

研究报告

基于分子信标策略的CRISPR/Cas12a荧光传感器 用于循环肿瘤DNA的放大检测

张函笑 代晓春 周亚楠 吕旭珍 弓韬 赵旭华* 于保锋*

(山西医科大学基础医学院, 生物化学与分子生物学教研室, 太原 030001)

摘要 构建了一种以分子信标(Molecular beacon, MB)为信号探针的 CRISPR/Cas12a 生物传感器,用于循环肿瘤 DNA(Circular tumor DNA, ctDNA)的快速放大检测。MB 具有良好的稳定性,其颈部末端分别标记有荧光素(FAM)和四甲基罗丹明(TAMRA)两种荧光基团。ctDNA 不存在时, CRISPR/Cas12a 体系无活性,无法切割 MB,因此 MB 两端的荧光基团由于形成发夹结构的颈部相互靠近而发生荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET),显示出 TAMRA 的荧光。当 ctDNA 存在时, ctDNA 特异性识别 Cas12a/crRNA 二元复合物并激活 Cas12a 的反式切割活性。由于单链 DNA 是 Cas12a 最敏感的底物,因此 MB 的环部单链首先被切割,继而引起颈部双链的解离而导致两种荧光团彼此远离,无法发生 FRET,最终显示出 FAM 的荧光信号。对 MB 环部的碱基数目、MB 浓度以及 crRNA 与 Cas12a 的浓度比例等实验条件进行了优化。在最优条件下, 1.7~500 pmol/L 范围内, ctDNA 浓度与传感器在 518 nm 处的荧光强度呈线性关系,检出限为 0.6 pmol/L(3 σ)。将此传感器用于血清样品中 ctDNA 的检测,回收率在 93%~110%之间。

关键词 CRISPR; 生物传感器; 荧光共振能量转移; 循环肿瘤DNA

目前,癌症已经成为威胁人类健康并导致死亡的重大疾病之一^[1],这主要源于肿瘤的发病机制复杂、诊断不及时和进展速度快等因素^[2]。因此,早期的精准诊断与及时治疗对于降低癌症患者的发病率和死亡率至关重要^[3]。组织活检是癌症诊断最常用的技术^[4],然而其具有创伤性、耗时长、成本高且易感染等不足^[5]。液体活检是一种无创、低成本且可以克服异质性的诊断方法,为实时评估肿瘤的变化带来了极大的便利^[6]。循环肿瘤 DNA(Circular tumor DNA, ctDNA)是由肿瘤细胞释放到外周血中的 DNA 小片段(常为单链或双链 DNA),是液体活检中最重要的生物标志物之一^[7]。ctDNA 在血液中含量的低,并且半衰期较短(16~150 min),因此对 ctDNA 的准确检测具有挑战性^[8]。目前,常用的 ctDNA 检测方法包括聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)^[9]、基因测序^[10]、电化学分析法^[11]和比色法^[12]等。但这些方法具有很多不足,例如,PCR 方法的步骤复杂,容易受到生物样本的干扰^[13]; DNA 测序需要昂贵的设备和较长的分析时间(2~3 周),无法足临床快速检测的需求。因此,开发灵敏度高、操作简单、快速且低成本的 ctDNA 检测方法非常必要。

成簇的有规律间隔的短回文重复(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及相关蛋白(CRISPR associated protein, Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统是广泛存在于细菌中的一种获得性免疫机制^[14-16]。作为 2V 类的 CRISPR 系统, CRISPR/Cas12a 体系由特异性识别核酸序列的引导 RNA(crRNA)和 Cas12a 蛋白组成^[17]。研究发现,在 crRNA 的引导下, Cas12a 蛋白不仅具有特异性识别靶标序列并且切割靶标序列的顺式切割活性^[18],还具有无选择性地切割周围 DNA 序列的反式切割活性^[19]。

研究者基于 CRISPR/Cas12a 体系的反式切割特性构建了多种生物传感平台。Ren 研究组^[20]将滚环扩增技术和 Cas12a 体系结合,构建了一种双放大体系用于 miRNA 的超灵敏检测; Lu 研究组^[21]将功能

2022-04-26 收稿; 2022-12-01 接受

山西省自然科学基金项目(Nos. 202103021224240, 201901D211317, 201901D111190)、山西医科大学细胞生理学教育部重点实验室开放基金项目(No. KLMEC/SXMU-202011)和山西省“1331工程”重点学科建设计划项目(No. 1331KSC)资助。

