

# RPA-CRISPR/Cas12a 在病原微生物检测中的研究进展

王文涛<sup>#1,2</sup>, 赵良<sup>#1,2</sup>, 侯立功<sup>\*1,2</sup>, 张万存<sup>1,2,3</sup>, 孙萌<sup>1,3</sup>, 王慧英<sup>1</sup>, 凡雪静<sup>4</sup>, 陈东辉<sup>1,2</sup>, 杨辉<sup>1</sup>

1 郑州大学附属儿童医院, 河南 郑州 450066

2 河南省儿科病防治国际联合实验室, 河南 郑州 450018

3 河南省儿童医院郑州儿童医院生物样本库, 河南 郑州 450018

4 郑州市金水区总医院, 河南 郑州 450008

王文涛, 赵良, 侯立功, 张万存, 孙萌, 王慧英, 凡雪静, 陈东辉, 杨辉. RPA-CRISPR/Cas12a 在病原微生物检测中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2785-2796.

WANG Wentao, ZHAO Liang, HOU Ligong, ZHANG Wancun, SUN Meng, WANG Huiying, FAN Xuejing, CHEN Donghui, YANG Hui. Research progress of RPA-CRISPR/Cas12a in the detection of pathogenic microorganisms[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2785-2796.

**摘要:** 重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)可以在恒温条件下高效扩增靶标序列以快速达到可以检测的水平, 具有检测灵敏度高、检测速度快和设备依赖程度低等优点, 是应用较广泛的恒温扩增技术之一。然而, RPA 的非特异扩增会导致假阳性等问题。成簇的规律间隔短回文重复序列相关蛋白 12a (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a, CRISPR/Cas12a)具有特异性酶切靶标双链功能, 并且其最适温度与 RPA 反应温度相近。近年来, 研究者将 RPA 与 CRISPR/Cas12a 联合对目的基因进行双重特异性识别, 极大地提高了检测特异性, 同时也进一步提升了检测的灵敏度, 展示出检测特异性强、灵敏度高、适用范围广和操作简单等诸多优点, 尤其在病原微生物检测方面展示出较大的应用前景。本文就 RPA-CRISPR/Cas12a 的技术原理、产物检测策略和在病原微生物检测等方面的研究进展进行综述, 以期对 RPA-CRISPR/Cas12a 进一步开发、利用以及在病原微生物检测方面的应用提供借鉴。

**关键词:** 重组酶聚合酶扩增; 成簇的规律间隔短回文重复序列相关蛋白 12a; 病原微生物; 实时检测; 肉眼观测; 现场检测

资助项目: 河南省科技厅科技攻关计划(222102310109)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the Science and Technology Breakthrough Program of Henan Provincial Science and Technology Department (222102310109).

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

\*Corresponding author. E-mail: 18137835787@163.com

Received: 2023-11-01; Accepted: 2023-11-30; Published online: 2024-02-22

## Research progress of RPA-CRISPR/Cas12a in the detection of pathogenic microorganisms

WANG Wentao<sup>#1,2</sup>, ZHAO Liang<sup>#1,2</sup>, HOU Ligong<sup>\*1,2</sup>, ZHANG Wancun<sup>1,2,3</sup>, SUN Meng<sup>1,3</sup>, WANG Huiying<sup>1</sup>, FAN Xuejing<sup>4</sup>, CHEN Donghui<sup>1,2</sup>, YANG Hui<sup>1</sup>

1 Children's Hospital Affiliated of Zhengzhou University, Zhengzhou 450066, Henan, China

2 Henan International Joint Laboratory for Prevention and Treatment of Pediatric Diseases, Zhengzhou 450018, Henan, China

3 Biobank of Henan Children's Hospital Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450018, Henan, China

4 The General Hospital of Jinshui District Zhengzhou City, Zhengzhou 450008, Henan, China

**Abstract:** Recombinase polymerase amplification (RPA) can efficiently amplify the target sequence at constant temperatures and is praised for high sensitivity, short time consumption, and low equipment dependence. Therefore, RPA is a widely used isothermal amplification technology in recent years. However, non-specific amplification of RPA has limited its further development. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a (CRISPR/Cas12a) is capable of specifically cleaving the double strands and has similar optimal temperature to the PRA temperature. Therefore, researchers have combined RPA with CRISPR/Cas12a to improve the detection specificity. Moreover, this method demonstrates high sensitivity, a wide application range, and simple operation. Particularly, the RPA-CRISPR/Cas12a-based approach shows a promising application prospect in the detection of pathogenic microorganisms. This paper introduces RPA-CRISPR/Cas12a regarding the principles, product detection strategies, and application, providing a reference for the further development and application of RPA-CRISPR/Cas12a in the detection of pathogenic microorganisms.

**Keywords:** recombinase polymerase amplification; clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein 12a (CRISPR-Cas12a); pathogenic microorganism; real-time detection; naked-eye observation; on-site detection

病原微生物检测主要是通过病原微生物的特异性核酸来鉴别<sup>[1]</sup>。病原微生物检测技术在不断进步,但是现有检测技术,包括微生物培养、RT-PCR、质谱技术和基因测序技术等仍面临一些问题,如检测时间较长、检测特异性不够强、检测灵敏度不够高、检测范围有限和技术依赖性等。因此,现有检测技术仍需要进一步改进,以提高检测速度、范围和准确性,同时降低成本和技术门槛。

近年来出现了多种核酸等温扩增方法,具有简单易行、快速高效、灵敏度高、适用性广

泛和仪器依赖度低等优点,如滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)<sup>[2]</sup>、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)<sup>[3]</sup>、交叉引物扩增(cross priming amplification, CPA)<sup>[4]</sup>和重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)<sup>[5]</sup>等。目前,RPA是应用较为广泛的等温扩增方法,在分子诊断<sup>[6]</sup>、食品安全检测<sup>[7]</sup>和环境监测<sup>[8]</sup>等领域广泛应用。相较于其他恒温扩增技术,RPA可在恒温 37 °C即可完成扩增过程,核酸扩增速度较快,可在 30 min 内获得目的扩增产物,并且不需要复杂仪器,

