



CRISPR单管等温扩增技术高灵敏检测核酸: 以检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2) RNA为例

冯薇^{2†}, 肖航^{1†}, 袁爱姣¹, 邓兆佳¹, 王小燕¹, 彭汉勇^{1*}, 乐晓春²

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085, 中国

2. 阿尔伯塔大学医学院病理和实验医学系, 分析和环境毒理研究所, 阿尔伯塔 T6G2G3, 加拿大

†同等贡献

*通讯作者, E-mail: hypeng@rcees.ac.cn

收稿日期: 2022-04-14; 接受日期: 2022-06-15; 网络版发表日期: 2022-09-02

国家自然科学基金(海外)和中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室的资助项目

摘要 簇状规则间隔短回文重复序列(CRISPR)及其相关蛋白(Cas)系统在分子检测领域正在快速发展, 在核酸识别上已展现出高特异性、可编程性和多系统兼容性, 成为一种极具潜力的分子诊断工具. 单独CRISPR-Cas系统检测RNA的灵敏度受到其反式切割动力学限制, 因此需要与等温核酸扩增技术联用. 将两个体系整合在单管中反应有两种策略: (1) 将等温扩增与CRISPR-Cas体系分隔在管内不同位置进行分步反应; (2) 在均相混合液中完成核酸扩增与检测. 单管检测的关键是对多个反应的兼容性进行研究, 从而最大限度地提升两种体系在同一条条件下的性能, 最后实现超高灵敏、快速、便捷地检测核酸. 本文聚焦于基于CRISPR的单管超灵敏SARS-CoV-2 RNA检测技术, 从方法开发的原理、性能和挑战等多个方面综述了近期的研究进展和发展方向, 并指出理解CRISPR-Cas系统的反式切割动力学的重要性.

关键词 CRISPR, 分子诊断, SARS-CoV-2, 等温扩增, 酶反应动力学, 即时检测, 核酸

1 引言

簇状规则间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白(Cas)系统来自于细菌和古菌中的一种获得性免疫防御系统^[1]. 改造后的CRISPR核酸序列和Cas蛋白能够快速、便捷地对基因组特定定位点进行剪切, 已经广泛应用于生物体的基因编辑. CRISPR-Cas系统由两部分组成^[2-6]: CRISPR RNA (crRNA)引导该系统在

基因组上的精准定位; Cas蛋白对相应基因位点进行切割. 与以往基因编辑技术相比, 如锌指核酸酶(ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)等^[7-9], CRISPR技术不再需要耗时设计核酸结合蛋白^[10,11], 仅通过编程crRNA序列便可以识别和切割不同的位点, 而Cas蛋白可保持不变, 从而极大地提升了基因编辑工具的灵活性和普适性^[12].

随着对CRISPR-Cas系统研究的逐渐深入, 各种不同功能的Cas蛋白相继被发现, CRISPR技术的应用范

引用格式: Feng W, Xiao H, Yuan A, Deng Z, Wang X, Peng H, Le XC. Integrating CRISPR and isothermal amplification reactions in single-tubes for ultrasensitive detection of nucleic acids: the SARS-CoV-2 RNA example. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 1685–1698, doi: 10.1360/SSC-2022-0076

围也拓展至核酸检测领域。CRISPR-Cas系统能够特异性地识别核酸序列并被激活,表现出靶向切割(顺式切割, *cis*-cleavage)和非特异性切割(反式切割, *trans*-cleavage),因而成为核酸识别与信号扩增的理想工具。基于CRISPR-Cas系统的分子检测方法主要使用了四种Cas蛋白: Cas9、Cas12、Cas13和Cas14 (Cas12f)^[13-16]。Cas9及Cas9切口酶(nCas9)的特异性顺式切割可用于核酸扩增方法的设计或与其他核酸扩增反应结合实现核酸序列的特异性检测^[12]。Cas12a/Cas14拥有与Cas9类似的双链DNA靶向识别和切割活性,此外, Cas12与靶标序列结合后将激活其反式切割性能,非特异性切割附近任何单链DNA^[17-19]。与前几种Cas蛋白不同, Cas13识别单链RNA目标,具有对RNA的顺式切割和反式切割能力^[20,21]。具有反式切割功能的Cas蛋白能够用于核酸的特异性识别和信号放大,这为分子检测领域提供了更多的可能性,有着广阔的应用前景^[22-29]。

全球新冠肺炎疫情爆发后,高灵敏度、高特异性、现场检测SARS-CoV-2的需求变得更加迫切,这进一步促进了基于CRISPR技术的生物分析工具的快速研发。与基于荧光探针RT-PCR方法相比,基于CRISPR技术的SARS-CoV-2 RNA检测方法提高了检测特异性,能够区分出单碱基突变体,摆脱了热循环仪等高成本仪器限制。与等温扩增方法联用后能够用于可视化的现场检测,具有快速、便捷、低成本的优势,成为RT-PCR检测方法的有力补充手段。SARS-CoV-2 RNA检测主要包含以下3个步骤:样品中RNA提取、RNA逆转录、核酸扩增和检测等。大多数方法依赖于等温扩增技术与CRISPR技术的联用,仅有少数方法单独使用CRISPR技术^[30]。联用方法中多步反应、反复开管的操作会造成扩增产物的环境污染,从而引起后续测试的假阳性^[23,24]。因此,避免反应过程中开管是非常有必要的,但是逆转录、等温扩增、CRISPR-Cas等多个体系集成到单管后的兼容性问题,是开发单管均相恒温检测方法要解决的首要难题。

本文首先介绍了CRISPR-Cas系统对核酸分子的识别和酶切机制,然后阐明了酶切动力学在开发基于CRISPR-Cas技术的分子检测方法中的重要作用,并讨论了文献报道的CRISPR-Cas系统反式切割动力学参数不一致的原因及修正过程。本文综述了在经典的CRISPR-Cas与等温扩增技术联用方法基础上,发展超灵敏单管检测SARS-CoV-2 RNA的最新研究进展,其

中重点阐述了为解决多个体系在单管中的兼容性问题所做的技术改进。

2 CRISPR-Cas系统对核酸分子的识别及酶切活性

CRISPR-Cas系统通过crRNA特异性识别目标核酸序列,激活Cas蛋白的核酸酶活性,将特异性识别转换为酶切行为,从而实现检测信号输出^[21]。在古生菌和细菌中存在多种CRISPR-Cas系统^[31],根据进化关系分为两个类别、五种类型和十多个亚型^[32]。依据核糖核蛋白效应复合物的性质可将CRISPR-Cas系统定义为两大类:第一类CRISPR-Cas系统依赖于多蛋白效应复合物,包含type I、type III、type IV三种类型^[1]。第二类CRISPR-Cas系统由单个蛋白执行功能,包含type II (Cas9)、type V (Cas12/Cas14)、type VI (Cas13)三种类型^[1]。第二类系统具有更易于重构和更高基因编辑效率的特点,成为应用于分析和诊断工具研发的主要CRISPR-Cas系统^[30]。本节重点介绍了第二类系统中几种Cas蛋白对不同核酸分子的识别和独特的核酸酶活性及这些特性在分子检测方法构建中的重要作用(图1)。

2.1 Cas9对dsDNA的靶向识别及切割

Cas9蛋白与tracrRNA和CRISPR RNA (crRNA)形成核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)。tracrRNA和crRNA可融合为单向导RNA (single guide RNA, sgRNA), sgRNA识别目标序列后, RNP被激活并切割双链DNA (dsDNA)^[4,5,33-38],其特异性识别取决于两个关键要素: (1) sgRNA 5'端20 nt间隔区(Spacer)的碱基与目标基因序列互补配对^[39]; (2) 识别与目标基因相邻的“原型间隔区相邻基序”(protospacer adjacent motif, PAM)。例如, SpCas9首先识别靶点序列下游的5'-NGG-3'位点^[40-42],接着crRNA与目标链(TS)上原型间隔区互补结合^[42],置换原型间隔区的互补链(“非目标链”, NTS),形成“R-loop”结构,激活Cas9的切割活性^[40]。PAM序列对SpCas9活性影响显著,基于此实现了Cas9在体外核酸检测中的应用(NASBACC, 基于核酸序列扩增的CRISPR切割),实现对双链DNA中碱基差异的区分^[43]。序列特异性结合过程也是Cas9系统捕获^[44,45]和原位标记^[46,47]目标基因的基础。

