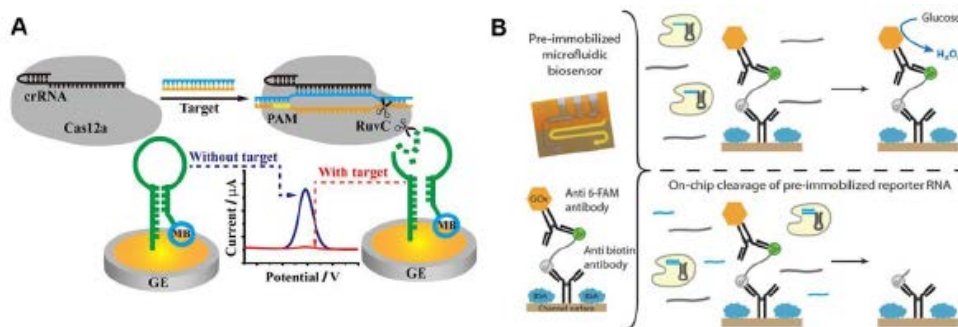


Figure 4. Electrical sensor based on the CRISPR/Cas system

图 4. 基于 CRISPR/Cas 系统的电传感器

Table 3. An overview of performance of CRISPR detection based on electrochemical signal sensing

表 3. 基于电化学信号传感的 CRISPR 检测性能概述

Method	Target	Test time	Sensitivity
E-CRISPR	(Hpv-16PB-19)	30 min	50 pM
CRISPR/Cas12a-Mediated Electrochemical Nucleic Acid Sensing E-DNA Sensor	DNA	60 min	30 pM
CRISPR/Cas13a-Powered Electrochemical Microfluidic Biosensor	microRNA	4 h	10 pM
Label-free Impedance Biosensing	Bacterial DNA	1.5 h	3 nM
Electrochemical Strategy for Low-Cost	Viral Nucleic Acids	3 h	10^4 copies
RAA-based E-CRISPR	Bacterial DNA	1 h	26 CFU/mL