可真正实现快速恒温核酸检测。RPA 因其使用相对简单, 具有更高的特异性、敏感性并可以使用多重引物等特点被广泛应用。然而, 对于某些微量病原微生物, RPA 的产物检测下限仍不能满足要求<sup>[9]</sup>, 并且与 PCR 类似也会出现非特异扩增的问题<sup>[10]</sup>。因此, RPA 的检测特异性有待进一步提升。

成簇的规律间隔短回文重复序列相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein, CRISPR/Cas)具有核酸酶活性, 可应用于核酸检测领域<sup>[11]</sup>。基于 CRISPR 反式切割能力的诊断技术以 specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking (SHERLOCK)诊断系统、highly one-hour low-cost multipurpose efficient system (HOLMES)诊断系统和 DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter (DETECTR)诊断系统为代表, 2016 年, 有研究者创造了基于 CRISPR-Cas13a 的 SHERLOCK 系统, Cas13a 与 sgRNA 的复合物具有特异性识别靶 RNA 后激活其非特异性降解其他 RNA 的功能<sup>[12]</sup>。基于 CRISPR-Cas12a 的 HOLMES 系统则是通过 PCR 步骤实现模板扩增, 利用 Cas12a 的反式切割活性对单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 和双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 靶标均能特异性识别<sup>[13]</sup>。相较于 SHERLOCK 系统只能切割靶 RNA 与 HOLMES 系统只能通过 PCR 实现模板扩增, 基于 CRISPR-Cas12a 的 DETECTR 系统可通过 RPA 方法扩增产物, 并通过 Cas12a 和 sgRNA 复合物进行特异性识别, 同时激活 Cas12a 反式切割活性, 可对靶 dsDNA 与非特异性 ssDNA 进行切割<sup>[14]</sup>。因而可将二者联用, 由 RPA 负责恒温扩增靶标序列以提高靶序列的拷贝数, CRISPR/Cas12a 负责特异性酶切靶标序列。同时, RPA-CRISPR/Cas12a 既可以避免 RPA 的非特异性扩增, 又可以提高检测

的灵敏度<sup>[15]</sup>, 也可对目的基因进行双重特异性识别, 极大地提高检测特异性<sup>[16]</sup>。该方法既可用于拥有特殊仪器的实验室进行核酸定量检测<sup>[17]</sup>, 也可仅采用便携式实时荧光检测仪或核酸试纸条用于现场和基层实验室大批量样本的初筛与检测<sup>[18]</sup>。

本文对 RPA-CRISPR/Cas12a 体系原理、产物检测手段及其在病原微生物中的最新应用进展进行阐述, 并对其应用前景进行展望, 以期作为 RPA-CRISPR/Cas12a 体系的进一步应用提供一定的参考依据。

## 1 RPA-CRISPR/Cas12a 体系原理

### 1.1 RPA-CRISPR/Cas12a 体系构成

RPA-CRISPR/Cas12a 体系主要依赖于重组酶(T4UvsX)、单链结合蛋白(single-stranded binding protein, SSB)、链置换 DNA 聚合酶、CRISPR/Cas12a 和 CRISPR-derived RNA (crRNA) 等, 且以上物质最佳反应温度均为 37 °C 左右。重组酶为 T4 噬菌体来源, 能结合单链核酸(寡核苷酸引物)。CRISPR II 类蛋白 Cas12a 是一个多功能蛋白, 含有 dsDNA 结合域和核酸酶域。其中核酸酶域具有 DNA 内切酶活性, 可以特异性地切割靶 dsDNA, 也可以非特异性切割 ssDNA, 但在不存在靶 DNA 的情况下, Cas12a 的核酸酶活性是抑制的。crRNA 是处理过的 RNA 分子, 含有与靶 DNA 互补的序列, 可以特异性识别靶 DNA。但多个 crRNA 可以成簇, 以提高靶向效率。因此, RPA-CRISPR/Cas12a 体系主要由 4 种蛋白与 1 种 crRNA 构成, 可在 37 °C 完成整个反应。

