



胡金强,谢顺欣,贺雅玥,等. CRISPR/Cas12a-核酸等温扩增技术在食源性致病菌检测中的研究进展[J]. 轻工学报,2026,41(3):1-9.
HU J Q, XIE S X, HE Y Y, et al. Research advances of CRISPR/Cas12a-nucleic acid isothermal amplification technology in the detection of foodborne pathogens[J]. Journal of Light Industry, 2026, 41(3): 1-9.
DOI: 10.12187/2026.03.001

CRISPR/Cas12a-核酸等温扩增技术在食源性致病菌检测中的研究进展

胡金强^{1,2}, 谢顺欣¹, 贺雅玥¹, 郭安¹, 孙新城^{1,2}, 董彩文^{1,2}, 耿尧^{1,2}, 高辉^{1,2}

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 河南省食品安全国际联合实验室, 河南 郑州 450001

摘要: CRISPR/Cas12a 基因编辑系统能够高效识别和切割外源核酸, 推动基于核酸的新型食源性致病菌检测技术的创新与发展。基于 CRISPR/Cas12a 系统的检测机制, 综述了其于环介导等温扩增(LAMP)、重组酶聚合酶等温扩增(RPA)、重组酶介导等温扩增(RAA)、滚环扩增(RCA)、杂交链式反应(HCR)、链置换扩增(SDA)及指数扩增反应(EXPAR)多种核酸等温扩增技术相结合用于食源性致病菌检测的研究进展。CRISPR/Cas12a 与多种核酸等温扩增技术结合可实现对食源性致病菌的高特异性和高灵敏度的可视化检测, 具有操作简便、速度快、无需复杂仪器设备等优点, 但同时也存在试剂成本高、温度控制范围窄、操作相对复杂、引物设计要求高、标准化程度较低等缺陷。CRISPR/Cas12a 与核酸等温扩增技术联用的未来发展方向主要集中在提升检测通量与准确性、自动化、一体化及基于智能手机和人工智能的检测平台建设, 实现“样本进、结果出”的一锅法现场检测, 为食源性致病菌更加高效、灵敏、简便、快捷的检测提供技术支持。

关键词: 食源性致病菌; CRISPR/Cas12a; 核酸等温扩增技术; 基因检测

中图分类号: TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2026)03-0001-09

0 引言

食源性致病菌是导致食源性疾病的主要因素。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)统计, 全球每年约有6亿人感染食源性致病菌, 其中约3300万人患病, 42万人死亡, 造成巨大的生命财产损失^[1]。食源性致病菌常在食品生产、加工、包装及贮存过程中污染食品, 可能引发胃肠炎甚至败血症等多种公共健康问题, 同时导致食品召回等经

济损失, 以及消费者信心和政府公信力下降^[2-4]。食源性致病菌引发的食品安全问题已受到政府部门、食品企业、餐饮单位、研究人员及消费者的高度关注。因此, 建立快速、灵敏及高效的检测方法, 实现对复杂食品基质中食源性致病菌的精准筛查, 对保障食品安全及维护公众健康具有重要意义^[5-6]。

为有效应对全球食品安全问题频发的现状, 食源性致病菌检测技术不断更新迭代。当前主要检测方法包括传统微生物培养法^[7]、以核酸扩增为核

收稿日期: 2025-04-08; 修回日期: 2025-07-07; 出版日期: 2026-06-15

基金项目: 河南省科技攻关项目(242102321132); 河南省大学生创新训练计划项目(202410462037); 星空众创空间创新培育孵化项目(第一层次)(2020ZCKJ103)

作者简介: 胡金强(1979—), 男, 河南省信阳市人, 郑州轻工业大学副教授, 博士, 主要研究方向为食品安全。E-mail: jqhu@hotmail.com

心的分子生物学技术(如聚合酶链式反应和等温扩增技术)^[8-9]、基于抗原-抗体反应的免疫学方法(如酶联免疫吸附测定和免疫层析)^[10-11]、仪器分析法(如质谱和生物传感器)^[12-13]等。上述检测方法虽在不同检测场景下各具优势,但普遍存在依赖仪器设备、操作复杂、灵敏度和特异性不足、耗时、需专业技术人员等局限,难以满足 WHO 提出的 ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free, Deliverable to end-users) 技术标准^[14-16]。

