

CRISPR-Cas 系统在核酸检测中的应用研究

胡秀文¹ 刘华^{2, 4} 王宇³ 唐雪明^{1, 5} 王金斌^{2, 4} 曾海娟^{2, 4} 蒋玮^{2, 4} 李红⁶

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 上海农业科学院生物技术研究, 上海 201106; 3. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050; 4. 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106; 5. 上海交通大学农业与生物学院, 200240; 6. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106)

摘要: CRISPR-Cas 系统是一种高效、实用的基因编辑工具, 被广泛应用于基因组编辑和调控机制研究。目前发现的 Cas 系列核酸酶工具为开发用于各种目的的不同类型核酸检测, 具有广阔的应用前景。CRISPR-Cas 系统的高灵敏度和高特异性, 使其在病原体检测、单核苷酸多态性 (SNP) 分析以及基因突变检测等发挥了极其重要的作用; 另外, CRISPR-Cas 系统在核酸检测领域的精确、高效性, 间接推动了基础生物学和应用生物学研究的进展。概述了不同类型的靶向特定核酸检测的 CRISPR-Cas 系统的最新进展和用途, 以及与之对应的新一代的体外检测平台, 旨在为核酸检测领域提供新的研究思路 and 理论依据。

关键词: 基因编辑; CRISPR-Cas 系统; Cas 蛋白核酸酶; 核酸检测

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0015

Application of CRISPR-Cas System in Nucleic Acid Detection

HU Xiu-wen¹ LIU Hua^{2, 4} WANG Yu³ TANG Xue-ming^{1, 5} WANG Jin-bin^{2, 4} ZENG Hai-juan^{2, 4}
JIANG Wei^{2, 4} LI Hong⁶

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106; 3. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050; 4. Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106; 5. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; 6. Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106)

Abstract: CRISPR-Cas is an efficient and practical gene editing tool, which is widely used in genome editing and regulation. Due to its high sensitivity and specificity, the CRISPR-Cas system also plays an important role in nucleic acid detection. It can detect pathogens, analyze single nucleotide polymorphisms (SNPs), and detect genetic mutations. The currently discovered Cas series nuclease tools open the door to the development of new strategies for different types of nucleic acid detection for various purposes. In addition, the CRISPR-Cas system is used in nucleic acid detection. The accuracy and efficiency of the field indirectly promote the progress of basic biology and applied biology research. The article outlines the latest developments and uses of different types of CRISPR-Cas systems that target specific nucleic acid detection, and the corresponding new generation of in vitro detection platforms, which provide new research ideas and theoretical basis for the field of nucleic acid detection.

Key words: gene editing; CRISPR-Cas system; Cas protein nuclease; nucleic acid detection

核酸检测技术在诊断感染、遗传疾病和癌症方面具有至关重要的作用, 因此核酸检测技术得到了快速发展^[1]。其中几种主要以 PCR 为基础的核酸检

测技术已被用于病原体检测^[2], 但需要昂贵的试剂和设备, 以及熟练的人员。恒温扩增方法也被应用到核酸检测方面^[3], 由于设备和应用技术的制约等

收稿日期: 2021-01-04

基金项目: 上海市科委自然科学基金项目 (19ZR1436800), 上海市农业科学院卓越团队计划 (农科创 2017 (B-07))

作者简介: 胡秀文, 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学; E-mail: 849727644@qq.com, 刘华同为本文第一作者

通讯作者: 唐雪明, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物技术; E-mail: xueming70@foxmail.com

因素, 阻碍了核酸检测的现场速测应用^[4]。因此开发灵敏、快速和特定的传感工具对于诊断检测至关重要。而目前发现的 CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 系统基于其准确识别和切割特定 DNA 和 RNA 序列的能力, 已被用于基因组编辑^[5-6], 展示了其强大的分子检测潜在能力, 成为了开发新的检测平台的热点。

CRISPR 系统是细菌及古细菌利用 Cas 效应蛋白在 crRNA 引导下抵御外源核酸入侵的一种获得性免疫防御系统。研究人员在大肠杆菌基因组中发现具有重复 DNA 序列的遗传结构, 该结构是由 CRISPR 基因座, DNA 靶向间隔序列以及编码 crRNA (crispr RNA) 组分和 Cas 蛋白操纵子的组分构成, 称之为 CRISPR-Cas 系统^[7]。它能将入侵的噬菌体、质粒和转座子的移动遗传元件 (MGES) 作为自己的间隔区序列, 构成了细菌和古细菌适应性和遗传免疫的基础^[8]。在自然条件下的 CRISPR-Cas 系统中, 包括 Cas12^[9]、Cas13^[10] 和 Cas14^[11] 及其同源物, 会表现出间接的非特异性催化活性, 可用于核酸检测, 例如通过降解标记的核酸产生荧光信号^[12]。检测灵敏度高, 达到 10^{-18} mol/L^[13] 的 aM 级别。这些系统借助体外扩增技术以及横向流动测试条系统, 实现低价、高灵敏度、现场可检测的诊断方法, 在人类健康到农业都有着广泛的应用, 为更加方便、快捷的检测各种疾病提供了技术支撑。本文主要介绍了 CRISPR-Cas 的相关机制, 以及在核酸检测的应用状况, 旨为开发新型检测平台提供理论依据。