### 1.2 RPA-CRISPR/Cas12a 体系反应过程

RPA-CRISPR/Cas12a 反应过程如图 1 所示。具体反应步骤如下: (1) 重组酶与正反向引

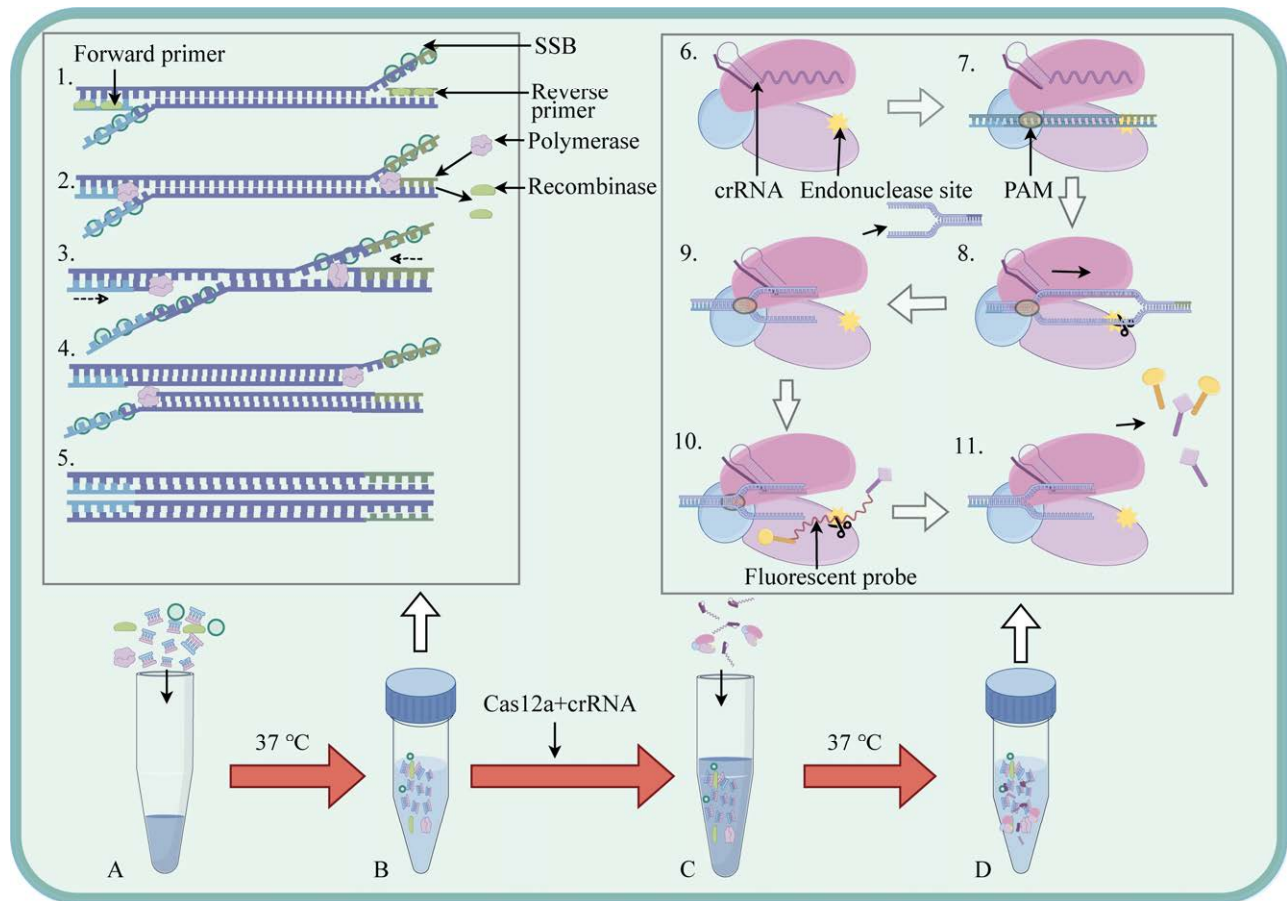


图 1 RPA-CRISPR/Cas12a 体系原理图示 1-5: B 管内 RPA-CRISPR/Cas12a 体系中目的基因进行等温扩增反应的过程; 6-11: D 管内加入 Cas12a 酶后进行目的基因及荧光探针的核酸剪切过程. 整个反应在 37 °C 完成. PAM: 原间隔序列临近基序

Figure 1 Schematic representation of the RPA-CRISPR/Cas12a system. 1-5: Process of isothermal amplification reaction for the target gene in RPA-CRISPR/Cas12a system in B tube; 6-11: The nucleic acid shear process of target gene and fluorescent probe after adding Cas12a enzyme in the D tube. The whole reaction was completed at 37 °C. PAM: Protospacer adjacent motif.

物结合形成重组酶引物复合体,并在目的 DNA 中寻找同源序列,一旦定位到同源序列,重组酶引物复合体就会插入 dsDNA 形成 D 环结构,启动链置换反应,SSB 蛋白与解开的 DNA 链结合防止进一步被置换;(2) 重组酶从重组酶引物复合体中被水解,3'端引物暴露并与 DNA 聚合酶结合;(3) DNA 开始复制延伸;(4) 两条母链分离;(5) 形成两条新的互补 dsDNA,实现模板上目标区域的指数式扩增<sup>[19]</sup>;(6) 在体系中加入

crRNA 与 Cas12a, crRNA 与 Cas12a 结合后也不会激活其酶活性,维持无活性状态;(7) 当 crRNA 结合的 Cas12a 与靶 DNA 发生碱基配对时, Cas12a 的核酸酶域会被激活;(8) Cas12a 核酸酶域对靶 DNA 进行剪切;(9) 生成大量标记的靶 DNA 片段;(10) 当 Cas12a 识别到靶 DNA 序列存在时,也会持续对单链探针底物进行 DNA 内切割,从而释放荧光报告基团,激活后的 Cas12a 也会被降解.周围 ssDNA 探针可

以用荧光素和淬灭剂标记来实现检测功能。通过捕获荧光信号即可判断靶标 DNA 是否存在。

## 2 RPA-CRISPR/Cas12a 体系产物检测手段

### 2.1 定量检测

#### 2.1.1 基于实时荧光定量 PCR 的实时定量检测

采用实时荧光定量 PCR 仪、便携式实时荧光定量 PCR 仪可对 RPA-CRISPR/Cas12a 扩增的过程进行实时监测。如雷荣等<sup>[16]</sup>建立十足目虹彩病毒 1 (decapod iridescent virus 1, DIV1) 的快速检测方法, 结果显示该方法可在 40 min 内实现对虾样本 DNA 中 DIV1 的检测, 检测下限为 10 copies/ $\mu\text{L}$ 。Jiang 等<sup>[20]</sup>开发了双艰难梭菌毒素的快速特异性检测平台, 该平台的多重 RPA-Cas12a 荧光检测中, tcdA 和 tcdB 的检测下限分别为 10 copies/ $\mu\text{L}$  和 1 copies/ $\mu\text{L}$ 。因此, 实时检测具有灵敏度高、特异性高、可定量和快速性等优点, 已经成为病原微生物检测的重要方法之一。

#### 2.1.2 基于数字 PCR (digital PCR) 的定量检测

数字 PCR 的原理与荧光定量 PCR 相似, 其将待测的 DNA 样本分割成几十到几万份, 并分配到不同的反应单元, 每个单元包含一个或多个拷贝数的目标分子, 在其中进行 RPA-CRISPR/Cas12a 反应, 然后根据反应区域中的扩增结果, 可以确定反应区域的阳性与否, 从而得到原始 DNA 样本中待测物质的数量。如 Xia 等<sup>[21]</sup>设计了一种无吸附自吸数字 PCR 芯片, 并基于该芯片建立了用于超灵敏检测沙门氏菌病原体的直接数字双 crRNA (3D) 检测方法, 该 3D 检测能够准确可靠地对沙门氏菌进行数字 PCR 绝对定量, 检测下限为 0.2 cell/mL, 而且该测定无须提取核酸可直接检测牛奶中的沙门氏菌。相较于 RT-qPCR, 数字 PCR 具有绝对定