近年来,规律成簇间隔短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-Associated Proteins, Cas)构成的 CRISPR/Cas 系统,凭借其精准的核酸定位与切割能力,在食源性病原体检测、转基因食品鉴定、食品掺假鉴别、食品有害物质监测、食品新鲜度评估、食品供应链监管等食品安全领域展现出巨大潜力^[17-19]。同时,核酸等温扩增技术,如环介导等温扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)、重组酶聚合酶等温扩增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)、重组酶介导等温扩增(Recombinase-Aided Amplification, RAA)、滚环扩增(Rolling Circle Amplification, RCA)、杂交链式反应(Hybridization Chain Reaction, HCR)、链置换扩增(Strand Displacement Amplification, SDA)、指数扩增反应(Exponential Amplification Reaction, EXPAR)等,具有无需依赖精密控温设备、扩增效率高、对抑制成分耐受性强等优势,可在恒定温度下实现对目标 DNA 的快速复制扩增,从而显著提升 DNA 检测的灵敏度与准确性,并已成功应用于食源性病原体检测、转基因作物筛查、食品掺假鉴别等场景^[20-22]。因此,将 CRISPR/Cas 与多种核酸等温扩增技术相结合,可进一步提升核酸检测的灵敏性、特异性与便捷性,为食源性致病菌的高效检测提供新的技术思路^[23-24]。本文拟对 CRISPR/Cas12a 的检测机制及其与核酸等温扩增技术结合在食源性致病菌检测中的应用进行综述,同时探讨现有检测方法的局限性,以期对食源性致病菌检测提供技术参考,指出发展方向。

1 CRISPR/Cas12a 检测机制

CRISPR/Cas 系统是原核生物进化过程中形成的一种适应性免疫防御机制,用于抵御噬菌体等外源遗传物质的入侵。该系统由 CRISPR 和 Cas 蛋白组成,其中 CRISPR 序列由高度保守的短重复序列(Repeats)与间隔序列(Spacers)交替排列组成,其中 Spacers 来源于入侵的外源遗传物质,可作为分子记忆介导特异性免疫应答;Cas 蛋白则是一类具有核酸酶活性的功能蛋白,可特异性识别并切割外源核酸。依据 Cas 基因及其编码蛋白的结构特征,CRISPR/Cas 系统主要分为两大类:第一类系统(包括 I、Ⅲ和Ⅳ型)依赖多个 Cas 蛋白复合物协同完成外源核酸的识别与切割;第二类系统(包括Ⅱ、Ⅴ和Ⅵ型)仅通过单一 Cas 蛋白即可实现靶标序列的特异性识别与切割,因操作简便和效率高,其在基因编辑、分子诊断等领域展现出显著优势,已成为生物医学研究的核心工具^[25-26]。

Cas12a(Cpf1)蛋白作为二类Ⅴ型核酸内切酶,其基因编辑功能始于对前间隔序列邻近基序(Protospacer Adjacent Motif, PAM)的特异性识别。该蛋白识别的 PAM 序列具有明显的 T 碱基偏好性,其典型序列为 5'-TTTN-3'。PAM 识别后,crRNA (CRISPR RNA)与目标 DNA 链通过碱基互补配对形成“R 环”结构。在此过程中,PAM 末端核苷酸与靶链起始核苷酸之间的磷酸基团通过与 Cas12a 蛋白特定氨基酸残基的相互作用,稳定 DNA 解旋所产生的结构变化;同时,Cas12a 蛋白的赖氨酸残基可促进靶 DNA 解旋。crRNA 间隔区 5'端的 5~6 个核苷酸在 RNA-DNA 异源双链形成中起关键作用,该结构变化可激活 Cas12a 的非特异性单链 DNA (ssDNA)反式切割活性^[27-30](见图 1)。

2 基于 CRISPR/Cas12a 的核酸等温扩增检测技术及其应用

CRISPR/Cas12a 系统因其特异性识别靶标序列和信号放大功能,在分子检测中展现出显著优势。然而,食品样品中复杂的基质成分及痕量靶标会大幅降低其检测灵敏度。因此,在实际应用中,通常

携化纸基设计显著提升了现场检测的可行性。此外, M. Y. Qiu 等^[41]拓展了 CRISPR 信号转导的化学维度, 通过将 Cas12a 的反式切割活性与铜(II)依赖性点击化学反应(Cu(II)AAC)偶联, 利用 RPA 扩增后释放的活性铜离子催化荧光分子生成, 实现对肠道沙门氏菌的高灵敏检测(1 CFU/mL)。