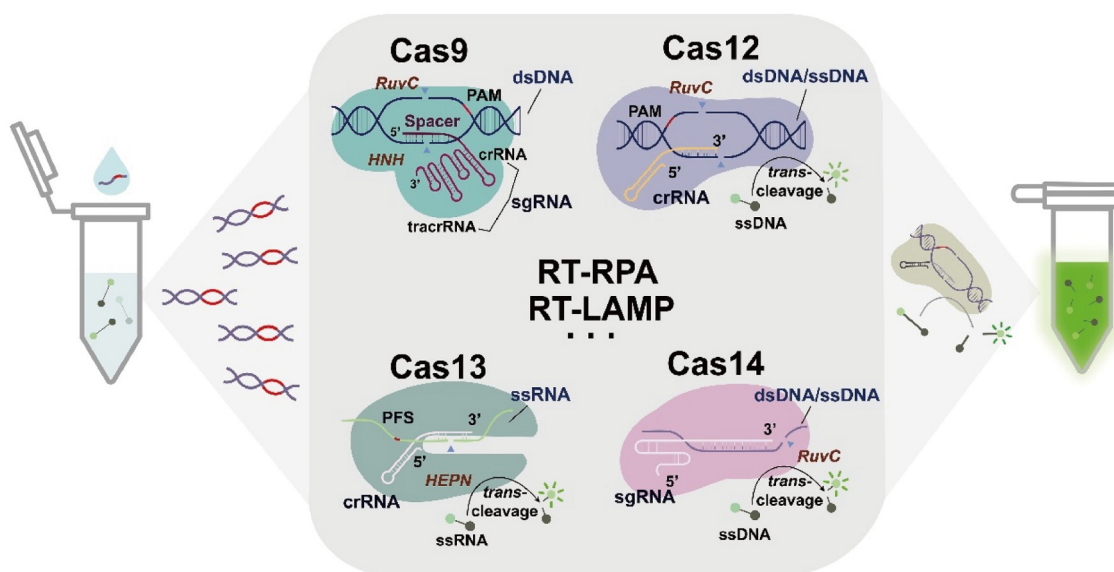


图 1 典型CRISPR-Cas系统的基本原理和核酸检测应用^[12](网络版彩图)

Figure 1 Schematic diagram and examples of CRISPR-Cas systems widely used in the development of various techniques for the detection of nucleic acids ^[12] (color online).

激活后的Cas9表现出核酸内切酶活性, 特异性切割目标序列. 该活性由Cas9蛋白核酸酶叶(NUC)上的HNH和RuvC两个结构域完成, 其中HNH结构域切割与crRNA互补的目标链, 而RuvC切割另一条链, 即非目标链. 通过分别突变两个结构域位点, 在第10位天冬氨酸(Asp10)或第840位组氨酸(His840)引入突变的Cas9 (nCas9)则起到类切口酶作用, 即在双链DNA中间形成单链切口, 产生可供进一步扩增的短链核酸, 该功能已被用于设计单管中核酸等温扩增反应^[43,48~50]. 与Cas12、Cas14和Cas13不同的是, Cas9不具有反式切割活性, 不能在激活后非特异性切割核酸探针^[47].

2.2 Cas12/Cas14对DNA的靶向识别、顺式切割及反式切割

Cas12和Cas14 (Cas12f)不仅能识别dsDNA, 还能识别单链DNA (ssDNA). 对dsDNA的识别与Cas9类似, 也需要特异性识别PAM和Spacer. 不同的Cas12识别的PAM序列有所不同, 例如, 5'-TTTV (LbCas12、AsCas12a), 5'-ATTN (BhCas12b)^[47,51~53]. Cas12b、Cas9都采用crRNA和tracrRNA引导Cas蛋白前往切割靶点, 但Cas12a仅采用crRNA作为引导核酸链. Cas12与Cas14对ssDNA的识别都无需PAM序列, 其特异性仅依赖于Spacer序列, 而Cas14比Cas12具有更高的ssDNA识别

特异性^[19]. Cas14蛋白主要有Cas14a、Cas14b和Cas14c三个亚型, 除了识别DNA外, Cas14a也能够识别RNA^[54].

激活后的Cas12能够切割ssDNA和dsDNA目标链(顺式切割), 该过程依赖于RuvC单个结构域. Cas12a切割双链时产生5~7个核苷酸长度的黏性末端切口^[15,55,56], 切割后远离PAM的DNA解离, 而近PAM端会持续与Cas12a结合. 激活后的Cas12还会对邻近的ssDNA进行非特异性切割(反式切割)^[57]. 这一功能常用于切割ssDNA探针, 产生并放大检测信号. Cas14也具有顺式切割和反式切割活性, 但机制和过程细节还需进一步研究^[47,58~60].

2.3 Cas13对RNA的靶向识别、顺式切割及反式切割

Cas13的靶向目标是单链RNA (ssRNA), 是首个被发现特异性识别RNA的Cas蛋白^[61~63], 具有顺式和反式切割ssRNA的功能. Cas13主要有Cas13a (也称为C2c2)、Cas13b、Cas13c和Cas13d^[20,56,64~66]四种亚型, 部分Cas13对目标链上“前间隔序列侧翼位点”(protospacer flanking site, PFS)有偏好^[20,21]. PFS不同于PAM, PFS是Protospacer下游的单个碱基, 有阻止单链RNA与crRNA上Spacer上游碱基配对的作用^[67].

当Cas13与目标ssRNA结合, crRNA的中心种子区域与ssRNA结合, 形成RNA双链体, 诱导Cas13a蛋白的构象变化, 激活HEPN催化位点, 产生核糖核酸酶(RNase)活性. 对邻近的ssRNA进行非特异性切割(反式切割)^[63,68,69]. 尽管Cas13a会对目标RNA进行顺式切割, 但在Spacer区域没有明确的切割位点, 反而多偏向于切割Spacer以外的位点^[63].

3 反式切割活性及其对核酸检测灵敏度的影响

3.1 Cas蛋白的反式切割动力学

在基于CRISPR技术的核酸检测方法中, 反式切割介导了信号产生和放大过程. 以荧光检测系统为例, 目标分子结合Cas蛋白后, 激活了Cas蛋白的反式切割活性. 荧光和淬灭基团同时标记的单链核酸底物被Cas蛋白切割, 脱离淬灭基团的荧光基团产生荧光信号而信号增长速率由反式切割动力学决定. 酶切割动力学参数通常采用米氏方程(Michaelis-Menten)来计算(式1). 首先测定一定浓度Cas酶(E)在一个较高的底物(S)浓度梯度范围内的初始切割速率(V_{int}), 通过式(1)计算在浓度 $[E]$ 下对饱和浓度底物的最大切割速率(V_{max}) and 米氏常数(K_M), 其中 K_M 代表着酶与底物的亲和力. 酶催化常数(k_{cat})代表着一个酶分子在单位时间内所能切割底物的个数, 由最大切割速率除以酶浓度算出(式2).

$$V_{\text{int}} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]} \quad (2)$$

早期对Cas12a的酶切动力学研究报道的动力学参数有误^[15,70], Ramachandran和Santiago^[71]指出了这一问题, 同时原作者也重新计算并更正了这个参数^[72,73]. 表

1整合了更正前后的酶切动力学参数, 其中酶催化常数(k_{cat})是较为常用的代表酶切速率的参数, 而酶切效率(k_{cat}/K_M)则同时考虑了酶与底物结合过程和酶对底物切割过程的速率. 早期报道的LbCas12a被双链DNA激活时的 k_{cat} 高达 1250 s^{-1} ^[15], 而更正后的结果为 17 s^{-1} ^[72]. PbuCas13b的 k_{cat} 原来报道为 987 s^{-1} ^[70], 但更正后为 0.95 s^{-1} ^[73]. Ramachandran和Santiago^[71]测定LbCas12a的 k_{cat} 在 $0.07 \sim 0.09 \text{ s}^{-1}$ 之间, 造成测定结果差异的可能原因与crRNA序列相关, 且受底物链序列、缓冲液组成等影响, 对crRNA序列进行设计与优化有助于实现高酶切和信号放大效率. 此外, 尽管在早期报道中LbCas12a与双链DNA结合后的反式切割活性更高, Ramachandran和Santiago^[71]的结果显示由单链DNA和双链DNA激活Cas12的反式切割活性差异并不大.