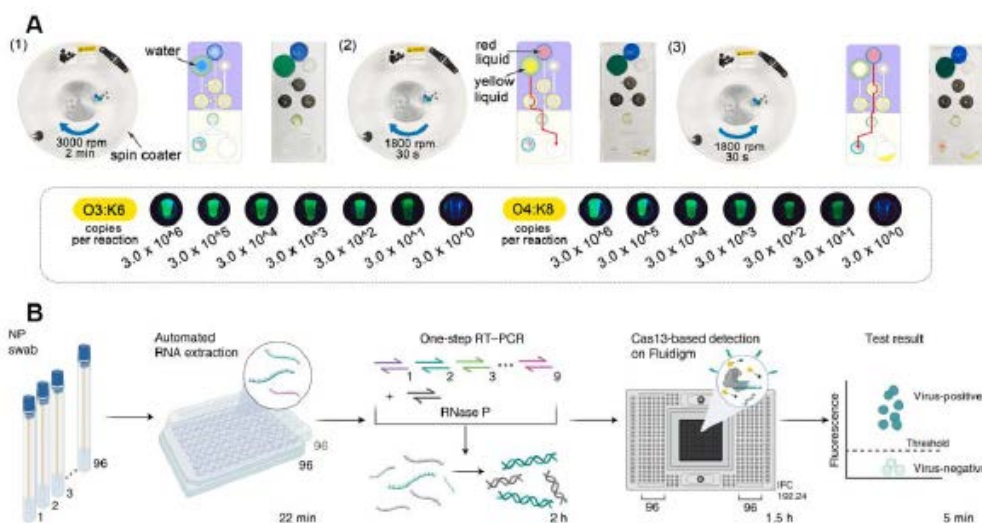
4. 基于 CRISPR/CA 系统检测新平台

4.1. 芯片检测平台

微流控芯片具有集成、高通量、便携、轻巧等优点，使得基于微流控芯片的及时检测广泛应用。在

微流控芯片上,通过旋转阀控制流体流动,依次进行核酸提取、扩增和 CRISPR 检测,可实现快速(小于 50 分钟)检测病原菌核酸。副溶血性弧菌核酸检测应用基于 CRISPR 微流控芯片原理(图 5(A)) [38] [39]。吴等人设计了一种用注射器和磁珠推拉的片上核酸提取方法,使用简单,成本低[40]。在流体芯片上,所有的测试部件都是预先保存,用旋转阀和注射器精确地控制液体的流动以及混合。在 80 min 内,可完成 DNA 提取、等温扩增和 CRISPR 分析。此外,基于微流控装置的全封闭核酸检测,能避免操作人员感染病原体,又能避免核酸气溶胶的污染,为其应用提供市场。Nguyen 等人开发一种基于 CRISPR 传感器用于 SARS-CoV-2 检测试纸,该传感器可以嵌入掩膜中,使用更为方便[41]。CRISPR 诊断所需的每个模块都放置在面具的外部或内部。为了收集病毒,放置收集垫于口罩内侧。CRISPR 诊断所需的全套冻干试剂包含在 μ PAD 中,这是一种基于微流控纸的分析设备,可以接收从样本收集垫收集到的病毒颗粒。

使用基于 CRISPR 的微流控技术诊断分析很难检测到多个目标序列,而高通量微流控技术可以实现多种检测。多路复用芯片通过离心分成几个独立的检测区,检测结果不会相互干扰[42]。同样,纸基微流控芯片设计成多个独立的检测模块,针对不同靶点的 CRISPR 试剂在不同区域进行冻干处理,实现样品溶液层析至检测区域完成诊断[43]。基于纸质的 CRISPR 微流控诊断技术是一种成本较低的方法,可以广泛推广。此外,为了提高检测量,Ackerman 等开发基于 CRISPR/Cas13a 诊断系统和微流体的组合阵列反应,可以检测 26 种呼吸道相关病毒,例如 SARS-CoV-2 等冠状病毒和多种流感病毒(图 5(B)) [44]。



(A) 基于 CRISPR/Cas 系统的微流控芯片检测器 (B) 基于 CRISPR/Cas 系统的多重微流体平台检测器。

Figure 5. Chip diagnostic device based on CRISPR/Cas system

图 5. 基于 CRISPR/Cas 系统的芯片诊断器

4.2. 智能手机检测平台

大多数应用 CRISPR 技术的方法依赖于荧光信号,智能手机检测器是检测荧光信号的常用设备,其可以检测精度可以达到 1%。智能手机结合 CRISPR 诊断是及时检测的热点。这种方法在使用中需要完全关闭检测系统,避免核酸气溶胶污染,同时保持与临床检测结果相同的阳性率和阴性率[45]。为了确定检测结果准确性,使用二元分类模型定制软件对获取的荧光图像进行量化分析[46]。与服务器共享数据,实时跟踪数据,及时反馈检测信息。Fozouni 等人将荧光信号转换为病毒载量,用于核酸检测的定量分析(图 6) [47]。这种方法不需要扩增核酸检测,单个目标 RNA 可以激活多个 Cas13a RNP,利用多个 RNPs