1 CRISPR-Cas 系统的多样性与分类

CRISPR 系统是基因编辑技术中编辑核苷酸的有效工具, 与编码 Cas 蛋白的相关基因组合形成 CRISPR-Cas 系统。根据所结合的 Cas 蛋白不同, 其发挥的功能不同, 主要可以将 CRISPR-Cas 系统分为两类^[14], 其中第一类是多种 Cas 蛋白复合体, 主要分为 I 型、III 型和 IV 型。第二类为单一蛋白效应模块, 主要包括 II、V、VI。II 型^[15] 系统的主要特征蛋白 Cas9 作为核酸酶行使切割能力修饰靶序列, 现已广泛用于许多领域, 包括基础研究方向、食品作物开发、药物开发和人类基因组工程等。V 型^[16] CRISPR-Cas 系统的主要特征蛋白包括 Cas12

和 Cas14。Cas12 能够诱导双链 DNA (dsDNA) 切割位点的细胞发生遗传变化, 而且可以用于哺乳动物的基因编辑。Cas14 是从古细菌中发现的新的核酸酶, 它仅存在古细菌中, 与 Cas9、Cas12 具有相似的结构域, 但功能有所差异^[17]。VI 型 CRISPR-Cas 系统使用 Cas13 核酸酶, 该酶具有特征性的较高的真核和原核核苷酸 (HEPN) 结合结构域^[18], 特异性的作用于 RNA 靶序列, 发挥特异性识别和非特异切割的功能。除此之外, CRISPR 系统都可以利用靶向切割与体外扩增相结合, 从而用于快速检测 DNA 和 RNA, 达到快速检测的目的^[19], 具有良好的应用前景。

2 CRISPR-Cas 核酸检测工具

2.1 CRISPR-Cas9 技术概述

CRISPR-Cas9 属于 CRISPR II 型系统, 含有 HNH 和 RuvC 结构域, 是由 Cas9 蛋白、tracrRNA 与 crRNA 一起组合对目的基因进行编辑。Cas9 能够识别质粒和噬菌体的原型间隔序列毗邻基序 (PAM)^[20] NGG 序列, 然后 crRNA-tracrRNA 复合体与 cDNA 配对, 从而导致 Cas9 对目标 DNA 进行双链切割。其中 crRNA-tracrRNA 复合物可以合成向导 RNA (sgRNA) 来直接引导该系统识别目标序列。CRISPR-Cas9 可以与光学 DNA 定位结合起来以鉴定细菌抗生素抗性基因^[21]; 另外, 将 CRISPR-Cas9 与 DNA 荧光原位杂交 (FISH) 结合以检测耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 (MRSA)^[22]。

Cas9 核酸酶的两个结构域发生突变后会没有活性即为 dCas9 (dead Cas9), 可用于调节基因转录, 可以结合 DNA 而不将其裂解, 基于此特点开发了一种 dCas9 的体外 DNA 检测系统。该系统以高特异性和高灵敏度检测结核分枝杆菌 DNA^[23]。目前的研究显示, 使用 Cas9 来切割 DNA 也存在一些问题。如在切割过程中目标序列识别不准确容易导致突变, 而且双链断裂引起的大片段碱基缺失, 并因此导致临床应用的严重后果等。另外, 该系统需要 crRNA-tracrRNA 复合物来识别靶核酸, 比其他类别识别复杂一些。