酶切动力学参数决定了基于CRISPR技术反式切割活性的信号放大能力, 对于评估不同Cas酶对目标链的检测极限非常重要. 在检测仪器灵敏度相当的条件, 不同Cas酶的检出限与单位时间内的酶催化常数直接相关. 如果Cas13b的酶催化常数为 0.95 s^{-1} , 表示一个目标分子激活Cas酶后, 信号能以每秒增长约1倍的速率被放大, 30 min内放大约1800倍, 结合仪器检出限数据, 可以估算出方法检出限. 假设仪器检出限为1 pM荧光分子, 经过1800倍放大后该方法对目标分析物的检出限则降为0.06 pM. 然而实际信号放大倍数会受到底物消耗和酶活性降低等因素限制, 因此检出限要高于理论估算值. 与指数放大的核酸扩增方法相比, Cas酶扩增方法获得的放大倍数要低几个数量级. 从实验测定的数据来看, CRISPR直接检测核酸的检出限通常在fM (10^{-15} mol/L)到pM (10^{-12} mol/L)之间^[14], 而指数放大的核酸扩增技术可以检测aM (10^{-18} mol/L)水平的核酸(低至几个分子)^[12]. 仅采用CRISPR-Cas体系难以直接对低拷贝数的SARS-CoV-2进行检测, 往往需要与其他扩增方法联用.

表 1 几种Cas蛋白的反式切割动力学参数

Table 1 Trans-cleavage rates of Cas12a and Cas13b

Cas核酸酶类型 (目标链)	更正前			更正后			文献
	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$K_M (\text{M})$	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$K_M (\text{M})$	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	
LbCas12a (ssDNA)	250	4.9×10^{-7}	5.1×10^8	3	6.2×10^{-7}	5×10^6	[15,72]
LbCas12a (dsDNA)	1250	7.25×10^{-7}	1.7×10^9	17	1.01×10^{-6}	1.7×10^7	[15,72]
PbuCas13b (ssRNA)	987	—	—	0.95	10.8×10^{-6}	9.2×10^4	[70,73]

3.2 仅依赖反式切割活性的超灵敏单管SARS-CoV-2检测

CRISPR-Cas13a可直接识别ssRNA, 最适反应温度为37℃, 但在室温下仍能切割探针生成信号, 是检测SARS-CoV-2 RNA的理想工具, 然而受限于Cas13a的酶切动力学参数, 难以实现对低拷贝数RNA的检测. 为了提高CRISPR-Cas13a的检测灵敏度, Fozouni等^[74]设计了多个CRISPR-Cas13a同时识别SARS-CoV-2 RNA的不同位点, 激活多组CRISPR-Cas13a的切割活性, 显著地提高了信号放大效率, 同时采用了高灵敏荧光检测装置, 对较低的荧光信号也能检出. Shinoda等^[75]提出了另一个基于CRISPR-Cas13a的RNA检测策略——一种基于CRISPR的无扩增微液滴数字化RNA检测方法(SATORI). CRISPR-Cas13a、目标RNA与荧光标记底物链的混合液被分散到12万个体积为3 fL的腔室中, 均匀分散的液滴中RNA的局部浓度提高, 有利于激活CRISPR-Cas13a, 而酶切产生的荧光基团也聚集在微液滴中, 荧光信号得到聚焦. 通过对信号产生过程和检测设备的改进, 最终提高了CRISPR-Cas13a对SARS-CoV-2 RNA的检测能力.

4 CRISPR与核酸扩增联用的分步反应

将CRISPR技术与核酸扩增反应联用, 以克服单纯依赖CRISPR信号放大所导致的灵敏度不足问题, 是早期基于CRISPR技术核酸检测方法发展的主要方向^[76,77]. 目标核酸链通过指数级核酸扩增后, 产生足够的扩增产物, 激活CRISPR-Cas体系, 剪切信号探针^[78]. 在与核酸扩增的联用体系中, CRISPR-Cas的主要作用是特异性识别目标核酸链, 所开发的方法具有操作简便、设备要求低和特异性高等优势.

SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking)是一种将RT-RPA(reverse transcription-recombinase polymerase amplification)和CRISPR-Cas13a结合的检测方法(图2a)^[14]. 样品中RNA被逆转录成DNA模板链后, 在RPA体系中进行快速扩增, 再经过T7酶转录成RNA链. CRISPR-Cas13a特异性识别产物RNA, 激活其反式切割活性, 非特异性切割ssRNA报告探针, 产生荧光信号. SHERLOCK检测平台后经不断拓展, 也出现了单管DNA检测^[79]、多目标

检测等检测方法^[16], 并被应用于SARS-CoV-2检测.

DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)是一种将RPA与CRISPR-Cas12a结合的检测平台(图2b). 与SHERLOCK中Cas13a识别ssRNA不同, Cas12a可以直接识别RPA扩增的DNA产物. Chen等^[15]利用DETECTR检测人类肛门拭子样本中的人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV), 能够准确地识别出HPV16和HPV18. Teng等^[80]开发了基于Cas12b的CDetection(Cas12b-based DNA detection), Cas12b对核酸序列的靶向特异性更强, 降低了背景信号, 从而降低了检出限. Harrington等^[19]基于Cas14-DETECTR策略来检测HERC2眼睛颜色的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP). 基于DETECTR的方法也被开发用于检测SARS-CoV-2^[22].

HOLMES (one-hour low-cost multipurpose highly efficient system)平台依赖于RT-PCR与CRISPR-Cas12联用^[81]. HOLMES通过PCR对靶标核酸进行扩增, 再结合CRISPR-Cas12a实现特异性识别和信号放大. HOLMESv2将RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification)和CRISPR-Cas12b联用(图2c)^[82], 在55℃恒温下实现了单管内扩增和检测日本流行脑炎病毒RNA, 避免了PCR所需的温度循环过程.

5 CRISPR与等温扩增联用的单管非均相反应

在HOLMES、SHERLOCK和DETECTR方法中, 等温扩增与CRISPR-Cas检测往往是分开进行, 经常会面临开盖交叉感染风险. 为了解决上述问题, 最直接的做法是通过物理分隔的方式, 将等温扩增体系与CRISPR-Cas体系集成于单管中. 将两种体系的试剂分别放置于单管的不同位置, 如管盖、管底等, 或对管盖进行改造, 划分出多个隔离区^[59,60,83,84]. Pang等^[25]将RT-LAMP反应溶液置于管底, 而CRISPR-Cas12a试剂以液滴或者冻干粉形式置于管盖, 在62℃热浴下启动扩增反应(图3). 管盖与管底之间的空气起到了隔热功能, 管盖温度约为31℃, 避免了高温对Cas12a的活性影响. 待RT-LAMP扩增完成后, 通过手摇将其与管盖上的CRISPR-Cas12a体系混匀, 在室温下便可产生可视化的荧光信号. 在底部加热方式下, 溶剂会在反应过程中不断挥发, 从而造成溶液中各组分浓度的变化, 影响扩增反应性能. Wang等^[85]在管底反应液上加上一