量、灵敏度高、特异性高、不受抑制效应影响及灵活性高等优点, 在病原微生物检测领域也具有重要的应用价值。

#### 2.1.3 基于微流控芯片的定量检测

利用微流控芯片的微型通道和微阀门的特性, 可将扩增产物通过微流控芯片进行分离和检测。通过微阀门控制进样通道, 使样品进入微流控芯片的微型通道中。然后通过控制微阀门的开闭状态, 将混合物分离成不同的组分。常用的方法有电泳分离、滤波分离等。分离后的 DNA 扩增产物通过光学检测器进行检测。被 Cas12a 酶剪切后暴露荧光素的 ssDNA, 会在激发光的作用下发出荧光信号, 检测器可以通过接收这些信号来确定是否存在特定的 DNA 序列。如 Sun 等<sup>[22]</sup>建立了基于 RPA-Cas12a 结合数字微流控 (digital microfluidics, DMF) 的 RPA-Cas12a-DMF (RCD) 平台, 实现了流感病毒和 SARS-CoV-2 的自动化快速检测, 平台内的反应液滴均处于微升级, 可在 30 min 内完成检测; 而且一个芯片可以检测多个反应区域, 整个过程都在芯片中完成, 降低了气溶胶污染的风险。其检测结果与 RT-qPCR 的结果一致。Huang 等<sup>[23]</sup>开发了一种荧光微流体检测系统, 用于诊断 6 种 HPV 亚型 (HPV6、HPV11、HPV16、HPV18、HPV31 和 HPV33), 将 RPA-Cas12a 检测集成到微流体装置中, 能够在 35 min 内检测处理过的临床样本, 该测定使用 112 个临床拭子样本进行了验证, 并获得了与 RT-qPCR 一致的结果, 一致性为 99.1%。因此, 基于微流控芯片的定量检测技术在病原微生物检测中具有分析快速、样本和试剂用量低、灵敏度和准确性高, 以及多重并行检测等特点, 已经成为病原微生物检测领域的一种重要方法。

#### 2.1.4 基于比色法的定量检测

利用紫外-可见分光光度计测量

RPA-CRISPR/Cas12a 反应体系中的吸光度, 通过比色反应进行终点判读, 可判断扩增产物是否存在。Zhang 等<sup>[24]</sup>提出了一种逆转录重组酶聚合酶扩增(reverse transcription-recombinase polymerase amplification, RT-RPA)与 CRISPR-Cas12a 比色测定相结合的 SARS-CoV-2 检测方法, 并利用金纳米颗粒(Au nanoparticles, AuNPs)作为通用比色读数, 可以通过紫外-可见分光光度计进行检测, 灵敏度可达每次测试 1 个病毒基因组序列拷贝数。Mao 等<sup>[25]</sup>通过比色法对非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)基因进行检测, 检测下限为 20 copies/mL, 并且未观察到与其他病毒的交叉反应。比色法测定具有宽线性范围, 能够同时检测低浓度和高浓度的样品, 并进行定量检测。

## 2.2 定性检测

### 2.2.1 基于肉眼的定性检测

基于肉眼的定性检测无需专用设备, 可直接通过蓝/紫光照射进行观测。当样品中的荧光物质遇到蓝光或紫外光时会处于激发态, 进而发生弛豫过程, 即从激发态跃迁到基态。在这个过程中, 荧光物质会重新辐射出能量较低的可见光。不同的荧光物质会辐射出不同波长的可见光<sup>[26]</sup>。Lin 等<sup>[27]</sup>检测食品中的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)时可以在紫外线照射下用肉眼检测样品, 这种新颖的测定方法可在 1 °C 下 10 min 内特异性稳定地检测低至 37–40 copies/ $\mu$ L 的金黄色葡萄球菌。Wang 等<sup>[28]</sup>提出了一种 Cas12a 荧光测定法区分临床样品中的主要皮肤癣菌, 结果可在蓝光下 30 min 内肉眼直接可见, 所有测试样品均与真菌培养和 ITS 测序结果一致。此外, 也可通过加入阳离子水溶性共轭聚噻吩(cationic water-soluble conjugated polythiophene, PMNT)<sup>[29]</sup>使溶液颜色和荧光强度发生相应的变化, 并通过这一信号变化实现

检测。刘华等<sup>[30]</sup>在快速检测转基因植物外源基因 *CP4-EPSPS* 中使用聚噻吩显色技术, 进行 RPA-CRISPR/Cas12a 反应后, 加入 PMNT 溶液, 肉眼观察溶液从红色变为黄色, 紫外光照射下则为橘红色变为橙黄色, 检出限为 45 拷贝数。Jiang 等<sup>[31]</sup>提出了一种快速的可视化检测方法, 将其命名为“Cas12aVIP”, 通过将 RPA-CRISPR/Cas12a 系统和 PMNT 相结合, 在无靶 DNA 的情况下溶液为红色, 存在靶基因时显示为黄色, 从而实现靶 DNA 的比色检测。该检测技术无需特殊技术或辅助设备, 具有快速简便、可视化结果和低成本等优点, 可在 40 min 内完成, 为现场或者基层快速核酸检测提供了参考。

### 2.2.2 基于凝胶电泳的定性检测

凝胶电泳是一种通过利用 DNA 在电场中的迁移速度差异, 将 DNA 片段按照大小分离的技术。通过在凝胶上形成电场, 将 DNA 样品加入凝胶孔道中, 施加电压使 DNA 片段在凝胶中迁移, 较短的片段迁移距离较长, 较长的片段迁移距离较短, 从而实现分离<sup>[32]</sup>。Tian 等<sup>[33]</sup>根据模板浓度和琼脂糖凝胶电泳结果无拖曳现象, 开发了快速核酸裂解液的最佳方案, 并验证了 CRISPR/Cas12a 结合 RPA 技术的快速检测能力。凝胶电泳技术现通常用于产物检测技术的对照与验证试验。

### 2.2.3 基于试纸条的定性检测

基于试纸条定性检测的原理主要是抗原抗体特异性结合。试纸条上固定的试剂通常含有特定的抗原或抗体, 如检测线上的标记抗体与结合垫区域的标记基质。检测线上被检测物质与试剂发生特定的抗原-抗体反应, 产生可见的颜色变化。质检线上不与被检测物质发生反应, 而是与结合垫区域标记基质发生反应, 产生可见的颜色变化。这种检测方法可以使得检测结果可视化, 并进行快速检测, 更适合应用于检