* E-mail: zhaoxuhua1985@126.com; shanxiyangcheng@126.com

核酸的特异性识别能力和 Cas12a 体系的信号放大技术相结合,开发了一种可以检测非核酸类目标物的荧光生物传感系统。这些传感器都以两端分别标记有荧光基团(FAM)和淬灭基团(BHQ)的单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA)作为信号探针,具有灵敏度高和切割速度快等优势,但 ssDNA 信号探针的序列长度受限(通常为 5 个碱基),并且在复杂的生物样本中稳定性较差,限制了其应用范围^[22-23]。除 ssDNA 信号探针外,双链 DNA(Double-stranded DNA, dsDNA)也可作为 CRISPR/Cas12a 体系的信号探针^[19,24]。研究表明,相比于 ssDNA 信号探针,dsDNA 信号探针的稳定性高、通用性好(探针序列的长度不受限制),但是相对而言,Cas12a 蛋白酶对 dsDNA 的酶切速度明显下降(长达数小时以上),并且切割速度受金属离子浓度影响较大^[25],进而影响其检测速度。为了构建同时具备 ssDNA 和 dsDNA 优势的信号探针,研究者将注意力转移到分子信标探针(Molecular beacon, MB)上。MB 是一段具有茎-环结构的 DNA 序列,5'和 3'末端可分别标记荧光基团和淬灭基团。自由状态下,MB 呈发夹结构,荧光团和淬灭团彼此靠近发生能量共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET),荧光被淬灭;目标物存在时,与 MB 分子结合,使 MB 的空间构象发生变化,发夹结构打开,淬灭基团远离荧光基团,荧光得以恢复。

本研究采用具有颈环结构的 MB 作为信号探针,构建了一种 CRISPR/Cas12a 生物传感器用于 ctDNA 的放大检测。标记于 MB 颈部末端的荧光素(FAM)和四甲基罗丹明(TAMRA)荧光基团是一对常见的 FRET 转移对,其颈部碱基的杂交使供体 FAM 与受体 TAMRA 之间发生 FRET 效应。当存在靶标序列 ctDNA 时,被激活的 Cas12a 切割 MB 并引起颈部双链的解离,导致两种荧光团彼此远离,FRET 现象减弱,从而实现 ctDNA 的放大检测。MB 信号探针的设计具有诸多优势:首先,由于 CRISPR/Cas12a 体系对 ssDNA 底物最敏感,所以 MB 探针环部的 ssDNA 可被 CRISPR/Cas12a 体系快速识别并切割,从而提高了目标物的检测速度;其次,MB 颈部的 dsDNA 设计既降低了荧光探针的背景信号,又增加了探针在复杂样品中的稳定性。将本传感器用于血清样本中 ctDNA 的测定,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-6000 荧光分光光度计(日本岛津公司); FE-28 pH 计(美国 Mettler-Toledo 公司); Bio-rad 荧光凝胶成像仪(美国 Bio-rad 公司)。

NaCl、MgCl₂、乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA·2H₂O)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, C₈H₁₈N₂O₄S)、6×DNA 上样缓冲液、30%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)胶液、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、胶红染料(GelRed)和 SYBR Green I 核酸染料均购于北京索莱宝科技有限公司; EnGen®Lba Cas12a 及 10×NE 缓冲液(50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 100 μg/mL BSA, pH 7.9)购自美国 New England Biolabs 公司。以上试剂均为分析纯,直接使用;实验用水为 Millipore 纯水系统(美国 Millipore 公司)制备的超纯水(>18.2 MΩ·cm)。DEPC 水及本实验所用的所有的 DNA 序列、DNA marker 购于生工生物工程(上海)股份有限公司, crRNA 序列购买于上海吉玛制药有限公司, DNA 和 RNA 序列见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 Cas12a/crRNA 二元复合物的制备

移取 0.6 μL Cas12a(1 μmol/L)和 0.6 μL crRNA(1 μmol/L)至 EP 管中,补加 1×NEB 缓冲液至体积为 6 μL,混匀,37 °C 水浴反应 30 min,形成 100 nmol/L 的 Cas12a/crRNA 二元复合物。

1.2.2 ctDNA 检测方法

移取 10 μL Cas12a/crRNA 二元复合物(10 nmol/L)至 PCR 管中,加入 10 μL 不同浓度的 ctDNA,再加入 4 μL MB(2 μmol/L),最后补加 DEPC 水至 30 μL,混匀,37 °C 水浴反应 40 min,再于 65 °C 反应 15 min 使酶失活。反应结束后,补加缓冲液(20 mmol/L HEPES, 10 mmol/L Mg(NO₃)₂, 100 mmol/L NaNO₃)至总体积为 100 μL,测定体系的荧光强度。激发波长为 490 nm,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm,发射波长范围为 510~650 nm。