识别相同病毒 RNA 的不同部分，增加活性酶的浓度，加快检测速度。

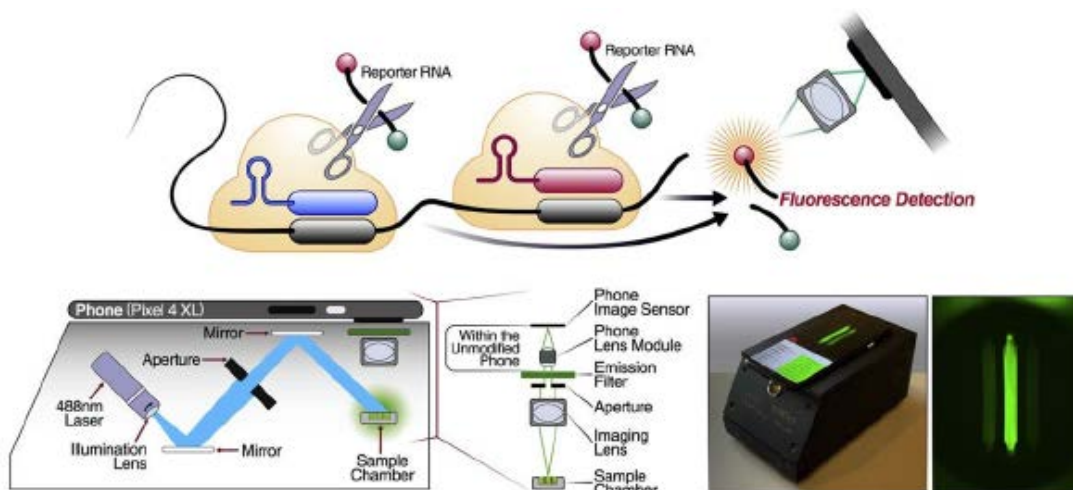


Figure 6. A smartphone detector based on the CRISPR/Cas system
图 6. 基于 CRISPR/Cas 系统的智能手机检测器

4.3. DNA 辅助检测平台

CRISPR/Cas 系统只能检测 DNA 或 RNA 的特点限制在非核酸诊断中的应用。DNA 具有广泛的目标识别能力，因此可以扩展 CRISPR-Cas 系统对许多其他目标的使用，为生物分析和生物医学研究打开一个新的方向。利用 DNA 将非核酸转化为核酸信号，以充分利用 CRISPR/Cas 系统。这种模式是通过 DNA 裂解，激活 CRISPR/Cas12a，引起荧光探针的反式切割。荧光探针作为检测信号(图 7) [48]。该系统由与 Cas12a RNP 匹配的 fDNA 分子、ssDNA 报告基因(ssDNA-fq)和 Cas12a RNP 组成。fDNA 处于没有目标分析物的锁定状态，阻止 Cas12a 启动反式剪切。当目标分析物与 fDNA 相互作用时，Cas12a 反式剪切活性激活，导致 ssDNA-FQ 降解，产生荧光信号[49]。该方法可在室温下检测 ATP 和钠离子，检出限分别为 4.75 μM 和 0.10 mM。运用此方法将 CRISPR/Cas 诊断的检测对象扩展到病原体、细胞、外泌体、金属离子、小分子化合物等，加速 CRISPR/Cas 及时检测的发展[50] [51] [52]。表 4 总结 DNA 辅助非核酸靶标检测的 CRISPR 方法应用。

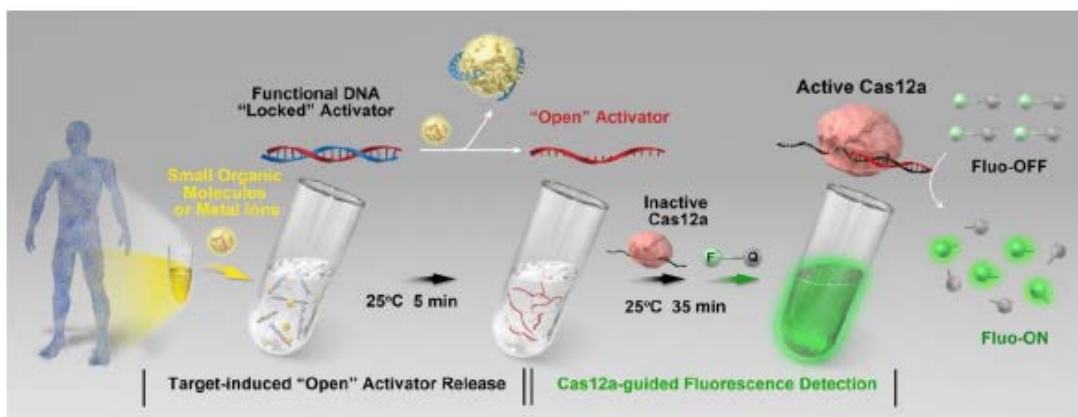


Figure 7. DNA-assisted detector based on the CRISPR/Cas system
图 7. 基于 CRISPR/Cas 系统的 DNA 辅助检测器