CRISPR/Cas12a 与 RPA 结合在核酸检测领域展现了快速、灵敏、便携等优势, 但该方法存在引物设计与优化难度高、具有非特异性扩增风险、产物长度受限、引物合成成本高等问题。

2.3 CRISPR/Cas12a-RAA

RAA 与 RPA 原理相似, 需依赖重组酶、SSB 单链蛋白和 DNA 聚合酶实现对目的基因的扩增^[42-43]。CRISPR/Cas12a 与 RAA 技术结合, 已成功应用于多种病原微生物的检测。作为典型的 SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) 和 DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter) 基因检测系统, 通过 CRISPR/Cas 与 RAA 的协同作用, 实现了对食品基质中病原菌的多模式检测, 显著提升了检测性能和效率。例如, G. W. Xing 等^[44]将微流控技术与 CRISPR/Cas12a-RAA 系统结合, 通过指压驱动单向阀实现扩增区域与检测区域的物理隔离, 构建了可同时检测 7 种食源性致病菌的便携式平台。该平台利用智能手机荧光分析模块采集信号, 对蜡样芽胞杆菌等的检测限低于 5×10^2 CFU/mL, 其高通量与微型化设计显著提升了现场检测的适用性和可操作性。Y. Zhao 等^[45]引入纳米材料工程策略, 使用 ZIF-8@FLS 复合材料替代传统 FQ 荧光探针作为荧光信号放大器, 通过 RAA 扩增与 Cas12a 切割的级联反应激活纳米材料的荧光释放, 进一步提高了检测灵敏度, 使鼠伤寒沙门氏菌的检测灵敏度提升至 1.3×10^2 CFU/mL, 且在牛奶样本中展现良好的检测线性范围 ($1.4 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^7$ CFU/mL)。相比之下, F. Li 等^[46]从电化学信号转导机制入手, 通过 Au-S 键将亚甲基蓝 (Methylene Blue, MB) 标记的 ssDNA 探针固定于电极表面, 当靶标存在时, Cas12a 切割效应促使探针解离, 引起电流信号变化, 实现对单增李斯特菌的高灵敏检测 (26 CFU/mL), 为免

标记电化学传感提供了新的检测范式。

综上所述, CRISPR/Cas12a-RAA 技术在食源性致病菌检测中具有灵敏度高、特异性强、可操作性良好等优势。然而, 该方法仍存在 RAA 引物设计复杂且特异性要求高、扩增效率明显下降 (扩增产物 > 1 kb)、反应条件波动超过 ± 2 °C 可能会导致酶失活或非特异性扩增等问题。

2.4 CRISPR/Cas12a-RCA

RCA 以环状 DNA 为模板, 在链置换 DNA 聚合酶 (如 Phi29 DNA 聚合酶) 的催化下, 利用单引物或多引物, 扩增产生大量串联重复的 ssDNA^[47]。凭借其高扩增效率与优异特异性, RCA 在生物传感领域得到广泛应用。例如, X. R. Xiang 等^[48]针对检测技术的现场适用性, 创新性地 将磁性纳米颗粒介导的三明治免疫捕获、微流控芯片驱动的 CRISPR/Cas12a-RCA 反应与 3D 打印-智能手机集成模块相结合, 开发了一种便携式生物传感平台。该平台通过磁分离富集靶标并自动执行检测步骤, 使鼠伤寒沙门氏菌的检测灵敏度达 1.93×10^2 CFU/mL。Z. B. Chen 等^[49]通过精准调控 RCA 与 CRISPR/Cas12a 反式切割的时空顺序, 构建了单管一步式电化学生物传感器。该传感器利用靶标触发的级联电化学信号, 实现了大肠杆菌 O157:H7 的广线性 ($10 \sim 10^7$ CFU/mL) 与高灵敏性 (10 CFU/mL) 检测。Q. Wu 等^[50]进一步拓展了光控技术的应用维度, 通过光裂解 ssDNA (PC-DNA) 可逆调控 crRNA 与 Cas12a 的活性, 建立了动态响应型 CRISPR/Cas12a-RCA 检测平台。该平台将金黄色葡萄球菌的检测限降低至 2 CFU/mL, 且在临床样本双盲实验中也验证了该方法的可靠性, 为复杂食品基质中痕量病原菌的精准检测提供了新的技术模式。

综上所述, CRISPR/Cas12a-RCA 技术在食源性致病菌检测中具有操作简便、特异性强、经济适用等优势。然而, 该技术存在 RCA 对环状模板依赖性高和扩增速度较慢, RCA 产生的重复序列可能导致 Cas12a 蛋白脱靶, 从而降低检测特异性等缺陷。