表1 本研究所用的DNA及RNA序列

Table 1 DNA and RNA sequences used in this work

名称 Name	序列 Sequence (5'→3')
ctDNA	CAGGTAAACACACAAACCTT
MB	FAM-TCTCTCTTTATTTGAGAGA-TAMRA
MB-4	TCTCTCTATTGAGAGA
MB-7	TCTCTCTTTATTTGAGAGA
MB-10	TCTCTCTTTATTTATTTGAGAGA
MB-13	TCTCTCTTTATTTATTTATGAGAGA
2 MT	CAGCTAAACACACAAACCTT
3 MT	CAGCTAAACACACAAACCTT
Random	AAAGCTCGCCATCAAATAGC
ssDNA	FAM-TTTTT-BHQ1
ssDNA-1	TCTCTCTTTATTTAAACCA
	TCTCTCTTTATTTAAACCA
dsDNA	TGCTTTAAATAAAGAGAGA
crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAGGUUGUGUUUACCUG

注: 红色标记的碱基为错配碱基; ctDNA, 循环肿瘤DNA; MB, 分子信标; MB-x, 环部不同碱基数的MB; ssDNA, 单链DNA; dsDNA, 双链DNA; 2-MT, 两碱基错配; 3-MT, 三碱基错配; Random, 随机序列。

Note: Bases marked in red are mismatched bases; CtDNA, circulating tumor DNA; MB, molecular beacon; MB-x, MB with different bases in the loop; ssDNA, single-stranded DNA; dsDNA, double-stranded DNA; 2-MT, two base mismatched; 3-MT, three base mismatched; Random, random DNA sequence.

1.2.3 非变性PAGE实验

将 10 μL Cas12a/crRNA 二元复合物(20 nmol/L)和 5 μL ctDNA(2 $\mu\text{mol/L}$)加入 EP 管中,再分别加入 5 μL 等浓度(2 $\mu\text{mol/L}$)的 ssDNA、MB 和 dsDNA,补加 DEPC 水至 30 μL ,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应不同时间(10 和 20 min),再于 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,使酶失活。

将 10 μL 样品和 2 μL 6 \times 上样缓冲液混合,进行 PAGE(12%),室温下在 1 \times TAE 缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, pH 8.5)中电泳 40 min,电压为 120 V。电泳结束后,用 GelRed(1:10000)染色 30 min;最后,通过 Bio-rad 荧光凝胶成像系统采集图像。

1.2.4 血液样品分析

血液样本由山西省太原市中医院提供,相关研究已获得了相关机构审查委员会的批准,参与者知情同意。血液样本首先在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 10000 r/min 离心 10 min,上层血清在 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 15 min,灭活脱氧核糖核酸酶,然后用超纯水稀释 10 倍。最后,将不同浓度的 ctDNA 添加至血清样品中,按照 1.2.2 节的方法进行测定,计算回收率。

2 结果与讨论

2.1 实验原理

基于 MB 探针的 CRISPR/Cas12a 荧光传感器的设计原理如图 1 所示。MB 探针的颈部末端分别标记有 FAM(供体)和 TAMRA(受体)两种荧光基团。当不存在目标物 ctDNA 时,CRISPR/Cas12a 体系无切割活性,MB 两端的荧光基团通过颈部杂交靠近而发生 FRET 过程,在 494 nm 激发光下显示 TAMRA 的荧光。当加入目标物 ctDNA 后,ctDNA 特异性识别 Cas12a/crRNA 二元复合物并激活了 Cas12a 的反式切割活性。MB 的环部 ssDNA 首先被裂解,并引起颈部 dsDNA 的解离。此时,两种荧光基团彼此远离导致 FRET 现象消失,在 494 nm 的激发下主要显示 FAM 的荧光信号,基于此可实现 ctDNA 的检测。

2.2 MB探针和ssDNA/dsDNA探针的性能比较

相同浓度的 MB 探针和 ssDNA 探针在室温静置 0、60 和 120 min 后,在 518 nm 处的荧光强度变化如图 2A 所示,MB 探针比 ssDNA 探针的背景值更低且更稳定。通过动力学实验对比了 CRISPR/Cas12a 体系对 MB 探针和 ssDNA 探针的切割速度。如图 2B 所示,随着切割时间延长,MB 探针和 ssDNA 探针在