Table 4. An overview of functional DNA-assisted CRISPR methods for different non-nucleic acid target detection
表 4. 功能性 DNA 辅助 CRISPR 方法检测不同非核酸

Method	Target	signal Readout	Sensitivity
DNAzyme Walkers-Triggered CRISPR Assay	Serum Amyloid A-1 Protein (SAA1)	Fluorescent	SAA1: 30.00 pg/mL FV: 200.00 pg/mL
Functional DNA Regulated CRISPR-Cas12a Sensor	ATP and Na ⁺	Fluorescent	ATP: 4.75 μM Na ⁺ : 0.10 mM
MDANs-Cas12a	Circulating Tumor Cells (CTCs)	Fluorescent	26 cells mL ⁻¹
CRISPR/Cas12a	exosome	Fluorescent	103 particles uL ⁻¹
APC-Cas	Salmonella Enteritidis Cells	Fluorescent	1 CFU

5. 小结与展望

CRISPR/Cas 系统因其精准定位和切割功能, 成为分子检测平台中重要的组成部分。CRISPR/Cas 检测可以与荧光信号、比色分析法、电子读出系统、芯片、智能手机等传感器方法, 开发多个新的检测平台并广泛应用于及时检测。在定性和定量分析方面, 基于 CRISPR/Cas 的及时检测具有巨大的潜力和多功能性, 其可定制和灵活的特性为检测急性感染性疾病提供了可行的应急策略。CRISPR/Cas 系统的检测平台具有快速、便携、高效、准确、低成本等特点, 可以实现对多种病原体和非核酸分子检测分析。尽管基于 CRISPR/Cas 系统的及时检测平台已经取得突破性进展, 但要将尖端技术转化为可用的应用程序还需要进一步研究。目前仍然存在许多问题: (1) CRISPR/Cas 系统检测平台容易受到气溶胶污染, 导致假阳性结果; (2) 需要等温扩增扩大靶标, 增加检测操作的复杂性; (3) CRISPR/Cas 系统缺乏标准化的程序; (4) 目前 CRISPR/Cas 系统检测平台没有办法实现多组分同时检测, 多样本同时检测; (5) 由于 CRISPR 系统的可扩展性, 在检测系统中加入多种信号传感技术, 这些技术可以与商业平台兼容, 有希望实现过程自动化和标准化等。这些问题仍需努力解决, 在今后的工作可能需要更多地关注于便捷性、标准性、高效性和及时性, 以便应用和推广。

基金项目

衡阳市科技创新计划项目(202121034379); 衡阳市科技计划项目(202010031493); 衡阳市科技指导性项目(S2018F9031018292); 湖南省教育厅科学研究项目(21B0874); 湖南环境生物职业技术学院培优计划科研专项项目(PY2021-09); 湖南环境生物职业技术学院青年基金项目(ZK2021-03); 衡阳市科技计划项目(202121034369)。

参考文献

- [1] 李凯, 罗云波, 许文涛. CRISPR-Cas 生物传感器研究进展[J]. 生物技术进展, 2019, 9(6): 579-591.
- [2] Hong, Z.A., Jing, L.A., et al. (2019) Advances in DNA/RNA Detection Using Nanotechnology. In: *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 91, Elsevier, Amsterdam, 31-98. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.03.002>
- [3] Li, Y., Man, S., Ye, S., et al. (2022) CRISPR-Cas-Based Detection for Food Safety Problems: Current Status, Challenges, and Opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **21**, 3770-3798. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13000>
- [4] 陈思, 林昱坤, 宋春燕, 只帅, 李毅, 杨丹婷. 基于 CRISPR/Cas 系统的核酸生物传感器研究进展[J/OL]. 生物化学与生物物理进展: 1-18.
- [5] Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., et al. (2017) Diversity and Evolution of Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 169-182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>