2.2 CRISPR-Cas12 技术概述

CRISPR 相关蛋白 Cas12a, 是第二类 V 型

CRISPR 系统 RNA 引导的一种核酸内切酶、具有附带的裂解活性,也含有 RuvC 结构域,并在 crRNA 引导下切割 PAM (TTTN) 序列下游 18–25 nt 的靶 DNA。Cas12a 在 crRNA 的介导下靶向结合 dsDNA,形成了三元复合物,激活了非特异性 ssDNA 反式裂解活性^[24]。基于 Cas12a 这一特殊性质,将 Cas12a 反式切割活性与等温扩增相结合的方法,开发了一种新 DNA 检测方法—DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)^[25–26]。该系统结合重组聚合酶扩增 (RPA) 技术与荧光报告系统,对靶 DNA 进行恒温扩增,然后 Cas12a 在 crRNA 引导下作用于扩增的靶 DNA,裂解淬灭的 ssDNA 报告基因,产生荧光信号。现已将该系统应用到转基因检测中^[27],实现了对转基因产品及其制品快速灵敏的检测,其 DNA 检测的灵敏度能达到 aM 级;在医疗诊断检测上可以对人乳头瘤病毒 (HPV) 患者的样本检测分析^[28]。赵国屏团队利用 Cas12a 以及荧光报告系统,成功开发了高灵敏核酸检测方法 HOLMES^[25] (an one-hour low-cost multipurpose highly efficient system),用于目标 DNA 和 RNA 的快速检测,该方法实现检测 SNP 位点,以及对 DNA 病毒 (伪狂犬病病毒) 以及 RNA (乙型肝炎) 病毒检测,暗示着 Cas12a 在核酸检测领域的应用前景。但是,该方法也存在一些缺点,如反应温度高、SNP 检测序列受限、灵敏度可能降低等。为了检测更加方便,基于 Cas12a 切割机制,开发了一种新型的一体式工具箱,具有精确和超灵敏性 (OCTOPUS) 平台^[29],成功应用于食源性病原体检测,为食品安全提供了保障。通过研制的 CRISPR-Cas12a 生物传感器实现对乌拉西 -DNA 糖酶 (UDG) 和 T4 多核苷酸激酶 (T4 PNK) 的超敏感检测^[30],而且可作为确定包括单细胞解氧和人体血浆在内的真实样品的强大工具箱^[31],证明良好的实际应用能力。

随着对 Cas 不断深入的探究,Cas12 的另一个常用核酸蛋白 Cas12b 被发掘出来,它含有单个的 RuvC 结构域,脱靶效率低,能在哺乳动物和人类中进行有效的基因的编辑^[32]。同时也显示出相同的 DNA 反式切割活性,根据此特性,创建了 HOLMES 的改进版本 (称为 HOLMESv2)^[33]。在 HOLMESv2 系统中,Cas12b 可以和各种恒温扩增相结合,并将

扩增与 Cas12b 检测两个独立的步骤整合到一个系统中特异性区分单核苷酸多态性 (SNP),避免了交叉污染,用最少的设备提供超灵敏和特异的 DNA 检测的潜力。为了更加快速准确的检测,将 Cas12a 与 Cas12b 效应器与 LAMP 整合在一起,以开发一种超灵敏的特异性侧向流生物传感器 (LFB),用于检测铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)^[34]。但是目前该系统无法直接检测 RNA 分子,需要对 RNA 进行逆转录,增加了检测的复杂程度,会影响检测结果。

2.3 CRISPR-Cas13 技术概述

Cas13^[35] 是 VI 型 CRISPR 系统相关的蛋白,是 RNA 引导和 RNA 靶向的核糖核酸酶 (RNase) 蛋白家族^[36],Cas13 含有 2 个发散的 HEPN 结构域^[37],可以在具有 Protospacer 侧翼位点 (PFS) 的靶标 RNA 的单链区域中产生多个切割位点。且 Cas13^[38] 还表现出靶标依赖性的混合 RNase 活性,导致非靶标 RNA 分子的反式切割。Cas13 可以实现 RNA 编辑,如 RNA 碱基编辑技术 (REPAIR)^[39]。另外该系统在核酸检测和疾病诊断中也显示出独特而广泛的用途,是开发快速检测工具的研究热点之一。

目前研究人员对于 Cas13a 核酸蛋白研究较多,基于其附属切割的特点建立了 SHERLOCK^[40] (特定的高灵敏度酶报告解锁) 平台,并将恒温扩增与 Cas13a 相结合来检测 RNA 分子。SHERLOCK 程序在运行的过程中主要分为 4 个阶段,分别为试剂制备、样品提取、核酸恒温预扩增和 CRISPR-Cas13 核酸检测^[41]。该系统依赖于 RNA 荧光报告探针对信号的级别放大,再借助 T7 转录结合重组聚合酶扩增^[42] 实现了对信号的二次放大,提高了该方法的灵敏度,对病毒核酸实现了单分子灵敏度和单碱基特异性检测。为此通过结合 CRISPR-Cas13a 系统和催化组件 (CHA),建立了非编码小 RNA 分子 (miRNA) 的超敏电化学生物致敏平台^[43]。