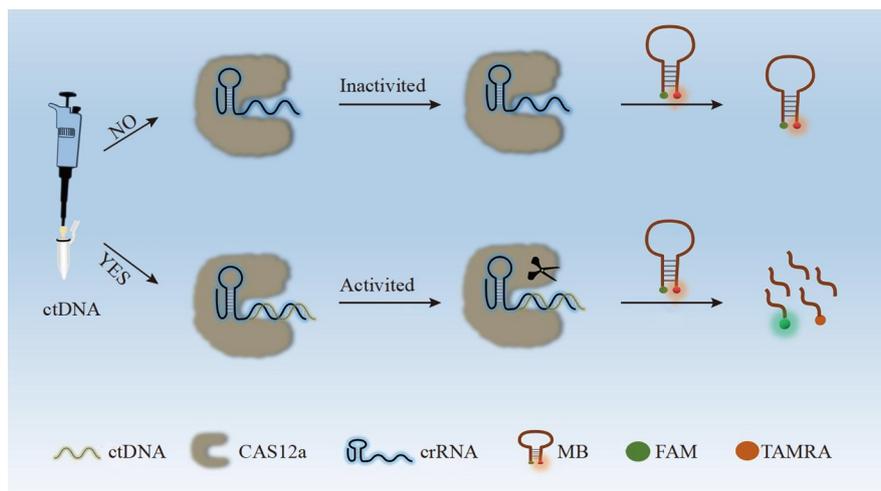


图1 基于分子信标探针的 CRISPR/Cas12a 传感器用于 ctDNA 检测的原理示意图

Fig.1 Detection strategy of CRISPR/Cas12a sensor based on MB probe for detection of ctDNA

518 nm 处的荧光都逐渐增强。ssDNA 探针在 20 min 时荧光基本达到稳定,而 MB 探针在 30 min 时荧光达到稳定。采用非变性 PAGE 实验比较了 Cas12a 对等长度的 3 种探针(MB/ssDNA-1/dsDNA)的切割速度。如图 2C 所示,ssDNA-1 和 MB 在 10 min 时均有部分被切割(泳道 3 和泳道 7),在 20 min 时大部分均被切割(泳道 4 和泳道 8);然而在同样条件下 dsDNA 探针未被切割(泳道 11 和泳道 12)。上述结果说明,Cas12a 对 MB 的切割速度和 ssDNA-1 差别不大,比 dsDNA 的切割速度快很多。

2.3 可行性验证

为了验证传感器检测 ctDNA 的可行性,首先考察了加入 ctDNA 前后传感器荧光信号的变化情况。如图 3A 所示,MB 探针上 FAM 的最大发射波长为 518 nm, TAMRA 作为受体,吸收了 FAM 的发射光后,在 585 nm 处出现发射峰,两峰荧光强度之比为 1:1,表明 MB 探针发生了 FRET 效应(曲线 a)。Cas12a 和 crRNA 的加入对 MB 的荧光信号基本无影响,这表明 Cas12a 的切割活性未被激活(曲线 b 和 c)。加入 ctDNA 后,受体的荧光峰(585 nm)消失,而供体的荧光峰(518 nm)强度明显增加(曲线 d),这表明 ctDNA 激活了 Cas12a 的活性,并引发 MB 的切割和解链, FAM 和 TAMRA 分离,导致 FRET 效应消失。如图 3B 所示,加入 ctDNA 前后,在紫外光的照射下,样品颜色有明显差别,此结果与荧光信号的变化一致。因此,此传感器可用于 ctDNA 的检测。

2.4 实验条件的优化

为了获得传感器的最佳性能,对 MB 环部的碱基数目、MB 浓度以及 crRNA 与 Cas12a 的浓度比例进行了优化。合成了 4 条 MB 探针(MB-4、MB-7、MB-10、MB-13), MB 环部碱基的数目分别为 4、7、10 和 13。由于这 4 条 MB 探针未标记荧光基团,本研究使用核酸嵌入剂 SYBR Green I 指示传感器的荧光变化情况。如图 4 所示,MB 环部的碱基数目从 4(MB-4)增加到 7(MB-7)时,CRISPR/Cas12a 体系的切割效率(切割百分比($\%$)= $100 \times (F_0 - F_1) / F_0$,其中, F_0 为传感器的背景荧光值, F_1 为 Cas12a 切割 MB 后的荧光值)增加,其主要原因是 MB 环部碱基数的增加减少了 Cas12a 切割时的空间位阻。当 MB 环部的碱基数目从 7(MB-7)增加到 13(MB-13)时,CRISPR/Cas12a 体系的切割效率略降,其主要原因是 Cas12a 的反式切割活性属于非特异性切割^[26],并且达到饱和水平,环部序列的增加导致被切割的 MB 数目减少。因此,选择 MB-7 进行后续实验。