- [6] Marraffini, L.A. (2015) CRISPR-Cas Immunity in Prokaryotes. *Nature*, **526**, 55-61. <https://doi.org/10.1038/nature15386>
- [7] Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., et al. (2014) Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science*, **343**, Article ID: 1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
- [8] Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., et al. (2018) CRISPR-Cas12a Target Binding Unleashes Indiscriminate Single-Stranded DNase Activity. *Science*, **360**, 436-439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>
- [9] Chen, H., Zhou, X., Wang, M., et al. (2023) Towards Point of Care CRISPR-Based Diagnostics: From Method to Device. *Journal of Functional Biomaterials*, **14**, Article No. 97. <https://doi.org/10.3390/jfb14020097>
- [10] Cai, X., Zhao, D., Li, X., et al. (2022) An Ultrasensitive Biosensing Platform for FEN1 Activity Detection Based on Target-Induced Primer Extension to Trigger the Collateral Cleavage of CRISPR/Cas12a. *Analytica Chimica Acta*, **1233**, Article ID: 340519. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340519>
- [11] Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Kellner, M.J., et al. (2018) Multiplexed and Portable Nucleic Acid Detection Platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, **360**, 439-444. <https://doi.org/10.1126/science.aaq0179>
- [12] Myhrvold, C., Freije, C.A., Gootenberg, J.S., et al. (2018) Field-Deployable Viral Diagnostics Using CRISPR-Cas13. *Science*, **360**, 444-448. <https://doi.org/10.1126/science.aas8836>
- [13] Joung, J., Ladha, A., Saito, M., et al. (2020) Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *New England Journal of Medicine*, **383**, 1492-1494. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2026172>
- [14] Wang, R., Qian, C., Pang, Y., et al. (2021) opvCRISPR: One-Pot Visual RT-LAMP-CRISPR Platform for SARS-cov-2 Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **172**, Article ID: 112766. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112766>
- [15] Ding, X., Yin, K., Li, Z., et al. (2020) Ultrasensitive and Visual Detection of SARS-CoV-2 Using All-in-One Dual CRISPR-Cas12a Assay. *Nature Communications*, **11**, Article No. 4711. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18575-6>
- [16] Broughton, J.P., Deng, X., Yu, G., et al. (2020) CRISPR-Cas12-Based Detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, **38**, 870-874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- [17] Yu, S., Nimse, S.B., Kim, J., et al. (2020) Development of a Lateral Flow Strip Membrane Assay for Rapid and Sensitive Detection of the SARS-CoV-2. *Analytical Chemistry*, **92**, 14139-14144. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03202>
- [18] Lee, R.A., Puig, H.D., Nguyen, P.Q., et al. (2020) Ultrasensitive CRISPR-Based Diagnostic for Field-Applicable Detection of Plasmodium Species in Symptomatic and Asymptomatic Malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **117**, 25722-25731. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010196117>
- [19] Wu, J., Mukama, O., Wu, W., et al. (2020) A CRISPR/Cas12a Based Universal Lateral Flow Biosensor for the Sensitive and Specific Detection of African Swine-Fever Viruses in Whole Blood. *Biosensors*, **10**, Article No. 203. <https://doi.org/10.3390/bios10120203>
- [20] Bai, J., Lin, H., Li, H., et al. (2019) Cas12a-Based On-Site and Rapid Nucleic Acid Detection of African Swine Fever. *Frontiers in Microbiology*, **10**, Article No. 2830. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02830>
- [21] Mukama, O., Wu, J., Li, Z., et al. (2020) An Ultrasensitive and Specific Point-of-Care CRISPR/Cas12 Based Lateral Flow Biosensor for the Rapid Detection of Nucleic Acids. *Biosensors and Bioelectronics*, **159**, Article ID: 112143. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112143>
- [22] Lei, R., Li, Y., Li, L., et al. (2022) A CRISPR/Cas12a-Based Portable Platform for Rapid Detection of Leptosphaeria Maculans in Brassica Crops. *Frontiers in Plant Science*, **13**, Article ID: 976510. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.976510>
- [23] Wang, X., Ji, P., Fan, H., et al. (2020) CRISPR/Cas12a Technology Combined with Immunochromatographic Strips for Portable Detection of African Swine Fever Virus. *Communications Biology*, **3**, Article No. 62. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0796-5>
- [24] Yuan, C., Tian, T., Sun, J., et al. (2020) Universal and Naked-Eye Gene Detection Platform Based on the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas12a/13a System. *Analytical Chemistry*, **92**, 4029-4037. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05597>
- [25] Liu, S., Xie, T., Pei, X., et al. (2023) CRISPR-Cas12a Coupled with Universal Gold Nanoparticle Strand-Displacement Probe for Rapid and Sensitive Visual SARS-CoV-2 Detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **377**, Article ID: 133009. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.133009>
- [26] Zhang, W.S., Pan, J., Li, F., et al. (2021) Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Coupled with CRISPR-Cas12a for Facile and Highly Sensitive Colorimetric SARS-CoV-2 Detection. *Analytical Chemistry*, **93**, 4126-4133. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00013>
- [27] Broto, M., Kaminski, M.M., Adrianus, C., et al. (2022) Nanozyme-Catalysed CRISPR Assay for Preamplification-Free