通过 Cas13a 与荧光报告基团或横向流动试纸条结合,形成了 Cas13a 系统,并成功在现场检测到犬细小病毒 2 型 (CPV-2)^[44];能够检测血浆 EB 病毒 (epstein-barr virus) DNA,进而有助于筛查和监测鼻咽癌及其他 EBV 相关疾病^[45]。Gootenberg 等^[46] 将 SHERLOCK 方法修改,开发了 SHERLOCKv2 平台,

该平台结合 Cas13a 与辅助 CRISPR-III 型相关核酸酶 Csm6^[47]使信号灵敏度提高了 3.5 倍。在多功能、快速、便携和经济高效的核酸检测上，具有全分子敏感性和单碱基检测特异性，为基础设施欠发达地区的流行病监测和病原体检测提供了技术支持。为了避免污染，引入未提取的诊断样品加热以消除核酸酶（HUDSON）^[41]方案，可以直接从临床样品中检测病毒核酸，达到以极高的灵敏度检测全血、血清和唾液中的病毒。根据 CRISPR-Cas13 系统的反式切割活性而建立的检测平台成功应用多个领域，但在哺乳动物细胞中对宿主转录组的非靶点影响很小，这可能导致非预期突变。另外，分子量较小的分子也给 CRISPR-Cas13 多重检测带来了挑战。因为 Sherlock 的 RNA 报告程序容易被环境中存在的 RNA

酶降解，而 ssDNA 报告程序则不易激活，因此由于取消了体外转录过程，DETECTR 更便于 DNA 检测。

2.4 CRISPR-Cas14技术概述

Cas14 属于 V 型 CRISPR-Cas 系统由 RNA 引导的核酸酶家族，大小只有 400 到 700 个氨基酸，迄今为止被证明是最小的第二类 CRISPR 效应器。它是一种靶向 ssDNA 的 CRISPR 内切酶，与 CRISPR-Cas12a 不同，它不需要 PAM 就可以激活，识别之后进行靶向切割时表现出与 Cas12a 不同的保真度机制^[17]，即靶向识别后所释放的非特异性催化活性，这种机制类似于 ssRNA 靶向 Cas13a 酶的机制，例如通过降解标记的核酸以产生荧光信号，因此可以根据 Cas12 与 Cas13 的作用机制来理解 Cas14 的切割特性。各种 CRISPR 检测系统比较如表 1。

表 1 CRISPR 检测系统比较

Table 1 Comparison of CRISPR detection system

效应物	结构域	向导 RNA	PAM/PFS	检测平台	靶向目标	信号放大方法	灵敏性	多路复用	定量	便携性	时间
Effector	Domain	SgRNA		Detection platform	Target type	Signal amplification	Sensitivity	Multiplex	Quantitative	Portable	Time/h
Cas9	HNH RuvC	tracrRNA crRNA	5'NGG	无	DNA	CAS-EXPAR	aM	无	无	是	<1
Cas12a	RuvC	crRNA	5'TTN	HOLMES DETECTR	DNA	PCR ; RT-PCR ; RPA	aM aM	无 无	无 无	否 是	1 1
Cas12b				HOLMESv2	DNA	LAMP ; RT-LAMP	aM	无	有	是	1
Cas13a	HEPN	crRNA	3'A、U 或 C	SHERLOCK	RNA	RPA	aM	无	无	是	2
Cas14	RuvC	tracrRNA crRNA	无	DETECTR	ssDNA	RPA	aM	无	无	是	1

基于 Cas14 的这种非特异性 DNase 活性，开发了 ssDNA 检测平台 DETECTR-Cas14^[48]。但在诊断用途上，与 Cas12a 相关的检测平台 DETECTR^[25]相比，其在区分 ssDNA 底物方面表现出较高的保真度，可用于 DNA 单核苷酸多态性基因分型、ssDNA 病原体的检测与诊断。CRISPR-Cas14 系统还可以与 HUDSON^[42]方法结合使用，不涉及复杂的样本提取和运输，达到快速检测病毒的目的，并已成功应用于细小病毒检测人类博卡病毒（HBoV1）^[11]。这项新的诊断技术的精准性在检测人类 E3 泛素蛋白连接酶（HERC2）基因方面已经得到证明。CRISPR-

Cas14 是高通量病原突变筛查的一种有效且经济高效的方法，而目前在检测之前，需要额外的步骤从 dsDNA 靶标生成 ssDNA。Cas14 的这一特殊性质可能会增加其应用的复杂性；因此，到目前为止，它在诊断应用中的优势还没有清楚地展示出来。

2.5 CRISPR核酸扩增检测技术

许多已发表的 CRISPR 检测方法需要进行核酸扩增，但标准的扩增方法 PCR 需要热循环仪，不方便携带且反应时间较长，并不适用。目前研究较多的是与等温扩增放大的多种技术，最常用的等温放大方法是 RPA 和 LAMP，它们的工作温度分别