同时,本研究还考察了 crRNA 与 Cas12a 的浓度比例对传感器荧光的影响,用 $F - F_0$ 表示有、无 ctDNA 时传感器在 518 nm 处荧光强度的差值。如图 5A 所示,当 crRNA 与 Cas12a 的浓度比由 0.5:1 增加到 2:1 时, $F - F_0$ 值逐渐增大;当其比例超过 2:1 时, $F - F_0$ 值反而下降,可能是部分 ctDNA 与游离的 crRNA 结合降低了其与 Cas12a/crRNA 二元复合物的结合效率,从而影响了 Cas12a 酶的活性。因此,选择 crRNA 与 Cas12a 酶的最佳比例为 2:1。考察了不同浓度的 MB 对传感器荧光的影响(图 5B),随着 MB

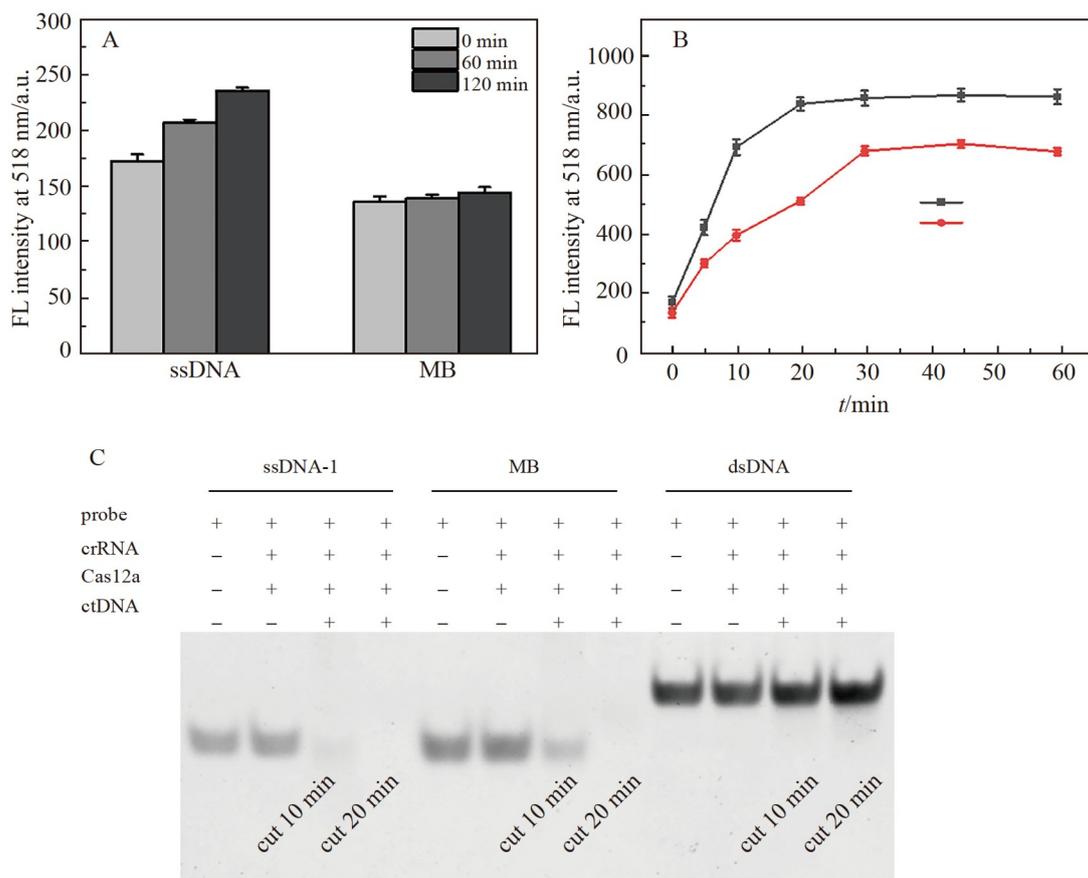


图2 (A) MB 和 ssDNA 探针放置不同时间在 518 nm 处的荧光强度,其中 MB 和 ssDNA 的浓度均为 270 nmol/L; (B) CRISPR/Cas12a 切割 MB 和 ssDNA 探针的动力学比较; (C) Cas12a 切割 3 种探针的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 (A) Fluorescence intensity at 518 nm of MB and ssDNA at different time, the concentrations of MB and ssDNA are both 270 nmol/L; (B) Relationship between CRISPR/Cas12a cleavage time and fluorescence enhancement; (C) Native polyacrylamide gel electrophoresis analysis of three probes cleaved by Cas12a