- Detection of Non-Coding RNAs. *Nature Nanotechnology*, **17**, 1120-1126. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01179-0>
- [28] Hajian, R., Balderston, S., Tran, T., *et al.* (2019) Detection of Unamplified Target Genes via CRISPR-Cas9 Immobilized on a Graphene Field-Effect Transistor. *Nature Biomedical Engineering*, **3**, 427-437. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0371-x>
- [29] Yang, W., Restrepo-Pérez, L., Bengtson, M., *et al.* (2018) Detection of CRISPR-dCas9 on DNA with Solid-State Nanopores. *Nano Letters*, **18**, 6469-6474. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02968>
- [30] Weckman, N.E., Ermann, N., Gutierrez, R., *et al.* (2019) Multiplexed DNA Identification Using Site Specific dCas9 Barcodes and Nanopore Sensing. *ACS Sensors*, **4**, 2065-2072. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00686>
- [31] Nouri, R., Jiang, Y., Lian, X.L., *et al.* (2020) Sequence-Specific Recognition of HIV-1 DNA with Solid-State CRISPR-Cas12a-Assisted Nanopores (SCAN). *ACS Sensors*, **5**, 1273-1280. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00497>
- [32] Dai, Y., Somoza, R.A., Wang, L., *et al.* (2019) Exploring the Trans-Cleavage Activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the Development of a Universal Electrochemical Biosensor. *Angewandte Chemie*, **131**, 17560-17566. <https://doi.org/10.1002/ange.201910772>
- [33] Zhang, D., Yan, Y., Que, H., *et al.* (2020) CRISPR/Cas12a-Mediated Interfacial Cleaving of Hairpin DNA Reporter for Electrochemical Nucleic Acid Sensing. *ACS Sensors*, **5**, 557-562. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b02461>
- [34] Bruch, R., Baaske, J., Chatelle, C., *et al.* (2019) CRISPR/Cas13a-Powered Electrochemical Microfluidic Biosensor for Nucleic Acid Amplification-Free miRNA Diagnostics. *Advanced Materials*, **31**, Article ID: 1905311. <https://doi.org/10.1002/adma.201905311>
- [35] Bonini, A., Poma, N., Vivaldi, F., *et al.* (2021) A Label-Free Impedance Biosensing Assay Based on CRISPR/Cas12a Collateral Activity for Bacterial DNA Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **204**, Article ID: 114268. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114268>
- [36] Zamani, M., Robson, J.M., Fan, A., *et al.* (2021) Electrochemical Strategy for Low-Cost Viral Detection. *ACS Central Science*, **7**, 963-972. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00186>
- [37] Li, F., Ye, Q., Chen, M., *et al.* (2021) An Ultrasensitive CRISPR/Cas12a Based Electrochemical Biosensor for *Listeria Monocytogenes* Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **179**, Article ID: 113073. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113073>
- [38] Luo, Y., Shan, S., Wang, S., *et al.* (2022) Accurate Detection of Salmonella Based on Microfluidic Chip to Avoid Aerosol Contamination. *Foods*, **11**, Article No. 3887. <https://doi.org/10.3390/foods11233887>
- [39] Wu, H., Chen, Y., Yang, Q., *et al.* (2021) A Reversible Valve-Assisted Chip Coupling with Integrated Sample Treatment and CRISPR/Cas12a for Visual Detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biosensors and Bioelectronics*, **188**, Article ID: 113352. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113352>