在 37–42℃、65℃, 利用 CRISPR 与 RPA 结合建立了 DETECTR、SHERLOCK 等一系列检测平台。并结合动态水相反应 (DAMR) 系统和蔗糖浓度的密度差异建立两相一体式反应进行核酸检测^[49]。HOLMESv2 系统与 LAMP 扩增结合, 在恒温条件下, Cas12b 检测结合 LAMP 扩增并经过亚硫酸氢盐处理可以准确定量目标 DNA 甲基化程度^[33]。滚环扩增 (RCA) 是一种高度特异的等温基因扩增方法, 可以在室温下进行, 辅助 CRISPR-Cas9 检测多个胞外囊泡小 RNA^[50]。核酸序列扩增 (NASBA) 是一种用来扩增 RNA 的方法, 需要一个初始加热步骤 (65℃), 然后在 41℃ 下进行等温扩增, 与 CRISPR-Cas9 结合与可准确区分密切相关的寨卡病毒株^[51]。

2.6 CRISPR 比色读出检测系统

在 CRISPR 检测中, 色度传感器的使用很受欢迎, 因为它可以直接将结果可视化。其中包含侧向流动分析 (LFA), CRISPR-Cas9 结合侧向流动核酸测定^[52] (CASLFA) 用于鉴定单核细胞增生李斯特菌、转基因产品和非洲猪瘟病毒 (ASFV)。有研究人员采用了一种基于胶体金纳米颗粒 (AuNP)^[53] 的比色分析方法, 以及铂纳米颗粒 (PtNPs), 再加入 Cas12a 和 Cas13a 效应蛋白来检测目标序列, 通过他们的体积条形图芯片, 可以识别和检测血清中的多种癌症基因突变。

2.7 CRISPR 识别输出检测系统

研究人员通过将 CRISPR 切割与电子信号输出系统结合, 能够准确的观察到结果的变化, 而且不需要目标放大就可以在非常低的浓度下进行测量。CRISPR-dCas9 借助基于石墨烯的场效应晶体管 (GFET) 和纳米孔传感器^[54], 通过识别目标序列来影响电子信号的输出, 利用 Cas12a 的反式切割检测报告 DNA 片段, 有效解决了低浓度目标 DNA 的检测时间问题。电化学传感系统^[55] 利用 Cas12a 的反式切割活性获得高传导信号, 而不需要进行 DNA 扩增, 通过电流差异表明目标 DNA 的存在。

3 CRISPR 系统在新冠病毒检测的应用

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 引起新冠肺炎, 并已导致国际公共卫生紧急情况, 截止到 2021 年 3 月已传播到 200 多个国家, 全球已感染 1 亿 2 040 万人,

死亡近 200 多万人。研究表明, 感染 SARS-CoV-2 的个体在无症状或有症状前可能具有高度感染性, 并且感染者平均可感染 5.6 个体^[56], 这种情况亟需快速、灵敏的 SARS-CoV-2 诊断分析方法。检测病毒的存在性对于降低病毒的基本繁殖率和最佳临床时间窗口都是至关重要的。目前采用 RT-qPCR 诊断 COVID-19 是主要的手段, 但此方法需要专业的技术人员, 且试剂和设备的获取不足减缓了疾病检测的速度。为了进一步提高新冠肺炎的诊断水平, 基于 CRISPR 系统的检测新冠肺炎的方法, 因其准确、快速的诊断检测而成为热点。而目前报道出的在新冠病毒方面应用的主要是基于 Cas12 与 Cas13 的检测技术, 故基于 CRISPR 的平台目前是准确检测和治疗 SARS-CoV-2 的一种合理的新方法。

3.1 基于 CRISPR-Cas12a 的诊断工具

研究者在 CRISPR 系统的基础上设计了各种新的诊断方法, 其中利用 CRISPR-Cas12a^[57] 系统 DETECTR 的检测平台, 通过将 CRISPR-Cas12a 与 RT-PCR 结合将从鼻拭子中提取的病毒 RNA 中进行扩增, 后将扩增产物转移至 CRISPR-Cas12a 的系统中进行荧光检测, 利用简易的设备即可进行远程检测, 并在短时间内观察到结果。其结果也可通过侧向流动检测方法进行观察^[58], 用于检测呼吸道提取物中的 SARS-CoV-2。为了更能方便操作者, 研究人员开发了一种快速、灵敏的肉眼可视的检测方法 (CRISPR-Cas12a-NER)^[59], 具有肉眼读数, 无需特殊仪器即可在 45 min 内检测到, 从而提供了一种简单可靠的现场诊断方法。目前还将等温扩增与 CRISPR-Cas12 技术相结合, 开发了一种快速检测临床标本中 SARS-CoV-2 的方法^[60]。该方法使用环介导扩增 (RT-LAMP) 对从鼻咽或口咽拭子中提取的 RNA 执行同时的逆转录和等温扩增, 随后对冠状病毒序列进行 Cas12 检测, 利用其附属切割确认了病毒的存在, 极大的缩短了检测时间, 提供了快速而又准确的检测方法。