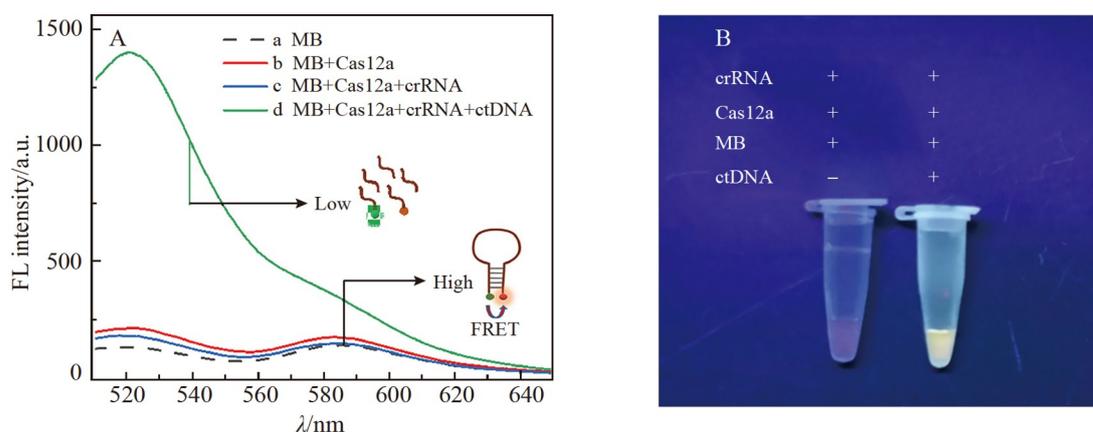


图3 (A) 传感器在不同条件下的荧光响应情况,其中 crRNA、Cas12a 和 MB 的反应浓度分别为 3.33、3.33 和 270 nmol/L; (B) 加入 ctDNA 前后体系在紫外光照射下的照片

Fig. 3 (A) Fluorescence response of the biosensor under different conditions, the concentrations of crRNA, Cas12a and MB are 3.33, 3.33 and 270 nmol/L, respectively; (B) Optical images of system with and without ctDNA under UV light irradiation

浓度增加, $F-F_0$ 值也随之增大。但是, 当 MB 的浓度超过 270 nmol/L 时, $F-F_0$ 值随着 MB 浓度的增加反而减少, 这可能是因为 Cas12a 酶无法切割过量的 MB 而导致背景增加。因此, 本研究选择 MB 的最佳浓度为 270 nmol/L。

2.5 传感器的检测性能

在最优实验条件下, 检测了不同浓度的 ctDNA 存在时传感体系的荧光响应。随着 ctDNA 浓度增加, 传感器的 FRET 效应逐渐消失, 在 518 nm 处的荧光强度越逐渐增强(图 6A)。图 6B 为传感器检测低浓度范围 ctDNA 时的荧光响应图。图 6C 显示了传感器在 518 nm 处的荧光强度与 ctDNA 浓度的关系, 当 ctDNA 的浓度达到 50 nmol/L 时, 传感器在 518 nm 处的荧光强度基本趋于稳定。图 6D 的红色实线为以 MB 作为