测设备不全面的基层检测或需要快速出结果的现场检测。如黄坚等<sup>[34]</sup>建立了靶向猫疱疹病毒 1 型(feline herpesvirus-1, FHV-1)基因的快速可视化检测方法,结果显示,该方法可以特异性地检出 FHV-1,灵敏度极高(最低检测下限为  $2.35 \times 10^{-1}$  copies/ $\mu\text{L}$ ),检测时间短,结果可视化。Liu 等<sup>[35]</sup>针对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*) *UreB* 基因开发了快速检测系统,可在 50 min 内完成,用于临床幽门螺杆菌早期诊断和检测,结果显示基于侧向流动试纸条的检测下限为 12 拷贝数。该检测手段对环境的要求低,仅需一台便携式恒温仪器,恒温条件 37 °C 就可进行反应,简便快捷,操作易上手,且更适用于快速现场检测、口岸检疫等场景。

### 3 RPA-CRISPR/Cas12a 应用进展

#### 3.1 在病毒检测方面的应用

传统的病毒检测方法可能存在一定的局限性。另外,一些病毒含量非常低或者存在于样本中的其他物质干扰可能会影响到准确的病毒检测。因此,发展更快速、精确的病毒检测方法至关重要。徐博文等<sup>[18]</sup>针对非洲猪瘟病毒(ASFV) *B646* 基因保守片段设计并合成特异性 crRNA 与引物(RPA1-F/RPA1-R, RPA2F/RPA2-R)建立了 ASFV 的快速检测方法,结果显示,该方法仅能检测出 ASFV,最低检测病毒浓度为 5.8 copies/ $\mu\text{L}$ 。何雨龙等<sup>[36]</sup>以马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)为检测对象,通过与核酸粗提及逆转录反应联合,可在非实验室环境下进行 PVY 检测,整个过程耗时约 60 min;检测模板的最低限度为  $3 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ,灵敏度高于 PCR 及 qPCR 检测法。该研究为在非实验室条件下实时快速检测植物病毒提供了一种有效方法。Gong 等<sup>[37]</sup>开发了一种集成式的三位一体检测呼吸道合胞病毒 A 和 B (respiratory syncytial

virus A and B, RSV A and RSV B)系统,该系统可以检测到  $1.38 \times 10^{-1}$  copies/ $\mu\text{L}$  浓度的病毒,并且可以在 37 min 内区分 RSV A 或 RSV B,RSV A 的敏感性和特异性分别为 73.08% 和 90%,RSV B 的敏感性和特异性分别为 42.86% 和 93.33%。因此,RPA-CRISPR/Cas12a 在病毒检测方面具有极高的灵敏度和特异性,并且已经有了较为广泛的应用,对病毒的检测和预防提供了方便可靠的现场诊断工具。

#### 3.2 在细菌检测方面的应用

细菌检测大多数是通过传统的分离培养鉴定,这种方法不仅耗时耗力,而且操作过程中可能会对实验人员安全产生一定的威胁,也需要较长的时间和复杂的操作流程,且可能存在一定的误差率。栾天等<sup>[38]</sup>根据猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App) *apxIVA* 基因,设计 CRISPR-Cas12a 特异性 gRNA 与 RPA 引物,建立可用于临床检测 App 的方法;该方法仅对 App 的检测为阳性,特异性较强;敏感性试验结果显示该方法对 App 重组质粒标准品的检测下限可达 10 copies/ $\mu\text{L}$ ,比普通 PCR 方法敏感性高 1 000 倍。目前,现有的多杀性巴氏杆菌检测方法耗时长,需要复杂的专业操作,限制了现场检测的应用。Hao 等<sup>[39]</sup>提出了一体可视化 CRISPR-Cas12a (naked-eye CRISPR-Cas12a, Cas12a-NEye)平台方法用于检测多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*),整个实验过程包括快速 DNA 提取 (<1 h) 和 Cas12a-NEye 测定(25 min),可在 1.5 h 内完成,检测下限是个位数的拷贝数,且仅对多杀性巴氏杆菌的检测为阳性。建立快捷准确的 RPA-CRISPR/Cas12a 分子检测技术对于细菌病原鉴定有重大现实意义。因此,RPA-CRISPR/Cas12a 在细菌检测方面展示出了快速省力、安全可靠的特点,并具有极高的灵敏度和特异性,

在食品检测及动植物疾病检测方面具有较大的应用前景。

### 3.3 在真菌检测方面的应用

目前在医学上对真菌的检测主要是通过其形态学和生理学等表型进行鉴别,而这些方法往往所需周期长且检出率低<sup>[40]</sup>。向日葵黑茎病菌(*Leptosphaeria lindquistii*)与丁香疫霉病菌(*Phytophthora syringae*)均是我国的植物检疫性有害生物,邝瑞瑞等<sup>[15]</sup>根据向日葵黑茎病菌及其近似种的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列差异,设计特异性 RPA 引物和 CRISPR-Cas12a 的 crRNA,建立了向日葵黑茎病快速检测方法,结果显示荧光法检测灵敏度与实时荧光 PCR 的灵敏度相当,最低检测量为 0.1 pg,试纸条法检测最低检测量为 1 pg。雷荣等<sup>[16]</sup>根据 GenBank 中丁香疫霉病菌的 *Ypt1* 基因设计特异性引物,建立荧光法和侧向流层析试纸条快速检测方法,结果显示该方法在 37 °C 扩增 40 min,能特异性地检测丁香疫霉病菌,灵敏度为 133 fg,与荧光定量 PCR 相当。RPA-CRISPR/Cas12a 为真菌诊断提供了快速、准确的新方法。因此,RPA-CRISPR/Cas12a 在真菌检测方面展示出了快速准确、灵敏度高等特点,并在疾病诊断和食品质量评估的快速检测方面有广阔的应用前景。

### 3.4 在寄生虫检测方面的应用

寄生虫病严重危害人体健康及畜禽养殖业,通常对其诊断主要依靠临床表现或者从动物分泌物等分离观察卵或者幼虫,这些常规方法不仅费时费力,而且诊断时已经产生不良后果。现需要一种针对早期寄生虫的检测方法。Li 等<sup>[41]</sup>设计了阴道滴虫(*Trichomonas vaginalis*)一体化检测技术,选择肌动蛋白作为靶基因设计 RPA 引物,并基于 Cas12a 结合位点设计 crRNA,检测结果可在 60 min 内完成,最低检