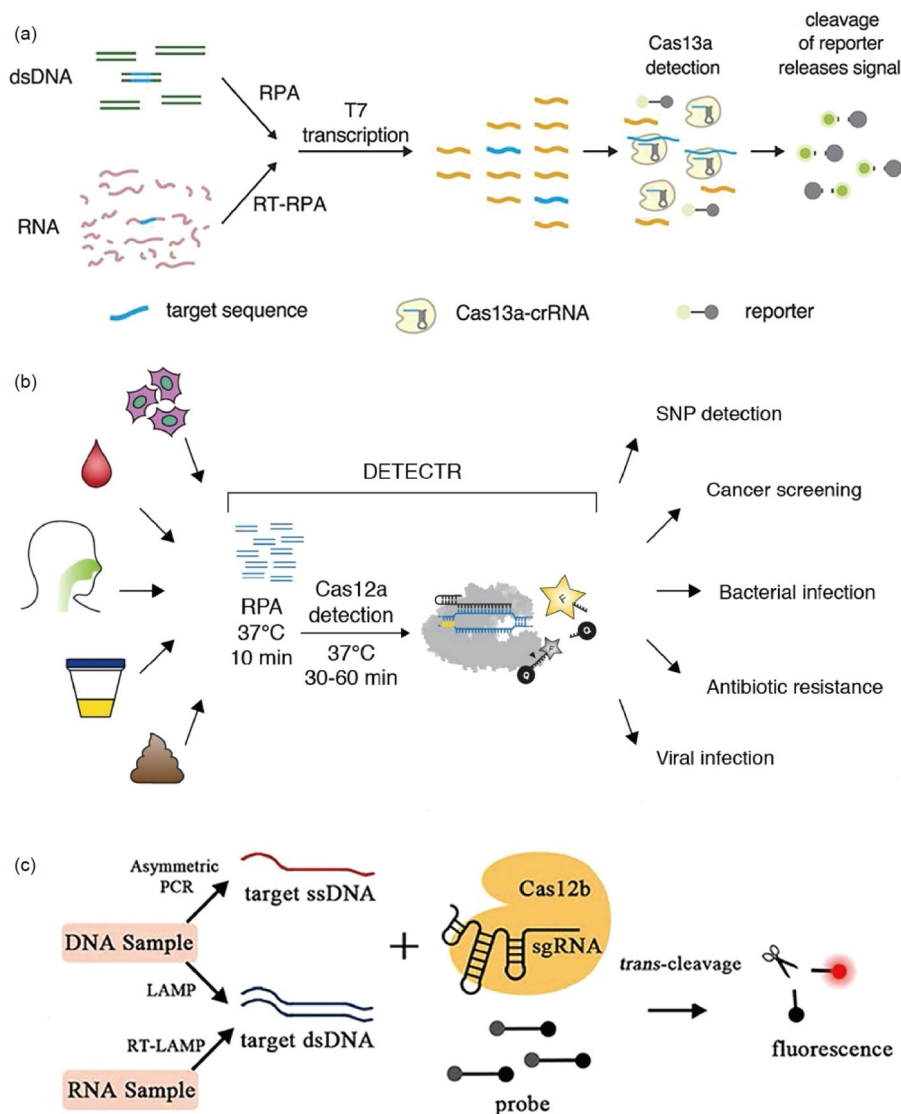


图 2 基于CRISPR-Cas的检测分析系统示意图. (a) SHERLOCK检测平台^[14]; (b) DETECTR检测平台^[15]; (c) HOLMESv2检测平台^[82] (网络版彩图)

Figure 2 Schematics showing classic CRISPR-Cas systems designed to detect specific nucleic acid sequences. (a) SHERLOCK [14]; (b) DETECTR [15]; (c) HOLMESv2 [82] (color online).

层矿物油层,既能阻止反应溶剂挥发,又能更好地对两个体系进行隔热.

6 CRISPR与等温扩增联用的单管且均相反应

尽管通过物理隔离的方式能够实现单管反应,但多步操作难以进行实时检测、耗时较长.将等温扩增反应与CRISPR-Cas体系整合到单管中进行均相反应

则要解决两种体系的兼容性问题^[83,86],包括反应温度、缓冲液组成、pH、金属辅因子等(表2).

6.1 RT-LAMP与CRISPR的整合

RT-LAMP (~62°C)和CRISPR-Cas12a (~37°C)都能在恒温下反应,但二者的最佳反应温度相差较大. Pang等^[25]在对缓冲液组成和引物链优化后,发现CRISPR-Cas12a酶切反应的最高温度可达47°C,更高温度则完全失去活性,而RT-LAMP的最低扩增温度为52°C,依

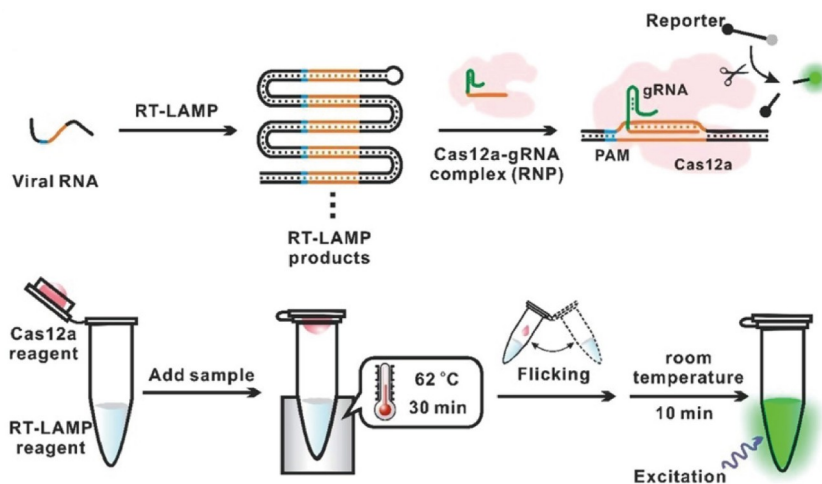


图3 将RT-LAMP和CRISPR检测试剂分别置于管盖和管底, 实现SARS-CoV-2 RNA检测的示意图^[25] (网络版彩图)

Figure 3 Schematic of a SARS-CoV-2 detection technique placing RT-LAMP and CRISPR-based detection reagents separately in a single tube ^[25] (color online).

然无法同时满足两个反应体系。

为了克服RT-LAMP和CRISPR-Cas12a的温度兼容问题, Cas12b被用于取代CRISPR体系中的Cas12a。来自不同类型嗜热细菌的Cas12b能够耐受高温, 最高可达65℃, 与RT-LAMP所需温度兼容。Li等^[82]采用一种AacCas12b开发了HOLMESv2, 将RT-LAMP和CRISPR-Cas12b整合在同一管中, 实现了55℃等温均相反应对RNA进行扩增和实时检测。Joung等^[92]采用另一种AapCas12b开发了STOPCovid (SHERLOCK testing in one pot), 将最佳反应温度提升至60℃, 更有利于LAMP扩增反应, 提高了对SARS-CoV-2 RNA的检测灵敏度(图4a)。采用Cas12b来替代Cas12a, 解决了LAMP与CRISPR的温度兼容性问题, 但Cas12b需要结构更复杂的crRNA和tracrRNA, 较长的序列增加了后续等温扩增反应的引物设计难度。对更简单的sgRNA或耐高温Cas的持续开发和优化将进一步提高基于LAMP与CRISPR的单管检测体系性能。与RPA-CRISPR单管检测体系相比, LAMP所需的成分清晰、蛋白酶种类少、成本更低, 但由于引物数量较多, 容易产生非特异性扩增, 设计要求高。

6.2 RT-RPA与CRISPR的整合

RT-RPA的最佳反应温度(~40℃)与CRISPR-Cas体系(~37℃)相差较小, 但将两个体系集成在同一管中进行等温均相反应仍面临着较大的挑战。与LAMP相比,

RPA中蛋白酶和溶液组分更多, 且试剂盒中的各试剂浓度通常未知。因此RPA与RT、CRISPR-Cas体系的兼容性更加复杂(图4b)。

在单管均相反应中只能选取一种溶液组成, 无法同时满足不同反应体系所需的最佳反应条件, 对溶液中各成分的优化是最大程度地发挥各体系性能的基础。Arizti-Sanz等^[61]在SHERLOCK的基础上, 将RT-RPA与CRISPR-Cas13a整合, 开发了SHINE (streamlined highlighting of infections to navigate epidemics) (图4b, 策略1、3), 然而最初的结果却发现均相反应对RNA的检出限比分步反应高出近5个数量级。造成这一现象的主要原因是两种体系中酶的最佳反应条件不同, 而在单管均相条件下两种体系的性能都受到限制。通过逐步筛查关键影响因子, 如pH、钠/钾离子、镁离子、引物浓度、逆转录酶、核糖核酸酶H (RNase H)、底物链序列等, 每个关键因子的优化都能降低数倍检出限, 最终将两个体系均相反应对RNA的检测性能提升至与分步反应相同水平, 检测时间也缩短至50 min。

将CRISPR-Cas12a与RT-RPA联用开发单管均相恒温反应时, 对低拷贝数(<1000)目标RNA的检测灵敏度较差。可能的原因是CRISPR-Cas12a不仅识别RT-RPA的扩增产物, 还能与目标模板链结合, 与目标链的靶向结合和顺式切割抑制了RPA扩增反应, 在两个体系间产生干扰。Ding等^[87]在开发AIOD-CRISPR (all-

表 2 CRISPR单管均相等温扩增检测SARS-CoV-2 RNA^{a)}

Table 2 CRISPR-based homogeneous and isothermal amplification for the detection of SARS-CoV-2 RNA^{a)}