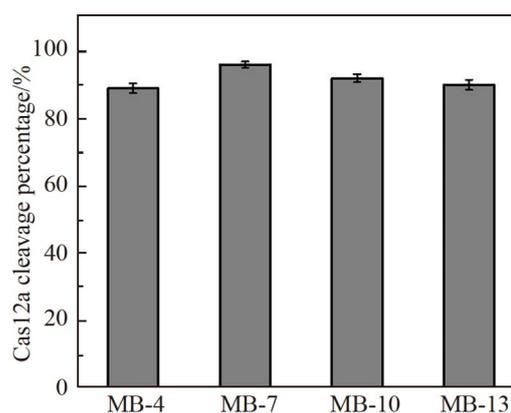


图4 Cas12a 对环基数目不同的分子信标的切割率

Fig. 4 Cleavage rates of MB by Cas12a with different base numbers in loop

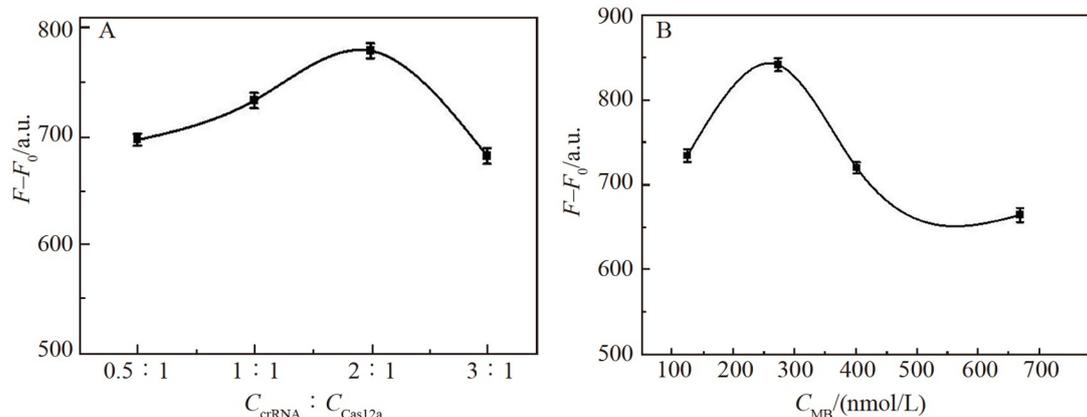


图5 基于 CRISPR/Cas12a 荧光传感器实验条件的优化: (A) crRNA 与 Cas12a 的浓度比例; (B) 分子信标浓度

Fig. 5 Optimization of experimental conditions for fluorescence sensor based on CRISPR/Cas12a: (A) Concentration ratio of crRNA to Cas12a; (B) Concentration of the molecular beacon

信号报告单元时, 传感器检测 ctDNA 的校正曲线。当 ctDNA 浓度为 1.7~500 pmol/L 时, 传感器在 518 nm 处的荧光强度与 ctDNA 的浓度呈线性关系, 检出限为 0.6 pmol/L (3σ)。以 ssDNA 作信号探针时, ctDNA 的检出限为 0.4 pmol/L (蓝色虚线)。本传感器与文献报道的检测 ctDNA 的生物传感器的性能对比见表 2, 可见所构建的 ctDNA 传感器检出限更低, 这主要归因于 CRISPR/Cas12a 体系的无特异性反式切割活性以及 MB 探针的结构优势。

2.6 传感器的特异性

考察了传感器的特异性。测定了双碱基错配目标链(2MT)、三碱基错配目标链(3MT)、随机 DNA 序列(Random)与目标 DNA 序列的响应信号(图 7)。如图 7B 所示, 当 ctDNA 浓度为 400 pmol/L 时, 传感器在 518 nm 处的荧光强度最大; 而双碱基错配、三碱基错配的靶序列和随机 DNA 链的响应与空白实验响应值相近。上述结果证明, 构建的传感系统具有良好的碱基错配识别能力, 可以特异性检测 ctDNA。

2.7 实际样品分析

为了评估此传感器在实际样品中的检测效果, 采用本传感器检测了血清样品中的 ctDNA。在稀释的血清样本中加入不同浓度的 ctDNA, 采用本方法进行检测。如图 8B 所示, 当血清中 ctDNA 的浓度在 3.3~500 pmol/L 范围内时, 传感器在 518 nm 处的荧光强度与 ctDNA 的浓度呈线性关系, 血清样本中 ctDNA 的检出限为 1.3 pmol/L (3σ)。