测下限为 1 copies/ $\mu$ L,经特异性验证后与白色念珠菌(*Candida albicans*)、人原体、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、微小隐孢子虫、十二指肠 G 或刚地弓形虫无交叉反应。因此,RPA-CRISPR/Cas12a 在早期寄生虫检测方面展现出了快速便捷、准确便宜的优点,具有人体健康及畜禽养殖业等方面的检测应用前景。

### 3.5 在其他病原微生物检测方面的应用

除了上述四大主要类别的检测,还有关于转基因植物外源基因的检测,如外源基因 *CP4-EPSPS*<sup>[39]</sup>通过 RPA-CRISPR/Cas12a 体系提供便捷诊断的方法。常见病原经常会混合感染,所以 RPA-CRISPR/Cas12a 检测技术不会局限于单一的病原检测,有望向着多重检测方向发展,扩大检测的范围。如 Sun 等<sup>[22]</sup>、Jiang 等<sup>[20]</sup>和 Jiao 等<sup>[42]</sup>分别建立了关于不同细菌和病毒的结合 CRISPR-Cas12a 的多重 RPA 检测技术。其检测灵敏度高、特异性强、反应时间短,可用于现场检测与基层检测,具有良好的应用前景。

## 4 机遇与挑战

RPA-CRISPR/Cas12a 系统作为新一代的可扩展型诊断技术,开创了分子诊断的新时代,该系统表现出灵敏度高、特异性好、价格低廉和操作简单的优点,并且可以实现快速即时检测,在病原微生物检测方面展示出巨大的应用潜力。另外,随着 RPA-CRISPR/Cas12a 体系的快速发展,这一检测系统将在疾病诊断、环境评估和食品质量快速评估等领域有广阔的前景。

RPA-CRISPR/Cas12a 的发展仍面临多重挑战,如:(1)在保证检测灵敏性的条件下,开发临床样本的预处理方法、设计多条 crRNA 等,优化或免除核酸的提取。我们可以探索利用各种新型蛋白酶等酶解剂去除样本中的蛋白质干



扰物，从而提高核酸的纯度。(2) 建立基于 RPA-CRISPR/Cas12a 系统的定制型高通量检测或多病原检测方法及与自动化、人工智能等多学科的交叉<sup>[43]</sup>。可以利用自动化设备和人工智能算法，结合 RPA-CRISPR/Cas12a 系统，构建高通量的检测平台，然后通过优化反应条件、引物设计和测量仪器等方面的参数，最终实现对多个目标的同时检测。(3) 目前尚无针对 RPA-CRISPR/Cas12a 特异性引物设计的软件，因此需要较长时间优化引物序列。我们可以结合生物信息学工具和算法，发明简单便捷的引物设计软件，以加快引物设计的速度和准确性。这需要各学科一起发展进步。(4) PAM 序列是 CRISPR 系统用于辨别目标序列的一部分，但有可能限制其核酸序列检测范围。因此，在设计 CRISPR-Cas12a 系统应用于特定目标序列之前，需要先确定目标序列中是否存在合适的 PAM 序列。若不存在，也可通过引入人工修饰来改变 Cas12a 对 PAM 序列的识别要求，或使用引物引导的扩增技术来增加目标序列的 PAM 序列。这些方法可以在一定程度上扩展 CRISPR-Cas12a 系统的应用范围。因此，RPA-CRISPR/Cas12a 仍具有较大的拓展潜力。

## 5 结论

综上所述，RPA-CRISPR/Cas12a 具有检测特异性更强、灵敏度更高、适用范围广、操作简单、快速灵活、高通量和自动化等诸多优点，在病原微生物检测方面展现出优越的应用前景。此外，目前 RPA-CRISPR/Cas12a 的试剂成本比 PCR 高，但其人力成本与操作时间相对较少，未来可通过条件优化与创新来降低成本，获得更加完全的反应体系，将有更加广阔的应用空间，最终成为强有力的新一代检测工具。

## REFERENCES

- [1] 李冰洁, 王思敏. 病原微生物检测技术进展[J]. 现代盐化工, 2021, 48(4): 37-38.  
LI BJ, WANG SM. Progress in detection technology of pathogenic microorganisms[J]. Modern Salt and Chemical Industry, 2021, 48(4): 37-38 (in Chinese).
- [2] 孙亚军, 王亮, 蔡俊. 滚环扩增技术最新研究动态及展望[J]. 生物技术进展, 2016, 6(2): 130-136.  
SUN YJ, WANG L, CAI J. Progress and prospects of rolling circle amplification[J]. Current Biotechnology, 2016, 6(2): 130-136 (in Chinese).
- [3] 徐匆, 罗华建, 李艳芳, 黄皓, 梁卫驱, 胡珊, 胡楚维, 罗鸿斌. 环介导等温扩增技术的应用及研究进展[J]. 广东农业科学, 2019, 46(4): 116-123.  
XU C, LUO HJ, LI YF, HUANG H, LIANG WQ, HU S, HU CW, LUO HB. Application and progress of loop-mediated isothermal amplification technology[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2019, 46(4): 116-123 (in Chinese).
- [4] 黄梦琦, 李婧姝, 邱孺, 李卓群, 郭诗华, 崔永红. 交叉引物恒温扩增技术(CPA)研究进展[J]. 民营科技, 2018(9): 78-79.  
HUANG MQ, LI JS, QIU R, LI ZQ, GUO SH, CUI YH. Research progress of cross primer constant temperature amplification (CPA)[J]. Private Technology, 2018(9): 78-79 (in Chinese).
- [5] LI J, MACDONALD J, STETTEN FV. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification[J]. The Analyst, 2018, 144(1): 31-67.
- [6] 张森源, 卢佩珊, 李佳宁, 李佳乐, 郑炜欣, 欧阳岁东. 重组酶聚合酶侧流层析技术检测新冠病毒核酸快速诊断方法的初步建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(7): 577-581.  
ZHANG MY, LU PS, LI JN, LI JL, ZHENG WX, OUYANG SD. Preliminary establishment of a rapid diagnosis method for detecting SARS-CoV-2 nucleic acid through recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2022, 38(7): 577-581 (in Chinese).
- [7] 王晓庆, 张海韵, 高晗, 贺燕. 重组酶聚合酶扩增技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 现代食品, 2023, 29(1): 11-14.  
WANG XQ, ZHANG HY, GAO H, HE Y. Application of recombinase polymerase amplification technique for detection of pathogenic bacteria in foodborne[J].