- [40] Wu, H., Qian, S., Peng, C., *et al.* (2021) Rotary Valve-Assisted Fluidic System Coupling with CRISPR/Cas12a for Fully Integrated Nucleic Acid Detection. *ACS Sensors*, **6**, 4048-4056. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c01468>
- [41] Nguyen, P.Q., Soenksen, L.R., Donghia, N.M., *et al.* (2021) Wearable Materials with Embedded Synthetic Biology Sensors for Biomolecule Detection. *Nature Biotechnology*, **39**, 1366-1374. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00950-3>
- [42] Li, P., Zhang, J., Lin, Q., *et al.* (2021) Rapid Differential Diagnosis of the B.1.617.2 (Delta) Variant of SARS-CoV-2 Using an Automated Cas12a-Microfluidic System. *Chemical Communications*, **57**, 12270-12272. <https://doi.org/10.1039/D1CC04874K>
- [43] Yin, K., Ding, X., Li, Z., *et al.* (2021) Autonomous Lab-on-Paper for Multiplexed, CRISPR-Based Diagnostics of SARS-CoV-2. *Lab on a Chip*, **21**, 2730-2737. <https://doi.org/10.1039/D1LC00293G>
- [44] Welch, N.L., Zhu, M., Hua, C., *et al.* (2022) Multiplexed CRISPR-Based Microfluidic Platform for Clinical Testing of Respiratory Viruses and Identification of SARS-CoV-2 Variants. *Nature Medicine*, **28**, 1083-1094. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01734-1>
- [45] Chen, Y., Shi, Y., Chen, Y., *et al.* (2020) Contamination-Free Visual Detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: A Promising Method in the Point-of-Care Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **169**, Article ID: 112642. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112642>
- [46] Samacoits, A., Nimsamer, P., Mayuramart, O., *et al.* (2021) Machine Learning-Driven and Smartphone-Based Fluorescence Detection for CRISPR Diagnostic of SARS-CoV-2. *ACS Omega*, **6**, 2727-2733. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04929>
- [47] Fozouni, P., Son, S., de León Derby, M.D., *et al.* (2021) Amplification-Free Detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and Mobile Phone Microscopy. *Cell*, **184**, 323-333.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.001>
- [48] Xiong, Y., Zhang, J., Yang, Z., *et al.* (2019) Functional DNA Regulated CRISPR-Cas12a Sensors for Point-of-Care

- Diagnostics of Non-Nucleic-Acid Targets. *Journal of the American Chemical Society*, **142**, 207-213. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b09211>
- [49] Ding, L., Wu, Y., Liu, L., *et al.* (2023) Universal DNAzyme Walkers-Triggered CRISPR-Cas12a/Cas13a Bioassay for the Synchronous Detection of Two Exosomal Proteins and Its Application in Intelligent Diagnosis of Cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, **219**, Article ID: 114827. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114827>
- [50] Li, J., Yang, S., Zuo, C., *et al.* (2020) Applying CRISPR-Cas12a as a Signal Amplifier to Construct Biosensors for Non-DNA Targets in Ultralow Concentrations. *ACS Sensors*, **5**, 970-977. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b02305>
- [51] Lv, Z., Wang, Q. and Yang, M. (2021) Multivalent Duplexed-Aptamer Networks Regulated a CRISPR-Cas12a System for Circulating Tumor Cell Detection. *Analytical Chemistry*, **93**, 12921-12929. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02228>
- [52] Zhao, X., Zhang, W., Qiu, X., *et al.* (2020) Rapid and Sensitive Exosome Detection with CRISPR/Cas12a. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **412**, 601-609. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02211-4>