2.5 CRISPR/Cas12a-HCR

HCR 技术因其设计灵活性和强大的信号放大能力, 已成为生物传感领域的重要工具^[51-52], 其作用

依赖于2个亚稳态DNA发夹的级联反应,即特异性触发链首先与H1发夹结合,暴露与H2互补的区域;随后H2与H1杂交并打开,引发H1-H2交替组装。这种自持续的链式反应最终形成周期性缺口的超长双链DNA结构,实现信号的指数放大。HCR与CRISPR/Cas12联用技术在生物传感、疾病诊断、环境监测、食品安全检测等领域均有广泛应用。

X. Liu等^[53]将HCR与电化学传感结合,HCR生成的dsDNA激活Cas12a,对电极表面ssDNA标签进行非特异性切割,利用适配体修饰的磁珠实现靶标特异性富集及电化学信号的动态调控,最终构建了对鼠伤寒沙门氏菌检测限为20 CFU/mL的高选择性传感器。X. R. Ren等^[54]设计了线性调节自催化DNA电路(LC@ADC),将适配体识别与双环发夹介导的HCR相结合,生成具有类酶活性的DNAzyme以激活CRISPR/Cas12a系统,实现了鼠伤寒沙门氏菌的靶标依赖性荧光信号放大。该系统检测限低至6.53 CFU/mL,线性范围为 $10 \sim 10^5$ CFU/mL,已成功应用于橙汁、鸡肉、湖水等实际样品的致病菌检测。Z. H. Qiao等^[55]进一步优化了适配体介导的靶标捕获与信号放大策略,通过生物素-链霉亲和素系统构建多价适配体功能化磁性纳米束(HCR-multiApt),利用HCR产物的多CRISPR靶向单元增强Cas12a的旁切激活效率,显著提高了沙门氏菌检测的灵敏度(2 CFU/mL)及动态范围($10^2 \sim 10^7$ CFU/mL)。

综上所述,CRISPR/Cas12a-HCR技术具备非酶依赖性,且信号放大能力、生物相容性良好,兼容性广泛,操作简便。然而,该技术仍存在一定局限性,例如序列设计复杂、背景渗漏、反应速度较慢、定量分析困难、对模板纯度要求较高等。

2.6 CRISPR/Cas12a与其他核酸等温扩增技术联用

SDA利用链置换DNA聚合酶和限制性内切酶在30~55℃恒温条件下实现核酸扩增^[56],将其与CRISPR/Cas12结合可提升检测灵敏度、系统兼容性及操作便捷性。Y. Q. Liu等^[57]创新性设计了可编程T型结构辅助的SDA-CRISPR/Cas12a系统,利用Zr基卟啉金属有机框架(PCN-224)作为共反应

促进剂增强CdS量子点的电化学发光(Electrochemical Luminescence Bio Sensor, ECL)强度,并通过Nt. BbvCI酶介导的循环扩增生生成大量ssDNA,激活Cas12a的反式切割活性,最终实现金黄色葡萄球菌16S rDNA的飞摩尔级检测(检测限0.437 fmol/L,线性范围 $1 \sim 10^7$ fmol/L)。S. J. Wang等^[58]构建了基于3D DNA滚轮信号放大机制的ECL生物传感器,通过SDA扩增的大肠杆菌16S rDNA触发DNA滚轮自组装,释放激活Cas12a的ssDNA触发器,从而切割ECL信号探针,实现信号动态调控。同时构建了SnS₂ QDs/S₂O₈²⁻/MnO₂ NFs三元ECL体系,以MnO₂ NFs作为共反应促进剂显著增强SnS₂ QDs量子点的ECL发光性能,进一步提升传感响应灵敏度。该方法的检测限低至27.29 amol/L,响应范围为 $100 \sim 10^{10}$ amol/L。尽管CRISPR/Cas12a-SDA技术显著提升了检测灵敏度,但其应用仍面临诸多挑战,如SDA易受酶浓度及温度波动影响导致体系稳定性下降和非特异性扩增,此外,SDA生成的短链产物或链置换中间体可能被Cas12a非特异性识别,从而产生假阳性结果。