技术	扩增	Cas酶	关键整合策略	分析时间 (min)	温度 (°C)	样品前处理	检出限*	参考文献
STOPCovid	RT-LAMP	Cas12b	耐高温的Cas12b	60 (含前处理)	60	在同一管内裂解和磁珠纯化(拭子)	100拷贝/提取前的样品	[92]
SHINE	RT-RPA	Cas13a	关键溶液组分优化	50 (含前处理)	37	改进HUDSON(无分离过程) (拭子、唾液)	10拷贝/μL样品	[61]
AIOD-CRISPR	RT-RPA	Cas12a	两组Cas12a靶向无PAM的ssDNA	20~40	37	纯化柱式RNA提取试剂盒(拭子)	~5拷贝/检测反应	[87]
RT-RPA-Cas12a	RT-RPA	Cas12a	RNase H加快启动RPA	5~60	40	自动化磁珠提取试剂盒(拭子)	50拷贝/μL样品	[29]
miSHERLOCK	RT-RPA	Cas12a	—	60 (含前处理)	37	高温、化学处理和RNA吸附膜(唾液)	唾液中灭活病毒1200拷贝/mL	[93]
CRISPR-FDS	RT-RPA	Cas12a	—	15 (含前处理)	37	无需分离的快速裂解试剂盒(唾液)	唾液中灭活病毒“计算得0.38拷贝/μL”	[94]
CODA	RT-RPA	Cas12a	—	20	42	自动化核酸提取系统及相应试剂盒(拭子、痰液)	“计算得3拷贝/μL”	[95]
sPAMC	RT-RPA	Cas12a	次优PAM降低Cas12a对目标dsDNA的靶向	≤20 (含前处理)	37	无需分离的加热和裂解试剂处理(拭子)	1拷贝/μL样品	[88]
deCOViD	RT-RPA	Cas12a	微液滴中提高局部浓度, 聚焦荧光信号	<30	42	磁珠提取试剂盒 (拭子)	15拷贝/样品	[89]
Cas13a (an ultralocalized Cas13a assay)	无扩增	Cas13a	微液滴体积越小局部浓度越大	60	37	磁珠提取试剂盒 (拭子)	~6拷贝/μL	[91]
dWS-CRISPR	RT-DAMP	Cas12a	优化引物链设计, 降低反应温度	90	52	简单加热, 无需RNA提取和纯化	50拷贝/μL样品	[90]
RADICA	RT-RPA	Cas12a	—	40~60	42	—	“计算得0.879拷贝/μL反应”	[96]

a) *: 不同方法之间的检出限测定方法上存在差异. RNA靶标的选取及制备、稳定检出浓度的判定和检出限的计算、RNA靶标加入的样品基质、RNA提取效率均有所不同

in-one dual CRISPR-Cas12a)的过程中(图4b, 策略2), 为了避免CRISPR-Cas12a对RPA体系的影响, 设计了由不带PAM识别位点的crRNA构成的CRISPR-Cas12a, 仅识别RPA扩增过程中解开dsDNA时产生的ssDNA, 从而降低对RPA的影响. 在此基础上, 将两组CRISPR-Cas12a分别与目标链两端结合来进行信号放大, 能够进一步提高检测灵敏度.

另一种提高CRISPR-Cas12a与RT-RPA联用对低拷贝数检测能力的方法是更快地启动RPA对目标链的扩增反应. Feng等^[29]发展该方法检测DNA和RNA时, 发现其对DNA的检出限低于RNA约2个数量级, 且检测耗时更短, 尤其在低拷贝数时差异更为明显. 可能的原因有两点: (1) 非特异性扩增消耗了RPA反应试剂; (2) 在均相体系中CRISPR-Cas12a反式切割活性随

着时间逐渐降低. RNA被逆转录成RNA-cDNA杂交链, RNA的结合对后续扩增反应产生抑制, 使cDNA无法作为启动RPA的模板链. 在低拷贝数情况下, 能够产生的自由cDNA更少. 为了解决这一问题, Feng等通过使用带RNase H功能的逆转录酶或直接添加RNase H, 加快反应体系中RNA与cDNA的解离, 从而释放自由的cDNA, 实现对低拷贝数SARS-CoV-2 RNA的检测(图4b, 策略3).

减少CRISPR-Cas12a与目标链结合, 同时改进RT更快启动RPA, 将能进一步提高CRISPR-Cas12a与RT-RPA的单管均相检测性能. Lu等^[88]通过设计新的crRNA和RT引物链来实现两个体系的兼容sPAMC (suboptimal PAM). 该方法采用次优PAM位点识别的crRNA, 降低CRISPR-Cas12a对目标dsDNA的结合能

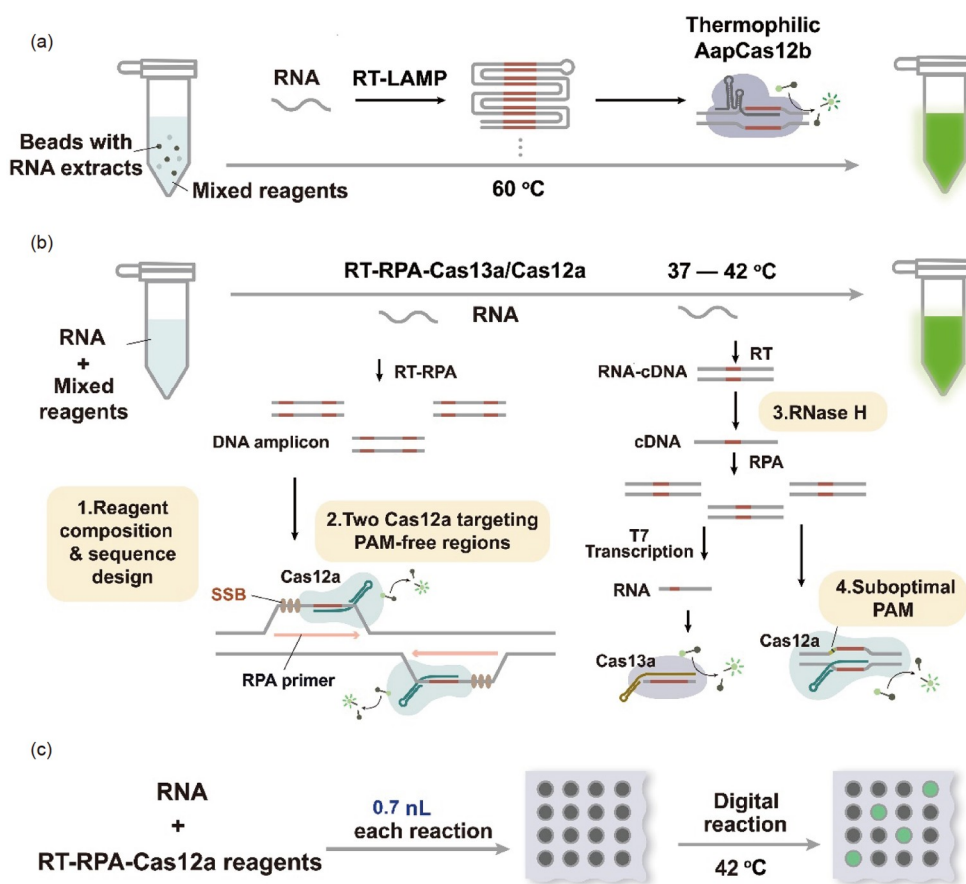


图 4 在单管均相反应中实现等温扩增与CRISPR检测联用的技术示意图. (a) 单管SHERLOCK (STOPCovid); (b) 在单管均相反应中实现RT-RPA与CRISPR检测联用的技术示意图及不同提高反应灵敏度的策略; (c) 微滴式数字CRISPR检测病毒RNA (deCOViD) (网络版彩图)

Figure 4 Schematics of detection techniques integrating isothermal amplification and CRISPR-based detection into the same reaction solution. (a) SHERLOCK testing in one pot (STOPCovid); (b) schematics of RNA detection techniques integrating RT-RPA-Cas12a into the same reaction solution and strategies to improve the sensitivity; (c) digitization-enhanced CRISPR/Cas-assisted one pot virus detection (deCOViD) (color online).

力,从而维持RPA的扩增性能(图4b,策略4).通过对比两种不同PAM的均相反应体系发现,次优PAM体系中RPA扩增产物在2 min时能检出,而最优PAM体系中则需要8~10 min.此外,在RT-RPA体系中,往往使用同一对~30 nt引物链作为逆转录和扩增引物,但过长的引物链并不适合逆转录,因此采用另一对18 nt引物链能将逆转录效率提高6倍.sPAMC将SARS-CoV-2 RNA的检测时间缩至20 min内,检出限与RT-PCR相当.