3.2 基于 CRISPR-Cas13a 的诊断工具

随着新冠疫情的发展, 张峰团队提出了基于 CRISPR 的 SHERLOCK 技术来检测 SARS-CoV-2 的新方法^[61]。该方法分为 3 个步骤, 从核酸提取开始,

在 1 h 内即可完成,用于定量逆转录聚合酶链反应检测。首先使用重组酶聚合酶扩增(RPA)试剂盒对提取的核酸样本进行等温扩增;再使用 Cas13 检测预扩增的病毒 RNA 序列;最后借助仪器可以使用肉眼读出检测结果检测^[62]。Arizti-Sanz 团队开发的 SHINE 方法^[63],则将 SHERLOCK 可以与 HUDSON 搭配使用,这是一种灵敏而特异的集成诊断工具,可以从未提取的样本中检测 SARS-CoV-2 RNA。它通过使用加热和化学还原来破坏降解 RNA 的核酸酶和裂解病毒颗粒,消除提取核酸的步骤,用于免提取、快速和灵敏地检测 SARS-CoV-2 RNA。这是一种简单的方法,可以用最少的设备从未提取的患者样本中检测病毒 RNA,降低了样本污染的风险。此方法显示出了其在新冠肺炎大流行期间大量的诊断需求,这些研究进展可以极大地提高诊断检测的能力,为抗击传染病提供必要的工具。

4 小结

CRISPR-Cas 系统具有高效性、特异性等特征,因此被科学家们广泛推崇,随着对这些系统的组成和功能的不断开发,CRISPR 核酸检测应用将继续扩大。本文中列举了 CRISPR-Cas 系统用于识别和检测不同目的特定核酸,包括基因组 DNA、非基因组 DNA、RNA 和病原微生物的检测。开发出的新型检测平台 DETECTR 与 SHERLOCK 也具有良好的临床检验倾向,使得检测变得快捷、灵敏。并且可以集成到基于比色或荧光的便携式设备中,从而可以在现场实施。当特定的报告核酸被不同的荧光分子标记时,它们也可以被多重化。然而,多种酶的使用、反应时间和步骤使方法变得复杂,此外,基于荧光的技术会产生荧光本底,因此需要严格的优化。该系统目前在病毒检测快速应用上也表现出了的巨大潜力,会对疫情的防控提供有力的技术支撑。总之,对系统的优化和进一步认识,有望给核酸检测、基础研究、传染病和单碱基突变的遗传病、肿瘤的诊断和治疗等带来革命性影响。之后研究重点可以主要放在高通量检测 and 多重序列方向上进行检测。

参考文献

[1] Yan L, Zhou J, Zheng Y, et al. Isothermal amplified detection of

DNA and RNA [J]. Mol Biosyst, 2014, 10 (5): 970-1003.

[2] Mukama O, Nie C, Habimana JD, et al. Synergetic performance of isothermal amplification techniques and lateral flow approach for nucleic acid diagnostics [J]. Anal Biochem, 2020, 600: 113762.

[3] Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances [J]. Trends Analyt Chem, 2018, 98: 19-35.

[4] Hu B, Guo J, et al. A sensitive colorimetric assay system for nucleic acid detection based on isothermal signal amplification technology [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409 (20): 4819-4825.

[5] 方凯伦, 杨辉. CRISPR/Cas 工具的开发和应用 [J]. 科学通报, 2020, 65 (11): 973-990.

Fang KL, Yang H. Advances and applications of CRISPR/Cas toolbox [J]. Chin Sci Bull, 2020, 65 (11): 973-990.

[6] 杨春艳, 王磊, 穆登彩, 等. 基因编辑技术在疾病治疗中的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39 (11): 87-95.

Yang CY, Wang L, Mu DC, et al. Advances of gene editing in disease treatment [J]. China Biotechnol, 2019, 39 (11): 87-95.

[7] Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology [J]. J Bacteriol, 2018, 200 (7): e00580-17.

[8] Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes [J]. Nature, 2015, 526 (7571): 55-61.

[9] Morange M. What history tells us XXXVII. CRISPR-Cas: The discovery of an immune system in prokaryotes [J]. J Biosci, 2015, 40 (2): 221-223.