- Modern Food, 2023, 29(1): 11-14 (in Chinese).
- [8] LIU L, DUAN JJ, WEI XY, HU H, WANG YB, JIA PP, PEI DS. Generation and application of a novel high-throughput detection based on RPA-CRISPR technique to sensitively monitor pathogenic microorganisms in the environment[J]. Science of the Total Environment, 2022, 838: 156048.
- [9] LI FN, XIAO J, YANG HM, YAO Y, LI JQ, ZHENG HW, GUO Q, WANG XT, CHEN YY, GUO YJ, WANG YH, SHEN C. Development of a rapid and efficient RPA-CRISPR/Cas12a assay for *Mycoplasma pneumoniae* detection[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 858806.
- [10] PIEPENBURG O, WILLIAMS CH, STEMPLE DL, ARMES NA. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [11] 巩琦凡, 郑晓飞, 付汉江. CRISPR 基因编辑技术的发展及应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2023, 39(3): 332-340.
- GONG QF, ZHENG XF, FU HJ. Development and application of CRISPR gene editing technology[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular, 2023, 39(3): 332-340 (in Chinese).
- [12] KELLNER MJ, KOOB JG, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, ZHANG F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. Nature Protocols, 2019, 14(10): 2986-3012.
- [13] LI SY, CHENG QX, WANG JM, LI XY, ZHANG ZL, GAO S, CAO RB, ZHAO GP, WANG J. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. Cell Discovery, 2018, 4: 20.
- [14] CHEN JS, MA EB, HARRINGTON LB, Da COSTA M, TIAN XR, PALEFSKY JM, DOUDNA JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439.
- [15] 邝瑞瑞, 雷荣, 江丽, 段维军, 李雪莲, 符娜, 范在丰, 李远, 吴品珊. 向日葵黑茎病菌 RPA/CRISPR-Cas12a 快速检测方法的建立[J]. 植物保护, 2022, 48(6): 69-76, 89.
- KUANG RR, LEI R, JIANG L, DUAN WJ, LI XL, FU N, FAN ZF, LI Y, WU PS. Establishment of RPA/CRISPR-Cas12a rapid detection for *Leptosphaeria lindquistii*[J]. Plant Protection, 2022, 48(6): 69-76, 89 (in Chinese).
- [16] 雷荣, 孙夕雯, 江丽, 王振华, 李国庆, 李远, 廖晓玲, 吴品珊. 丁香疫霉菌 RPA/CRISPR-Cas12a 快速检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2022, 36(3): 31-38.
- LEI R, SUN XW, JIANG L, WANG ZH, LI GQ, LI Y, LIAO XL, WU PS. Development of rapid detection for *Phytophthora syringae* based on RPA/CRISPR-Cas12a[J]. Plant Quarantine, 2022, 36(3): 31-38 (in Chinese).
- [17] 张徐俞, 黄俊, 杨稳, 付媛媛, 陈正伟, 郑晓叶, 朱凝瑜, 李业, 俞晓平. 重组酶聚合酶扩增结合 CRISPR-Cas12a 快速检测十足目虹彩病毒 1 方法的建立[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4980-4988.
- ZHANG XY, HUANG J, YANG W, FU YY, CHEN ZW, ZHENG XY, ZHU NY, LI Y, YU XP. Rapid detection of decapod iridescent virus 1 by recombinase polymerase amplification combined with CRISPR-Cas12a[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4980-4988 (in Chinese).
- [18] 徐博文, 周傲白雪, 林志达, 梁基壮, 罗宝正. 非洲猪瘟病毒的 RPA-CRISPR-Cas12a 快速检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(14): 86-90, 137-139.
- XU BW, ZHOU ABX, LIN ZD, LIANG JZ, LUO BZ. Establishment of RPA-CRISPR-Cas12a rapid detection method for African swine fever virus[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2023(14): 86-90, 137-139 (in Chinese).
- [19] 王亚楠, 陈昌国. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(5): 504-511.
- WANG YN, CHEN CG. Advances in the research of recombinase polymerase amplification technology[J]. Medical Journal of Chinese PLA, 2021, 46(5): 504-511 (in Chinese).
- [20] JIANG T, HU XY, LIN CH, XIA ZX, YANG WS, ZHU Y, XU HM, TANG H, SHEN JL. Rapid visualization of *Clostridioides difficile* toxins A and B by multiplex RPA combined with CRISPR-Cas12a[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1119395.
- [21] XIA LP, YIN JX, ZHUANG JJ, YIN WH, ZOU ZY, MU Y. Adsorption-free self-priming direct digital dual-crRNA CRISPR/Cas12a-assisted chip for ultrasensitive detection of pathogens[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(10): 4744-4752.
- [22] SUN Z, LIN KF, ZHAO ZH, WANG Y, HONG XX, GUO JG, RUAN QY, LU LY, LI X, ZHANG R, YANG CY, LI BA. An automated nucleic acid detection platform using digital microfluidics with an optimized Cas12a system[J]. Science China Chemistry, 2022, 65(3): 630-640.
- [23] HUANG BC, LOU YF, ZENG ZH, KAN XC, SHI XP,