6.3 微滴式数字CRISPR平台

在微滴式数字PCR平台上,将CRISPR-Cas与RT-RPA、RT-LAMP体系联用发展出了微滴式数字CRISPR技术.反应溶液被微滴化处理,分成上万个纳

升级的液滴,提高了目标链的局部浓度,更有利于RPA、LAMP的快速启动,同时也减少了非特异性扩增的试剂消耗对其他液滴的影响.Park等^[89]通过添加0.1% Tween-20解决了RT-RPA溶液黏度大、不易分散的问题,进而开发了RT-RPA与CRISPR-Cas12a联用的deCOViD (digitization-enhanced CRISPR/Cas-assisted one pot virus detection) (图4c).通过检测有荧光的阳性微滴个数与比例,对SARS-CoV-2 RNA进行绝对定量.Ding等^[90]通过对LAMP引物序列进行重新设计,在52 °C下实现了将CRISPR-Cas12a与等温扩增联用.在纳升级微滴中目标RNA的局部浓度升高,同时荧光信号也在液滴中聚焦,能够将直接使用CRISPR-Cas13a检测RNA的性能提升至与RT-PCR相同的水平^[91].

7 与单管反应兼容的样品前处理过程

从样本中高效提取SARS-CoV-2 RNA是高灵敏COVID-19检测的前提, 目前所报道的提取方法主要针对最常见的鼻咽拭子, 也有一些针对唾液样本^[97]. 复杂的样本基质, 可能会影响后续核酸扩增反应, 造成假阴性. 同时, SARS-CoV-2 RNA在病毒粒子的核衣壳内, 需对病毒蛋白进行变性, 从而释放出RNA. 此外, 在提取过程中RNA极易被RNases降解, 保持RNA的稳定性也十分关键^[98]. 因此, 开发高效的RNA提取方法, 减少样品基质对后续反应的干扰, 维持病毒RNA稳定性, 是SARS-CoV-2样本前处理技术发展的目标.

目前, 市场上有大量RNA提取/纯化试剂盒, 比如纯化柱式病毒RNA提取试剂盒、自动化磁珠提取试剂盒、快速裂解试剂盒、自动化核酸提取系统等. 一部分试剂盒已应用于SARS-CoV-2 RNA的提取和纯化, 并与CRISPR单管检测平台有很好的兼容性, 主要工作原理是采取磁珠^[88]、离心柱^[87]、RNA吸附膜^[93]和加热裂解^[88,94]等方式^[6,7]提取和纯化RNA. 相较于传统的硫氰酸胍-苯酚-氯仿和苯酚-胍-异硫氰酸酯等有机溶剂萃取方法, 使用磁性粒子和纯化柱提取和纯化RNA, 具有人工操作少、省时、无需苛刻的GITC试剂、样品基质无残留等优点, 且易于实现自动化^[99].

为了进一步缩短从样本输入到信号响应的周期, 一些研究工作尝试直接在单管检测方法中的反应管内进行快速提取和富集, 精简前处理步骤, 整合了磁珠提取、无分离的裂解处理、裂解与膜吸附等RNA提取纯化过程. 通过将裂解和磁珠纯化相结合, 免去了乙醇洗涤和洗脱步骤, 从而将RNA提取时间缩短至15 min^[92]. 考虑到HUDSON (加热未提取的样本以消除RNases)和SHERLOCK诊断技术的兼容性^[61], 通过添加 RNase抑制剂将鼻咽拭子和唾液样本的HUDSON孵育时间从30 min缩短至10 min. de Puig等^[93]开发了一种新方法, 能灭活唾液中的RNases, 裂解病毒颗粒释放RNA, 并在聚醚砜膜(PES)上富集. 将PES膜直接加入到SHERLOCK反应体系中便可实现对病毒RNA的检测. 考虑到LAMP、RPA和PCR体系对样品基质和前处理试剂的兼容性不同, 简化的样品前处理技术通常需要针对特定反应体系进行选择 and 调整.

8 总结与展望

CRISPR-Cas系统具有可编程性、高特异性的核酸识别能力和顺式切割、反式切割能力, 已发展成为一种兼具普适性和灵活性的分子检测工具, 在SARS-CoV-2 RNA诊断应用上得到快速发展. 尽管更多的Cas蛋白被不断发现, 但受限于其酶切动力学, CRISPR-Cas系统直接用于RNA检测的方法灵敏度尚不能满足低拷贝数的分子检测. 开发与核酸扩增方法联用的分子检测技术, 一方面通过指数扩增核酸提升了灵敏度, 另一方面通过CRISPR-Cas识别靶标核酸增加了特异性.

将多个反应体系集成到单管中能够避免污染问题、减少假阳性, 然而需克服多个体系兼容性难题, 包括反应温度、缓冲液组成、pH、金属辅因子、蛋白酶相互干扰等. 最直接的解决方案是将不同体系置于管内不同位置分开反应, 每个体系的最适溶液组成保持不变, 还能对不同部位进行加热, 满足不同酶对温度的需求. 而最理想的方案是通过均相反应在单管中同时进行扩增和检测, 但在同一个溶液组成条件下, 各体系的性能都受到一定程度限制. 通过对溶液成分的逐个优化以及一些新Cas酶的不断发现, 基于CRISPR-Cas的单管均相等温扩增技术已取得快速发展, 检测性能也得到不断提升.

基于CRISPR系统开发的分子检测技术仍面临着诸多挑战和机遇: (1) 开发CRISPR-Cas系统与更多其他核酸扩增方法的联用, 提高对极低浓度的核酸检测能力; (2) 单管均相等温检测技术促进了快速便捷检测方式的发展, 使可视化检测病毒RNA成为可能, 包括试纸条、便携式紫外灯、颜色变化等; (3) 开发等温扩增和CRISPR联用的单管恒温非荧光检测方法, 如电化学^[100]或比色检测方法^[27], 提升非荧光检测体系的基质耐受能力; (4) 发展新的储存和使用方式, 如纸基冻干粉试剂^[43], 避免反应试剂在储存、运输和使用过程中降低活性; (5) 开发更便捷、高效的样品前处理方法, 减少操作流程和时间, 适用于不同类型的样本; (6) 发展高通量检测方法, 开发多荧光通路的检测探针或与高通量检测平台结合, 如微滴式数字CRISPR. 此外, 随着对Cas酶切割功能的深入研究, 更多基于同一种Cas酶的指数级核酸扩增体系也将会被应用于单管均相等温检测方法开发.