[10] Shen J, Zhou X, et al. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction [J]. Nat Commun, 2020, 11 (1): 267.

[11] Aquino-Jarquín G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic [J]. Nanomedicine, 2019, 18: 428-431.

[12] 李佰伦, 黄书琴, 王奕众. CRISPR/Cas 系统的研究进展及前沿应用 [J]. 生命的化学, 2020, 40 (1): 16-24.

Li BL, Huang SQ, Wang YZ. Development and frontier application of CRISPR/Cas system [J]. Chem Life, 2020, 40 (1): 16-24.

[13] Aman R, Mahas A, Mahfouz M. Nucleic acid detection using CRISPR/cas biosensing technologies [J]. ACS Synth Biol, 2020, 9 (6): 1226-1233.

[14] Shmakov S, Smargon A, Scott D, et al. Diversity and evolution of

- class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15 (3): 169-182.
- [15] Zhang Y, Malzahn AA, Sretenovic S, et al. The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science [J]. *Nat Plants*, 2019, 5 (8): 778-794.
- [16] Yan WX, Hunnewell P, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems [J]. *Science*, 2019, 363 (6422): 88-91.
- [17] Savage DF. Cas14: big advances from small CRISPR proteins [J]. *Biochemistry*, 2019, 58 (8): 1024-1025.
- [18] Yan F, Wang W, Zhang J. CRISPR-Cas12 and Cas13: the lesser known siblings of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2019, 35 (6): 489-492.
- [19] 史铠, 雷春阳, 裴舟. CRISPR/Cas 技术在核酸检测中的应用进展 [J]. *分析测试学报*, 2018, 37 (10): 1217-1220.
- Shi K, Lei CY, Nie Z. Application progress of CRISPR/cas in nucleic acid detection [J]. *J Instrum Anal*, 2018, 37 (10): 1217-1220.
- [20] Yamano T, Zetsche B, Ishitani R, et al. Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1 [J]. *Mol Cell*, 2017, 67 (4): 633-645. e3.
- [21] Müller V, Rajer F, Frykholm K, et al. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37938.
- [22] Guk K, Keem JO, Hwang SG, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 95: 67-71.
- [23] Zhang Y, Qian L, et al. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains [J]. *ACS Synth Biol*, 2017, 6 (2): 211-216.
- [24] Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360 (6387): 436-439.
- [25] Li SY, Cheng QX, Wang JM, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. *Cell Discov*, 2018, 4: 20.
- [26] Petri K, et al. SHERLOCK and DETECTR open a new frontier in molecular diagnostics [J]. *Crispr J*, 2018, 1: 209-211.
- [27] Liu H, Wang JB, Zeng HJ, et al. RPA-Cas12a-FS: a frontline nucleic acid rapid detection system for food safety based on CRISPR-Cas12a combined with recombinase polymerase amplification [J]. *Food Chem*, 2021, 334: 127608.
- [28] Batista AC, Pacheco LGC. Detecting pathogens with Zinc-Finger, TALE and CRISPR-based programmable nucleic acid binding proteins [J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 152: 98-104.
- [29] Wang Y, Ke Y, Liu W, et al. A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level [J]. *ACS Sens*, 2020, 5 (5): 1427-1435.
- [30] Du YC, Wang SY, Wang YX, et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase combined CRISPR-Cas12a amplification strategy for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase with zero background [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 171: 112734.
- [31] Li CY, Zheng B, Li JT, et al. Holographic optical tweezers and boosting upconversion luminescent resonance energy transfer combined clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas12a biosensors [J]. *ACS Nano*, 2021.
- [32] Strecker J, Jones S, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 212.
- [33] Li L, Li S, Wu N, et al. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8 (10): 2228-2237.
- [34] Mukama O, et al. An ultrasensitive and specific point-of-care CRISPR/Cas12 based lateral flow biosensor for the rapid detection of nucleic acids [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 159: 112143.
- [35] 陈敏洁, 唐桂月, 等. 基于 CRISPR-Cas13 家族的 RNA 编辑系统及其最新进展 [J]. *生物技术通报*, 2020, 36 (3): 1-8.
- Chen MJ, Tang GY, Hong XN, et al. Research progress on CRISPR-Cas13-mediated RNA editing system [J]. *Biotechnol Bull*, 2020, 36 (3): 1-8.
- [36] Ali Z, Mahas A, Mahfouz M. CRISPR/Cas13 as a tool for RNA interference [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23 (5): 374-378.
- [37] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353 (6299): aaf5573.
- [38] Hadidi A. Next-generation sequencing and CRISPR/Cas13 editing in viroid research and molecular diagnostics [J]. *Viruses*, 2019, 11 (2). DOI: 10.3390/v11020120.
- [39] Hosaka T, Yamashita T, Teramoto S, et al. ADAR2-dependent A-to-I RNA editing in the extracellular linear and circular RNAs [J]. *Neurosci Res*, 2019, 147: 48-57.