EXPAR是一种基于核酸内切酶和链置换DNA聚合酶的等温核酸扩增技术。EXPAR依赖功能模板与触发探针的特异性结合,通过核酸内切酶产生切口并启动链置换扩增,实现靶标核酸的指数级富集^[59]。范贝贝^[60]将EXPAR与CRISPR/Cas12a结合,通过设计信号转化探针,将扩增产物转化为Cas12a可识别的激活序列,并集成3D打印技术开发了便携式检测装置,实现对肠炎沙门氏菌的检测,检测限为36.3 CFU/mL,线性范围为 $3.63 \times 10^1 \sim 3.63 \times 10^6$ CFU/mL,在食品安全现场检测中展现了一定的应用潜力。然而,CRISPR/Cas12a-EXPAR技术在复杂食品基质中的应用仍面临诸多挑战,如EXPAR对cDNA模板的依赖性限制了其对基因组靶标的检测能力,多重酶反应步骤的协同优化难度较高,并且容易产生非特异性扩增,导致灵敏度下降。

3 结论与展望

本文基于CRISPR/Cas12a系统检测机制,综述

了 CRISPR/Cas12a 基因编辑技术与核酸等温扩增技术相结合应用于食源性致病菌检测的研究进展。CRISPR/Cas12a 与核酸等温扩增技术结合显著提升了食源性致病菌检测的灵敏度、速度与便捷性,突破了传统方法依赖仪器、操作复杂、耗时耗力等技术瓶颈,为食源性致病菌的监测、溯源及流行病学分析提供了重要手段。虽然两者结合已在食源性致病菌检测中具有明显优势,未来仍有以下方向可进一步拓展和优化:1) 针对多靶标检测需求,可创新性地采用物理隔离策略,将不同 CRISPR/Cas12a 检测单元集成于芯片装置中,利用微流控液滴生成系统或纳米孔阵列结构,在空间维度实现单分子水平的多靶标独立反应,从而显著提升检测通量与准确性;2) 针对现有操作流程中核酸提取、预扩增与 CRISPR 检测需分步进行的情形,可考虑构建全流程一体化检测平台,实现从样本采集到结果显示的自动化操作;3) 鉴于当前 CRISPR 检测系统终端信号采集依赖大型仪器的局限性与 POCT 需求,未来可将智能手机作为核心硬件载体,通过摄像头捕获荧光、比色、电化学信号等,并结合边缘计算和轻量化 AI 模型实现离线实时分析,最终利用区块链技术生成加密溯源报告,构建集便携信号采集、智能解析与监管追踪于一体的智能化现场检测系统。

参考文献:

- [1] 孙献周,于琪,张巧. 食品中食源性致病菌污染现状及危害[J]. 河南医学高等专科学校学报,2021,33(3):335-339.
SUN X Z, YU Q, ZHANG Q. Pollution status and harm of foodborne pathogens in food [J]. Journal of Henan Medical College, 2021, 33(3):335-339.
- [2] 白芷烨,汪雯,吉小凤,等. CRISPR 在食源性致病菌进化分析、检测分型及毒力耐药调控中的应用进展[J]. 生物工程学报,2021,37(7):2414-2424.
BAI Z Y, WANG W, JI X F, et al. Application of CRISPR in evolution analysis, detecting and typing, virulence and antibiotic resistance regulation in food-borne pathogens [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(7):2414-2424.
- [3] 金姗姗,王义哲,赵喜红. 食源性致病菌耐药性与成簇的规律间隔短回文重复序列系统关联性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(24):9301-9307.
JIN S S, WANG Y Z, ZHAO X H. Research progress on

the relationship between the drug resistance of food-borne pathogens and the clustered regularly interspaced short palindromic repeats system [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24):9301-9307.