参考文献

- 1 Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Scott D, Shah SA, Siksnys V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, van der Oost J, Barrangou R, Koonin EV. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18: 67–83
- 2 Xiong Y, Zhang J, Yang Z, Mou Q, Ma Y, Xiong Y, Lu Y. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 207–213
- 3 Knott GJ, Doudna JA. *Science*, 2018, 361: 866–869
- 4 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 5 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. *Science*, 2013, 339: 823–826
- 6 Adli M. *Nat Commun*, 2018, 9: 1911
- 7 Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636–646
- 8 Joung JK, Sander JD. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 49–55
- 9 Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, Pâques F. *Curr Gene Ther*, 2011, 11: 11–27
- 10 Singh A, Chakraborty D, Maiti S. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 6666–6684
- 11 Gaj T, Gersbach CA, Barbas Iii CF. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 397–405
- 12 Feng W, Newbigging AM, Tao J, Cao Y, Peng H, Le C, Wu J, Pang B, Li J, Tyrrell DL, Zhang H, Le XC. *Chem Sci*, 2021, 12: 4683–4698
- 13 Li Y, Mansour H, Watson CJF, Tang Y, MacNeil AJ, Li F. *Chem Sci*, 2021, 12: 2133–2137
- 14 Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F. *Science*, 2017, 356: 438–442
- 15 Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. *Science*, 2018, 360: 436–439
- 16 Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, Kellner MJ, Tan AL, Paul LM, Parham LA, Garcia KF, Barnes KG, Chak B, Mondini A, Nogueira ML, Isern S, Michael SF, Lorenzana I, Yozwiak NL, MacInnis BL, Bosch I, Gehrke L, Zhang F, Sabeti PC. *Science*, 2018, 360: 444–448
- 17 Swarts DC, Jinek M. *Mol Cell*, 2019, 73: 589–600.e4
- 18 Li SY, Cheng QX, Liu JK, Nie XQ, Zhao GP, Wang J. *Cell Res*, 2018, 28: 491–493
- 19 Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, Cofsky JC, Kyrpides NC, Banfield JF, Doudna JA. *Science*, 2018, 362: 839–842
- 20 Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, Shmakov S, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. *Mol Cell*, 2017, 65: 618–630.e7
- 21 Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DBT, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F. *Science*, 2016, 353: aaf5573
- 22 Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, Miao X, Streithorst JA, Granados A, Sotomayor-Gonzalez A, Zorn K, Gopez A, Hsu E, Gu W, Miller S, Pan CY, Guevara H, Wadford DA, Chen JS, Chiu CY. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 870–874
- 23 Feng W, Newbigging AM, Le C, Pang B, Peng H, Cao Y, Wu J, Abbas G, Song J, Wang DB, Cui M, Tao J, Tyrrell DL, Zhang XE, Zhang H, Le XC. *Anal Chem*, 2020, 92: 10196–10209
- 24 Kachwala MJ, Smith CW, Nandu N, Yigit MV. *Anal Chem*, 2021, 93: 1934–1938
- 25 Pang B, Xu J, Liu Y, Peng H, Feng W, Cao Y, Wu J, Xiao H, Pabbaraju K, Tipples G, Joyce MA, Saffran HA, Tyrrell DL, Zhang H, Le XC. *Anal Chem*, 2020, 92: 16204–16212
- 26 Ramachandran A, Huyke DA, Sharma E, Sahoo MK, Huang CH, Banaei N, Pinsky BA, Santiago JG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 29518–29525
- 27 Zhang WS, Pan J, Li F, Zhu M, Xu M, Zhu H, Yu Y, Su G. *Anal Chem*, 2021, 93: 4126–4133
- 28 Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, Aphicho K, Suraritdechachai S, Meesawat P, Sappakhaw K, Leelahakorn N, Ruenkam T, Wongsatit T, Athipanyasilp N, Eiamthong B, Lakkanasirorat B, Phoodokmai T, Niljianskul N, Pakotiprapha D, Chanarat S, Homchan A, Tinikul R, Kamutira P, Phiwaow K, Soithongcharoen S, Kantiwiriyanitch C, Pongsupasa V, Trisrivirat D, Jaroensuk J, Wongnate T, Maenpuen S, Chaiyen P, Kamnerdnakta S, Swangsri J, Chuthapisith S, Sirivatanauskorn Y, Chaimayo C, Sutthent R, Kantakamalakul W, Joung J, Ladha A, Jin X,

- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F, Horthongkham N, Uttamapinant C. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4: 1140–1149
- 29 Feng W, Peng H, Xu J, Liu Y, Pabbaraju K, Tipples G, Joyce MA, Saffran HA, Tyrrell DL, Babiuk S, Zhang H, Le XC. *Anal Chem*, 2021, 93: 12808–12816
- 30 Kaminski MM, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Zhang F, Collins JJ. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5: 643–656
- 31 Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 467–477
- 32 Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 722–736
- 33 Hsu PD, Lander ES, Zhang F. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278
- 34 Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, Xiong JW, Xi JJ. *Cell Res*, 2013, 23: 465–472
- 35 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 36 Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. *eLife*, 2013, 2: e00471
- 37 Zhang F. *Quart Rev Biophys*, 2019, 52: e6
- 38 Mekler V, Minakhin L, Severinov K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 5443–5448
- 39 Ahmed MZ, Badani P, Reddy R, Mishra G. *J Mol Diagnostics*, 2021, 23: 1433–1442
- 40 Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. *Cell*, 2014, 156: 935–949
- 41 Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. *Nature*, 2014, 513: 569–573
- 42 Swarts DC, Jinek M. *WIREs RNA*, 2018, 9: e1481
- 43 Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, Ferrante T, Ma D, Donghia N, Fan M, Daringer NM, Bosch I, Dudley DM, O'Connor DH, Gehrke L, Collins JJ. *Cell*, 2016, 165: 1255–1266
- 44 Hajian R, Balderston S, Tran T, DeBoer T, Etienne J, Sandhu M, Wauford NA, Chung JY, Nokes J, Athaiya M, Paredes J, Peytavi R, Goldsmith B, Murthy N, Conboy IM, Aran K. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3: 427–437
- 45 Xiong E, Jiang L, Tian T, Hu M, Yue H, Huang M, Lin W, Jiang Y, Zhu D, Zhou X. *Angew Chem*, 2021, 133: 5367–5375
- 46 Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, Huang B. *Cell*, 2013, 155: 1479–1491
- 47 Tang Y, Gao L, Feng W, Guo C, Yang Q, Li F, Le XC. *Chem Soc Rev*, 2021, 50: 11844–11869
- 48 Wang T, Liu Y, Sun HH, Yin BC, Ye BC. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 5382–5386
- 49 Gu W, Crawford ED, O'Donovan BD, Wilson MR, Chow ED, Retallack H, DeRisi JL. *Genome Biol*, 2016, 17: 41
- 50 Quan J, Langelier C, Kuchta A, Batson J, Teyssier N, Lyden A, Caldera S, McGeever A, Dimitrov B, King R, Wilhelm J, Murphy M, Ares LP, Travisano KA, Sit R, Amato R, Mumbengegwi DR, Smith JL, Bennett A, Gosling R, Mourani PM, Calfee CS, Neff NF, Chow ED, Kim PS, Greenhouse B, DeRisi JL, Crawford ED. *Nucl Acids Res*, 2019, 47: e83
- 51 Strecker J, Jones S, Koopal B, Schmid-Burgk J, Zetsche B, Gao L, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. *Nat Commun*, 2019, 10: 212
- 52 Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, McCaw ZR, Aryee MJ, Joung JK. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 869–874
- 53 Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 863–868
- 54 Wei Y, Yang Z, Zong C, Wang B, Ge X, Tan X, Liu X, Tao Z, Wang P, Ma C, Wan Y, Li J. *Angew Chem*, 2021, 133: 24443–24449
- 55 Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. *Cell*, 2015, 163: 759–771
- 56 Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. *Mol Cell*, 2015, 60: 385–397
- 57 Strohkendl I, Saifuddin FA, Rybarski JR, Finkelstein IJ, Russell R. *Mol Cell*, 2018, 71: 816–824.e3
- 58 Samacoits A, Nimsamer P, Mayuramart O, Chantaravisoot N, Sitthi-Amorn P, Nakhakes C, Luangkamchorn L, Tongcham P, Zahm U, Supphanpayak S, Padungwattanachoke N, Leelarthaphin N, Huayhongthong H, Pisitkun T, Payungporn S, Hannanta-Anan P. *ACS Omega*, 2021, 6: 2727–2733
- 59 Guo L, Sun X, Wang X, Liang C, Jiang H, Gao Q, Dai M, Qu B, Fang S, Mao Y, Chen Y, Feng G, Gu Q, Wang RR, Zhou Q, Li W. *Cell Discov*, 2020, 6: 34