- WU Y, GUO L, WANG MZ, HUANG XX, TIAN XM, WANG XJ. A Cas12a-based fluorescent microfluidic system for rapid on-site human papillomavirus diagnostics[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(20): 6287-6297.
- [24] ZHANG WS, PAN JB, LI F, ZHU M, XU MT, ZHU HY, YU YY, SU GX. Reverse transcription recombinase polymerase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for facile and highly sensitive colorimetric SARS-CoV-2 detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(8): 4126-4133.
- [25] MAO GB, LUO X, YE SL, WANG X, HE J, KONG JL, DAI JB, YIN W, MA YX. Fluorescence and colorimetric analysis of African swine fever virus based on the RPA-assisted CRISPR/Cas12a strategy[J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(20): 8063-8069.
- [26] 左晓维, 雷琳, 刘河冰, 陶晓奇. 荧光免疫分析法检测食品中黄曲霉毒素的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(1): 236-245.
- ZUO XW, LEI L, LIU HB, TAO XQ. Research progress on detecting aflatoxins in foods using fluorescence immunoassay[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(1): 236-245 (in Chinese).
- [27] LIN LY, ZHA GC, WEI HG, ZHENG YZ, YANG PK, LIU YQ, LIU MQ, WANG ZH, ZOU XH, ZHU H, LUO QL, LI JQ, LIN M. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in food safety using an RPA-CRISPR-Cas12a assay[J]. *Food Control*, 2023, 145: 109505.
- [28] WANG LY, FU JY, CAI G, CHENG XY, ZHANG D, SHI SB, ZHANG YP. Rapid and visual RPA-Cas12a fluorescence assay for accurate detection of dermatophytes in cats and dogs[J]. *Biosensors*, 2022, 12(8): 636.
- [29] CHARLEBOIS I, GRAVEL C, ARRAD N, BOISSINOT M, BERGERON MG, LECLERC M. Impact of DNA sequence and oligonucleotide length on a polythiophene-based fluorescent DNA biosensor[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2013, 13(6): 717-722.
- [30] 刘华, 曾海娟, 唐雪明, 徐丹红, 雒嘉伟, 王金斌. 基于 RPA-CRISPR-Cas12a 和聚噻吩显色技术快速检测转基因植物外源基因 *CP4-EPSPS*[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(23): 7758-7764.
- LIU H, ZENG HJ, TANG XM, XU DH, LUO JW, WANG JB. Rapid detection of transgenic plant exogenous *CP4-EPSPS* gene based on RPA-CRISPR-Cas12a and polythiophene chromogenic technology[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(23): 7758-7764 (in Chinese).
- [31] JIANG W, HE C, BAI L, CHEN YF, JIA JW, PAN AH, LV BB, TANG XM, WU X. A rapid and visual method for nucleic acid detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on CRISPR/Cas12a-PMNT[J]. *Foods*, 2023, 12(2): 236.
- [32] RICKWOOD D, HAMES D. 赵大健, 等译. 核酸的凝胶电泳: 实践方法[M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- RICKWOOD D, HAMES D. Translated by ZHAO DJ et al. *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach*[M]. Beijing: Science Press, 1989 (in Chinese).
- [33] TIAN XZ, YI YX, XU J, LUO ZQ, XING N, WANG ZB, CHEN SN, YE X, SHEN YL. Development of rapid detection technology for HPV16 based on CRISPR-Cas12a[J]. *Journal of Biological Regulators Homeostatic Agents*. 2022, 36(5): 1661-1668.
- [34] 黄坚, 刘韵佳, 杨晓农, 李妍. 猫疱疹病毒 1 型 RPA-Cas12a-LFD 检测方法的建立及初步应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(5): 1638-1643.
- HUANG J, LIU YJ, YANG XN, LI Y. RPA-Cas12a-LFD based nucleic acid detection for feline herpesvirus-1 and preliminary application[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(5): 1638-1643 (in Chinese).
- [35] LIU H, WANG JB, HU XW, TANG XM, ZHANG C. A rapid and high-throughput *Helicobacter pylori* RPA-CRISPR/Cas12a-based nucleic acid detection system[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2023, 540: 117201.
- [36] 何雨龙, 王佳歌, 赵珊珊, 高锦, 常英英, 赵喜亭, 聂碧华, 杨清香, 张江利, 李明军. 马铃薯 Y 病毒 RPA-CRISPR/Cas12a 检测技术体系的建立与应用[J]. *植物学报*, 2022, 57(3): 308-319.
- HE YL, WANG JG, ZHAO SS, GAO J, CHANG YY, ZHAO XT, NIE BH, YANG QX, ZHANG JL, LI MJ. Establishment and application of RPA-CRISPR/Cas12a detection system for potato virus Y[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2022, 57(3): 308-319 (in Chinese).
- [37] GONG L, WANG XW, LI Z, HUANG GC, ZHANG W, NIE J, WU CY, LIU DS. Integrated trinity test with RPA-CRISPR/Cas12a-fluorescence for real-time detection of respiratory syncytial virus A or B[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 819931.
- [38] 栾天, 龚俊, 栾慧, 刘文宇, 杨亲, 祝瑶, 王春来, 刘思国, 张万江, 李刚. 利用 CRISPR/Cas12a 技术快速检测胸膜肺炎放线杆菌方法的建立[J]. *中国预防兽*

- 医学报, 2021(8): 843-847.
- LUAN T, GONG J, LUAN H, LIU WY, YANG Q, ZHU Y, WANG CL, LIU SG, ZHANG WJ, LI G. Establishment of a visual method for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on CRISPR-Cas12a[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021(8): 843-847 (in Chinese).
- [39] HAO J, XIE LF, YANG TM, HUO ZP, LIU GF, LIU YH, XIONG WG, ZENG ZL. Naked-eye on-site detection platform for *Pasteurella multocida* based on the CRISPR-Cas12a system coupled with recombinase polymerase amplification[J]. Talanta, 2023, 255: 124220.
- [40] 王月华, 胡珊, 杨英. 病原真菌的检测技术进展[J]. 生物技术通讯, 2020, 31(01): 117-123, 128.
- WANG YH, HU S, YANG Y. Advances in detection technologies of pathogenic fungi[J]. Letters in Biotechnology. 2020, 31(01): 117-123, 128 (in Chinese).
- [41] LI S, WANG XC, YU YH, CAO SG, LIU J, ZHAO PP, LI JH, ZHANG XC, LI X, ZHANG N, SUN M, CAO LL, GONG PT. Correction: establishment and application of a CRISPR-Cas12a-based RPA-LFS and fluorescence for the detection of *Trichomonas vaginalis*[J]. Parasites & Vectors, 2022, 15(1): 429.
- [42] JIAO J, KONG KK, HAN JM, SONG SW, BAI TH, SONG CH, WANG MM, YAN ZL, ZHANG HT, ZHANG RP, FENG JC, ZHENG XB. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(2): 394-405.
- [43] 张庆勋, 钟震宇, 郭青云, 何宏轩, 白加德. 基于 CRISPR-Cas 系统的病原体检测研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(8): 3190-3199.
- ZHANG QX, ZHONG ZY, GUO QY, HE HX, BAI JD. Recent advances of pathogens detection based on CRISPR-Cas system[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(8): 3190-3199 (in Chinese).