- [4] 肖芳斌,刘瑞,占忠旭,等. 生物传感器在食源性致病菌检测中应用的研究进展[J]. 生物工程学报,2019,35(9):1581-1589.
XIAO F B, LIU R, ZHAN Z X, et al. Research progress of biosensors in the detection of foodborne pathogens [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(9):1581-1589.
- [5] ZHANG Y, HU X Z, WANG Q J, et al. Recent advances in microchip-based methods for the detection of pathogenic bacteria [J]. Chinese Chemical Letters, 2022, 33(6):2817-2831.
- [6] ZHAO Y J, LIANG L, LV Q B, et al. Research progress on digital PCR in detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. BIO Web of Conferences, 2024, 142:03023.
- [7] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则:GB 4789.1—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. National food safety standard food microbiological examination: General principles: GB 4789.1—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [8] 王栋,王旭,陈卓. 聚合酶链式反应技术在食品微生物检测中的应用进展[J]. 福建医科大学学报,2016,50(3):213-216.
WANG D, WANG X, CHEN Z. Application progress of polymerase chain reaction technology in food microorganism detection [J]. Journal of Fujian Medical University, 2016, 50(3):213-216.
- [9] 管昭巍,齐丽娟,张玉,等. 等温核酸扩增技术在食品安全中的应用研究进展[J]. 分析化学,2023,51(7):1077-1085.
GUAN Z W, QI L J, ZHANG Y, et al. Research progress in application of isothermal nucleic acid amplification technology in food safety [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2023, 51(7):1077-1085.
- [10] 胡子聪,刘香云,董华,等. 酶联免疫吸附反应在食品安全检测中的应用研究进展[J]. 粮油与饲料科技,2022(3):23-27.
HU Z C, LIU X Y, DONG H, et al. Research progress on application of enzyme-linked immunosorbent assay in food safety detection [J]. Grain Oil and Feed Technology, 2022(3):23-27.
- [11] 谢桂芳,赖飞,王艺蓉,等. 胶体金免疫层析法在食品快速检测中的应用研究进展[J]. 食品安全导刊,2023(32):181-185.
XIE G F, LAI F, WANG Y R, et al. The progress of the

- application of colloidal gold immunochromatography in rapid food detection [J]. *Food Safety Guide Magazine*, 2023(32):181-185.
- [12] 邱亚锋,郭路遥,雷婉婷,等. 高分辨质谱技术在食用农产品质量安全检测中应用的研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2024(19):187-189.
- QIU Y F, GUO L Y, LEI W T, et al. Research progress of application of high resolution mass spectrometry in quality and safety detection of edible agricultural products [J]. *China Food Safety Magazine*, 2024(19):187-189.
- [13] 窦国霞. 生物传感器在食品质量安全检测中的应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(22):181-187.
- DOU G X. Research progress on application of biosensors in food quality and safety detection [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2024, 15(22):181-187.
- [14] CORO F, DE MARIA C, MANGANO V D, et al. Technologies for the point-of-care diagnosis of malaria: A scoping review [J]. *Infectious Diseases of Poverty*, 2025, 14(3):13-24.
- [15] WU W H, LI J, PAN D, et al. Gold nanoparticle-based enzyme-linked antibody-aptamer sandwich assay for detection of *Salmonella typhimurium* [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(19):16974-16981.
- [16] 李苙,张海洋,张琦. 食源性疾病监控及体系建设探究[J]. *食品安全导刊*, 2020(11):40-41.
- LI J, ZHANG H Y, ZHANG Q. Study on monitoring and system construction of food-borne diseases [J]. *China Food Safety Magazine*, 2020(11):40-41.
- [17] LAPEE-E V, NUANUALSUWAN S, HONGTANEE L, et al. Paper-based CRISPR-Cas diagnostics: A comprehensive review of advances and applications in disease detection [J]. *Microchemical Journal*, 2025, 211:113055.
- [18] BABAIE E, SMAIL S W, BALAKY S T J, et al. Nanozyme-assisted CRISPR/Cas systems as an emerging platform for food safety applications: Recent advances [J]. *Microchemical Journal*, 2025, 212:113270.
- [19] 于丽雅,谢刚,张艳,等. 基于 CRISPR/Cas12a 系统的生物传感器在食品安全检测领域的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(18):378-388.
- YU L Y, XIE G, ZHANG Y, et al. Recent advances in CRISPR/Cas12a-based biosensors for food safety detection [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2025, 51(18):378-388.
- [20] 郭雨涓,贾振军,刘瑞. 核酸等温扩增方法在食品安全检测中的应用综述[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(11):435-448.
- GUO Y M, JIA Z J, LIU R. Isothermal nucleic acid amplification technology [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2025, 51(11):435-448.
- [21] 张琪,庞立冬,苏群超,等. CRISPR/Cas-等温扩增技术在食源性病原菌检测中的研究进展[J]. *食品科学*, 2024, 45(7):310-321.
- ZHANG Q, PANG L D, SU Q C, et al. Research progress on clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas)-isothermal amplification in the detection of foodborne pathogens [J]. *Food Science*, 2024, 45(7):310-321.
- [22] 秦爱,张明娟,邓方进,等. 等温核酸扩增技术在食源性致病菌检测中的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(5):173-182.
- QIN A, ZHANG M J, DENG F J, et al. Research progress of isothermal nucleic acid amplification techniques in the detection of foodborne pathogens [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2023, 14(5):173-182.
- [23] MAO Z F, CHEN R P, WANG X J, et al. CRISPR/Cas12a-based technology: A powerful tool for biosensing in food safety [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 122:211-222.
- [24] STEENS J A, ZHU Y F, TAYLOR D W, et al. SCOPE enables type III CRISPR-Cas diagnostics using flexible targeting and stringent CARF ribonuclease activation [J]. *Nature Communications*, 2021, 12:5033.
- [25] 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.
- [26] XIE S L, YUE Y H, YANG F. Recent advances in CRISPR/Cas system-based biosensors for the detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. *Micromachines*, 2024, 15(11):1329.
- [27] SHMAKOV S, SMARGON A, SCOTT D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(3):169-182.
- [28] YU P H, YANG T T, ZHANG D C, et al. An all-in-one telomerase assay based on CRISPR-Cas12a trans-cleavage while telomere synthesis [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1159:338404.
- [29] 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):218-223.
- [30] 卜祥逢,蒋静,薛俊欣,等. CRISPR-Cas12a 在食源性致病菌检测中的应用 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(14):4479-4486.
- BU X F, JIANG J, XUE J X, et al. Application of CRISPR-Cas12a in the detection of foodborne pathogens [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(14):4479-4486.
- [31] 石磊,王曼,时国强,等. 环介导等温扩增技术研究进展 [J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(5):565-571.
- SHI L, WANG M, SHI G Q, et al. Research progress of