- 60 Sun Y, Yu L, Liu C, Ye S, Chen W, Li D, Huang W. *J Transl Med*, 2021, 19: 74
- 61 Arizti-Sanz J, Freije CA, Stanton AC, Petros BA, Boehm CK, Siddiqui S, Shaw BM, Adams G, Kosoko-Thoroddsen TSF, Kemball ME, Uwanibe JN, Ajogbasile FV, Eromon PE, Gross R, Wronka L, Caviness K, Hensley LE, Bergman NH, MacInnis BL, Happi CT, Lemieux JE, Sabeti PC, Myhrvold C. *Nat Commun*, 2020, 11: 5921
- 62 Shen J, Zhou X, Shan Y, Yue H, Huang R, Hu J, Xing D. *Nat Commun*, 2020, 11: 267
- 63 East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JHD, Tjian R, Doudna JA. *Nature*, 2016, 538: 270–273
- 64 Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15: 169–182
- 65 Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, Oki J, Shokhirev MN, Hsu PD. *Cell*, 2018, 173: 665–676.e14
- 66 Yan WX, Chong S, Zhang H, Makarova KS, Koonin EV, Cheng DR, Scott DA. *Mol Cell*, 2018, 70: 327–339.e5
- 67 Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y. *Cell*, 2017, 170: 714–726.e10
- 68 Zhang B, Ye W, Ye Y, Zhou H, Saeed AFUH, Chen J, Lin J, Perčulija V, Chen Q, Chen CJ, Chang MX, Choudhary MI, Ouyang S. *Cell Res*, 2018, 28: 1198–1201
- 69 Zhang C, Konermann S, Brideau NJ, Lotfy P, Wu X, Novick SJ, Strutzenberg T, Griffin PR, Hsu PD, Lyumkis D. *Cell*, 2018, 175: 212–223
- 70 Slaymaker IM, Mesa P, Kellner MJ, Kannan S, Brignole E, Koob J, Feliciano PR, Stella S, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Strecker J, Montoya G, Zhang F. *Cell Rep*, 2019, 26: 3741–3751.e5
- 71 Ramachandran A, Santiago JG. *Anal Chem*, 2021, 93: 7456–7464
- 72 Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. *Science*, 2021, 371: eabh0317
- 73 Slaymaker IM, Mesa P, Kellner MJ, Kannan S, Brignole E, Koob J, Feliciano PR, Stella S, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Strecker J, Montoya G, Zhang F. *Cell Rep*, 2021, 34: 108865
- 74 Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio MV, Zhao C, Switz NA, Kumar GR, Stephens SI, Boehm D, Tsou CL, Shu J, Bhuiya A, Armstrong M, Harris AR, Chen PY, Osterloh JM, Meyer-Franke A, Joehnk B, Walcott K, Sil A, Langelier C, Pollard KS, Crawford ED, Puschnik AS, Phelps M, Kistler A, DeRisi JL, Doudna JA, Fletcher DA, Ott M. *Cell*, 2021, 184: 323–333.e9
- 75 Shinoda H, Taguchi Y, Nakagawa R, Makino A, Okazaki S, Nakano M, Muramoto Y, Takahashi C, Takahashi I, Ando J, Noda T, Nureki O, Nishimasu H, Watanabe R. *Commun Biol*, 2021, 4: 476
- 76 Wang Y, Zhang Y, Chen J, Wang M, Zhang T, Luo W, Li Y, Wu Y, Zeng B, Zhang K, Deng R, Li W. *Anal Chem*, 2021, 93: 3393–3402
- 77 Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. *Science*, 2018, 360: 439–444
- 78 Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, Freije CA, Metsky HC, Yang DK, Ye SH, Boehm CK, Kosoko-Thoroddsen TSF, Kehe J, Nguyen TG, Carter A, Kulesa A, Barnes JR, Dugan VG, Hung DT, Blainey PC, Sabeti PC. *Nature*, 2020, 582: 277–282
- 79 Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. *Nat Protoc*, 2019, 14: 2986–3012
- 80 Teng F, Guo L, Cui T, Wang XG, Xu K, Gao Q, Zhou Q, Li W. *Genome Biol*, 2019, 20: 132
- 81 Li SY, Cheng QX, Wang JM, Li XY, Zhang ZL, Gao S, Cao RB, Zhao GP, Wang J. *Cell Discov*, 2018, 4: 20
- 82 Li L, Li S, Wu N, Wu J, Wang G, Zhao G, Wang J. *ACS Synth Biol*, 2019, 8: 2228–2237
- 83 Ali Z, Aman R, Mahas A, Rao GS, Tehseen M, Marsic T, Salunke R, Subudhi AK, Hala SM, Hamdan SM, Pain A, Alofi FS, Alsomali A, Hashem AM, Khogeer A, Almontashiri NAM, Abedalthagafi M, Hassan N, Mahfouz MM. *Virus Res*, 2020, 288: 198129
- 84 Chen Y, Shi Y, Chen Y, Yang Z, Wu H, Zhou Z, Li J, Ping J, He L, Shen H, Chen Z, Wu J, Yu Y, Zhang Y, Chen H. *Biosens Bioelectron*, 2020, 169: 112642
- 85 Wang R, Qian C, Pang Y, Li M, Yang Y, Ma H, Zhao M, Qian F, Yu H, Liu Z, Ni T, Zheng Y, Wang Y. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112766
- 86 Ooi KH, Liu MM, Tay JWD, Teo SY, Kaewsapsak P, Jin S, Lee CK, Hou J, Maurer-Stroh S, Lin W, Yan B, Yan G, Gao YG, Tan MH. *Nat Commun*, 2021, 12: 1739
- 87 Ding X, Yin K, Li Z, Lalla RV, Ballesteros E, Sfeir MM, Liu C. *Nat Commun*, 2020, 11: 4711
- 88 Lu S, Tong X, Han Y, Zhang K, Zhang Y, Chen Q, Duan J, Lei X, Huang M, Qiu Y, Zhang DY, Zhou X, Zhang Y, Yin H. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 286–297
- 89 Park JS, Hsieh K, Chen L, Kaushik A, Trick AY, Wang TH. *Adv Sci*, 2021, 8: 2003564
- 90 Ding X, Yin K, Li Z, Sfeir MM, Liu C. *Biosens Bioelectron*, 2021, 184: 113218
- 91 Tian T, Shu B, Jiang Y, Ye M, Liu L, Guo Z, Han Z, Wang Z, Zhou X. *ACS Nano*, 2021, 15: 1167–1178

- 92 Joung J, Ladha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, Barretto RPJ, Ranu A, Macrae RK, Faure G, Ioannidi EI, Krajeski RN, Bruneau R, Huang MLW, Yu XG, Li JZ, Walker BD, Hung DT, Greninger AL, Jerome KR, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1492–1494
- 93 de Puig H, Lee RA, Najjar D, Tan X, Soekensen LR, Angenent-Mari NM, Donghia NM, Weckman NE, Ory A, Ng CF, Nguyen PQ, Mao AS, Ferrante TC, Lansberry G, Sallum H, Niemi J, Collins JJ. *Sci Adv*, 2021, 7: eabh2944
- 94 Ning B, Yu T, Zhang S, Huang Z, Tian D, Lin Z, Niu A, Golden N, Hensley K, Threeton B, Lyon CJ, Yin XM, Roy CJ, Saba NS, Rappaport J, Wei Q, Hu TY. *Sci Adv*, 2021, 7: eabe3703
- 95 Lee CY, Degani I, Cheong J, Lee JH, Choi HJ, Cheon J, Lee H. *Biosens Bioelectron*, 2021, 178: 113049
- 96 Wu X, Tay JK, Goh CK, Chan C, Lee YH, Springs SL, Wang DY, Loh KS, Lu TK, Yu H. *Biomaterials*, 2021, 274: 120876
- 97 Liu Y, Kumbalathan T, Feng W, Pang B, Tao J, Xu J, Xiao H, Joyce MA, Tyrrell DL, Zhang H, Li XF, Le XC. *ACS Meas Au*, 2022, 2: 224–232
- 98 Fang Y, Zhang H, Xie J, Lin M, Ying L, Pang P, Ji W. *Radiology*, 2020, 296: E115–E117
- 99 Chomczynski P, Sacchi N. *Nat Protoc*, 2006, 1: 581–585
- 100 Heo W, Lee K, Park S, Hyun KA, Jung HI. *Biosens Bioelectron*, 2022, 201: 113960

Integrating CRISPR and isothermal amplification reactions in single-tubes for ultrasensitive detection of nucleic acids: the SARS-CoV-2 RNA example

Wei Feng^{2†}, Hang Xiao^{1†}, Aijiao Yuan¹, Zhaojia Deng¹, Xiaoyan Wang¹, Hanyong Peng^{1*}, X. Chris Le²

¹ State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

² Division of Analytical and Environmental Toxicology, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Alberta T6G 2G3, Canada

†These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author (email: hypeng@rcees.ac.cn)

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (CRISPR-Cas) systems have advanced rapidly for the detection of nucleic acids and molecular diagnoses. The sensitivity of techniques directly using CRISPR-Cas systems for target recognition and signal generation is limited by the kinetics of *trans*-cleavage. Thus, CRISPR-Cas systems have been coupled with isothermal amplification techniques. One strategy for integrating CRISPR-Cas and amplification reactions into a single-tube is to place reagents in separate locations within the tube, maintaining optimum conditions for each reaction. A more challenging strategy is to mix all reagents and allow nucleic acid amplification and CRISPR-based detection to proceed in a homogeneous solution. This desirable approach requires substantial understanding of the compatibility of enzymatic reactions, systematic optimization, and appropriate adjustments of the integrated reactions to ensure high sensitivity. Ultrasensitive techniques have been developed for the detection of SARS-CoV-2 in single-tubes. In this review, we highlight the principle, research needs, and challenges of ultrasensitive single-tube RNA detection using CRISPR technology. We stress the importance of understanding the kinetics of *trans*-cleavage activity of CRISPR-Cas systems.

Keywords: CRISPR, molecular diagnostics, SARS-CoV-2, isothermal amplification, enzyme kinetics, point-of-care test, nucleic acids

doi: [10.1360/SSC-2022-0076](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0076)