- [40] Kellner MJ, et al. SHERLOCK : nucleic acid detection with CRISPR nucleases [J] . Nat Protoc, 2019, 14 (10) : 2986-3012.
- [41] Myhrvold C, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J] . Science, 2018, 360 (6387) : 444-448.
- [42] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J] . Science, 2017, 356 (6336) : 438-442.
- [43] Cui Y, Fan S, Yuan Z, et al. Ultrasensitive electrochemical assay for microRNA-21 based on CRISPR/Cas13a-assisted catalytic hairpin assembly [J] . Talanta, 2021, 224 : 121878.
- [44] Khan H, Khan A, Liu Y, et al. CRISPR-Cas13a mediated nanosystem for attomolar detection of canine parvovirus type 2 [J] . Chin Chem Lett, 2019, 30 (12) : 2201-2204.
- [45] Wu Y, Liu SX, Wang F, et al. Room temperature detection of plasma Epstein-Barr virus DNA with CRISPR-Cas13 [J] . Clin Chem, 2019, 65 (4) : 591-592.
- [46] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J] . Science, 2018, 360 (6387) : 439-444.
- [47] Niewoehner O, Jinek M. Structural basis for the endoribonuclease activity of the type III-A CRISPR-associated protein Csm6 [J] . RNA, 2016, 22 (3) : 318-329.
- [48] Aquino-Jarquin G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic [J] . Nanomedicine, 2019, 18 : 428-431.
- [49] Yin K, Ding X, Li ZY, et al. Dynamic aqueous multiphase reaction system for one-pot CRISPR-Cas12a-based ultrasensitive and quantitative molecular diagnosis [J] . Anal Chem, 2020, 92 (12) : 8561-8568.
- [50] Wang RX, Zhao XX, et al. Rolling Circular Amplification (RCA) - Assisted CRISPR/Cas9 Cleavage (RACE) for Highly Specific Detection of Multiple Extracellular Vesicle MicroRNAs [J] . Analytical Chemistry, 2020, 92 (2) : 2176-2185.
- [51] Pardee K, Green AA, Takahashi MK, et al. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components [J] . Cell, 2016, 165 (5) : 1255-1266.
- [52] Wang X, Xiong E, Tian T, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay [J] . ACS Nano, 2020, 14 (2) : 2497-2508.
- [53] Yuan C, Tian T, Sun J, et al. Universal and naked-eye gene detection platform based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas12a/13a system [J] . Anal Chem, 2020, 92 (5) : 4029-4037.
- [54] Nouri R, Jiang Y, Lian XL, et al. Sequence-specific recognition of HIV-1 DNA with solid-state CRISPR-cas12a-assisted nanopores (SCAN) [J] . ACS Sens, 2020, 5 (5) : 1273-1280.
- [55] Dai YF, Somoza RA, Wang L, et al. Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the development of a universal electrochemical biosensor [J] . Angew Chem Int Ed, 2019, 58 (48) : 17399-17405.
- [56] Sanche S, Lin YT, Xu CG, et al. High contagiousness and rapid spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [J] . Emerg Infect Dis, 2020, 26 (7) : 1470-1477.
- [57] Broughton JP, Deng XD, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J] . Nat Biotechnol, 2020, 38 (7) : 870-874.
- [58] Broughton JP, Deng XD, Yu GX, et al. Rapid detection of 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 using a CRISPR-based DETECTR lateral flow assay [J] . medRxiv, 2020.
- [59] Wang X, Zhong M, Liu Y, et al. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER [J] . Sci Bull : Beijing, 2020, 65 (17) : 1436-1439.
- [60] Xiang XH, Qian KL, Zhang Z, et al. CRISPR-cas systems based molecular diagnostic tool for infectious diseases and emerging 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia [J] . J Drug Target, 2020, 28 (7/8) : 727-731.
- [61] A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics [EB/OL] . <https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20>
- [62] 许金和, 王水良, 张胜行, 等. 新型冠状病毒核酸检测方法 [J] . 国际检验医学杂志, 2020, 41 (17) : 2138-2142.
- Xu JH, Wang SL, Zhang SX, et al. Methods for nucleic acid detection of 2019 novel coronavirus [J] . International Journal of Laboratory Medicine, 2020, 41 (17) : 2138-2142.
- [63] Arizti-Sanz J, Freije CA, Stanton AC, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2 [J] . Nat Commun, 2020, 11 : 5921.