- loop-mediated isothermal amplification technology [J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2021, 41(5): 565-571.
- [32] 辛亮, 崔艳华, 张兰威. 环介导等温扩增技术快速检测食源性致病菌的研究进展 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(3): 211-220.
- XIN L, CUI Y H, ZHANG L W. Advance of loop-mediated isothermal amplification application in rapid detecting food-borne pathogenic microorganism [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(3): 211-220.
- [33] 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.
- [34] WANG Z W, CHEN H, HU A T, et al. Establishment of LAMP-CRISPR/Cas12a for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 and one-pot detection [J]. Food Microbiology, 2024, 124: 104622.
- [35] 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.
- [36] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [37] DENG H M, GAO Z Q. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques [J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 853: 30-45.
- [38] 王晓庆, 张海韵, 高晗, 等. 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 X Q, ZHANG H Y, GAO H, et al. Application of recombinase polymerase amplification technique for detection of pathogenic bacteria in foodborne [J]. Modern Food, 2023, 29(1): 11-14.
- [39] ARSHAD F, ABDILLAH A N, SHIVANAND P, et al. Dual-mode RPA/CRISPR-Cas12a biosensor based on silica and magnetic hybrid nanobeads for rapid detection of *Campylobacter jejuni* [J]. ACS Applied Bio Materials, 2025, 8(4): 2977-2984.
- [40] 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.
- [41] QIU M Y, TIAN Y L, WANG H B, et al. CRISPR/cas system meets CLICK-17 DNAzyme: A click chemistry-based fluorescence biosensing platform designed for highly sensitive detection of *Salmonella* [J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(4): 2244-2253.
- [42] YING W Q, FAN L, XIN S X, et al. A reverse-transcription recombinase-aided amplification assay for the rapid detection of the far-eastern subtype of tick-borne encephalitis virus [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2019, 32(5): 357-362.
- [43] ZHANG X P, GUO L C, MA R R, et al. Rapid detection of *Salmonella* with recombinase aided amplification [J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 139: 202-204.
- [44] 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.
- [45] ZHAO Y, YU Q Q, DUAN M L, et al. Locking-fluorescence signals regulated CRISPR/Cas12a biosensor based on metal-organic framework for sensitive detection of *Salmonella typhimurium* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(46): 25987-25996.
- [46] 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.
- [47] 杨玉琦, 何秀霞. 滚环扩增技术在电化学生物传感器中的应用 [J]. 生物技术进展, 2023, 13(6): 863-867.
- YANG Y Q, HE X X. Application of rolling circle amplification technique in electrochemical biosensors [J]. Current Biotechnology, 2023, 13(6): 863-867.
- [48] 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.
- [49] CHEN Z B, MA L, BU S J, et al. CRISPR/Cas12a and immuno-RCA based electrochemical biosensor for detecting pathogenic bacteria [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2021, 901: 115755.
- [50] WU Q, JIANG S, HUANG Y, et al. A one-pot method based on rolling circle amplification and light-activated CRISPR/Cas12a reaction for simple and highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus* [J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 477: 146814.
- [51] DIRKS R M, PIERCE N A. Triggered amplification by hybridization chain reaction [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(43): 15275-15278.
- [52] WU J T, LV J R, ZHENG X Q, et al. Hybridization chain reaction and its applications in biosensing [J]. Talanta, 2021, 234: 122637.
- [53] LIU X, BU S J, FENG J Q, et al. Electrochemical biosensor for detecting pathogenic bacteria based on a hybridization chain reaction and CRISPR-Cas12a [J].

- Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414 (2): 1073–1080.
- [54] REN X R, SUN W Q, LI B W, et al. Construction of linear causal-regulated and autocatalysis-driven DNA circuits for highly sensitive and specific detection of *Salmonella typhimurium*[J]. Food Control, 2025, 172:111153.
- [55] QIAO Z H, XUE L L, SUN M N, et al. Highly sensitive detection of *Salmonella* based on dual-functional HCR-mediated multivalent aptamer and amplification-free CRISPR/Cas12a system [J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1284:341998.
- [56] 朱桂池,许文静,张春阳. 基于信号扩增的荧光技术检测 MicroRNAs 的研究进展[J]. 集成技术,2015,4(4):1-9. ZHU G C, XU W J, ZHANG C Y. Progress in signal amplification-based fluorescence methods for MicroRNAs assay[J]. Journal of Integration Technology, 2015, 4 (4): 1–9.
- [57] LIU Y Q, WANG F Y, GE S, et al. Programmable T-junction structure-assisted CRISPR/Cas12a electrochemiluminescence biosensor for detection of sa-16S rDNA [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2023, 15 (1): 617–625.
- [58] WANG S J, LIU Y Q, LIU R F, et al. Strand displacement amplification triggered 3D DNA roller assisted CRISPR/Cas12a electrochemiluminescence cascaded signal amplification for sensitive detection of Ec-16S rDNA [J]. Analytica Chimica Acta, 2024, 1291:342213.
- [59] VAN NESS J, VAN NESS L K, GALAS D J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100 (8): 4504–4509.
- [60] 范贝贝. 信号转化探针结合 EXPAR-CRISPR/Cas12a 技术现场检测肠炎沙门氏菌[D]. 长春:吉林大学,2024. FAN B B. On-site detection of *salmonella enteritidis* using signal conversion probes combined with EXPAR-CRISPR/Cas12a technology [D]. Changchun: Jilin University, 2024.

Research advances of CRISPR/Cas12a-nucleic acid isothermal amplification technology in the detection of foodborne pathogens

HU Jinqiang^{1,2}, XIE Shunxin¹, HE Yayue¹, GUO An¹, SUN Xincheng^{1,2},
DONG Caiwen^{1,2}, GENG Yao^{1,2}, GAO Hui^{1,2}

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Henan International Joint Laboratory of Food Safety, Zhengzhou 450001, China

Abstract: The CRISPR/Cas12a gene editing system can efficiently recognize and cleave exogenous nucleic acids, thus driving the innovation and development of nucleic acid-based detection technologies for foodborne pathogens. This review summarizes the research progress on integrating CRISPR/Cas 12a-based detection with various isothermal amplification techniques, including loop-mediated isothermal amplification (LAMP), recombinase polymerase amplification (RPA), recombinase-mediated amplification (RAA), rolling circle amplification (RCA), hybridization chain reaction (HCR), strand displacement amplification (SDA), and exponential amplification reaction (EXPAR), for the detection of foodborne pathogens. The combination of CRISPR/Cas12a with various isothermal amplification techniques enables highly specific and sensitive visual detection of foodborne pathogens, offering advantages such as simple operation, rapidity, and no requirement for complex instrumentation, while still facing limitations including high reagent costs, narrow temperature control range, relatively complex procedures, stringent primer design requirements, and low standardization. Future directions for the integration of CRISPR/Cas12a with isothermal amplification techniques focus on improving detection throughput and accuracy, developing automated and integrated platforms, and leveraging smartphone-based and artificial intelligence-based systems, thereby enabling “sample-in, result-out” one-pot on-site detection and providing technical support for more efficient, sensitive, simple, and rapid detection of foodborne pathogens.

Key words: foodborne pathogens; CRISPR/Cas12a; nucleic acid isothermal amplification; genetic detection

[责任编辑:王晓波]