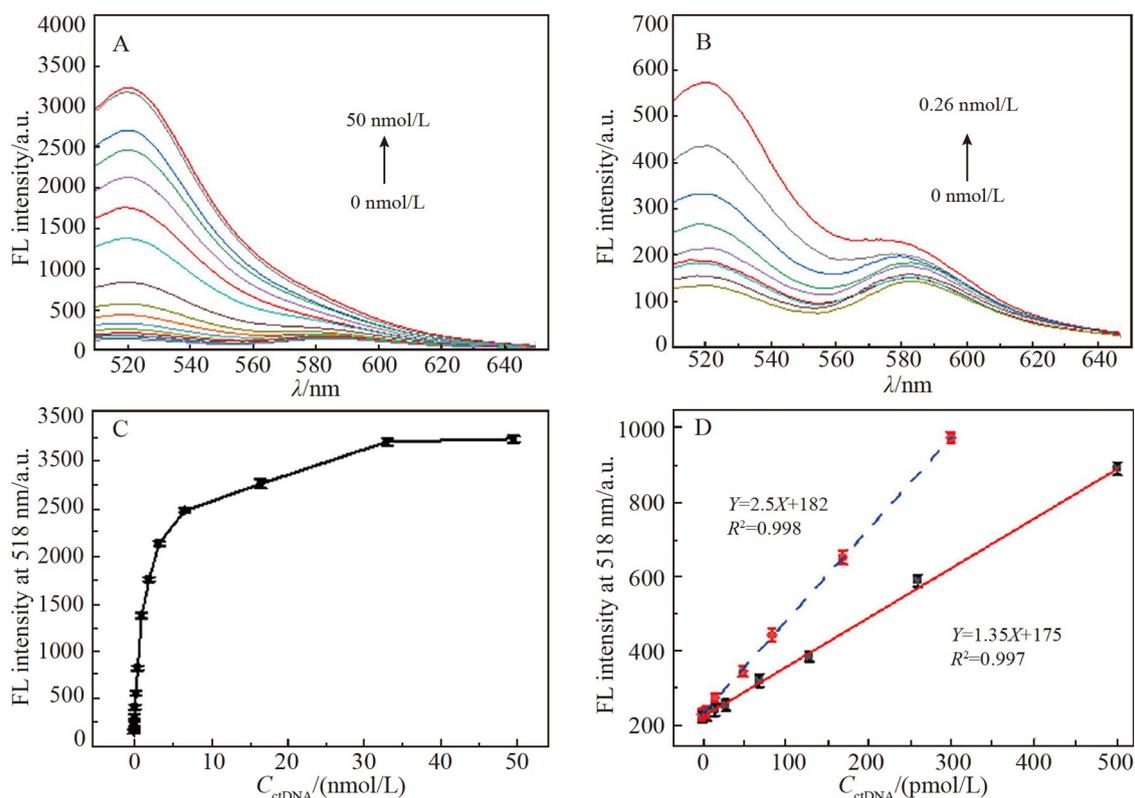


图6 (A、B) MB作为报告单元时,不同浓度 ctDNA 存在时生物传感器的荧光光谱图;(B) MB作为报告单元时,加入低浓度范围 ctDNA 时生物传感器的荧光光谱图;(C) MB作为报告单元时,不同浓度 ctDNA 与传感器在 518 nm 处荧光强度的相关性;(D) 以 MB(红色实线)和 ssDNA(蓝色虚线)分别作为信号报告单元时,传感器的校正曲线图

Fig. 6 (A, B) Fluorescence spectra of the fabricated biosensor in the presence of different concentrations of ctDNA when MB is used as the reporter unit; (C) Relationship between concentration of ctDNA and fluorescence intensity at 518 nm when MB is used as the reporter unit; (D) Calibration curves of the MB probe (Red solid line) and ssDNA probe (Blue dotted line) for detection of ctDNA

表2 不同ctDNA生物传感器检测性能的比较

Table 2 Comparison of different ctDNA biosensors

检测方法 Detection method	线性范围 Linear range	检出限 Limit of detection	参考文献 Ref.
基于量子点的荧光检测法 Fluorescence detection based on quantum dots	0.04~400 nmol/L	17.4 nmol/L	[27]
电化学分析法 Electrochemical analysis	2~20 nmol/L	0.65 nmol/L	[28]
电化学阻抗谱测试法 Electrochemical impedance spectroscopy	—	0.128 nmol/L	[29]
基于立足点介导的链置换反应的荧光检测法 Fluorescence detection based on toehold-mediated strand displacement reaction (TSDR)	2~100 nmol/L	0.85 nmol/L	[30]
基于上转换纳米颗粒和金纳米笼的荧光检测法 Fluorescence detection based on upconversion nanoparticles (UCNPs) and gold nanocages (AuNCs)	5~1000 pmol/L	6.3 pmol/L	[31]
基于金纳米颗粒的比色分析法 Colorimetric assay based on gold nanoparticles (AuNPs)	1%~10% WT DNA	67 pmol/L	[32]
基于构建 DNA FWJ 结构的比率荧光法 Ratiometric fluorescent method based on the construction of a DNA four-way junction(FWJ)	—	120 pmol/L	[33]
基于 CRISPR/Cas12a 的荧光传感器 Fluorescence biosensors based on CRISPR/Cas12a	1.7~500 pmol/L	600 fmol/L	本工作 This work

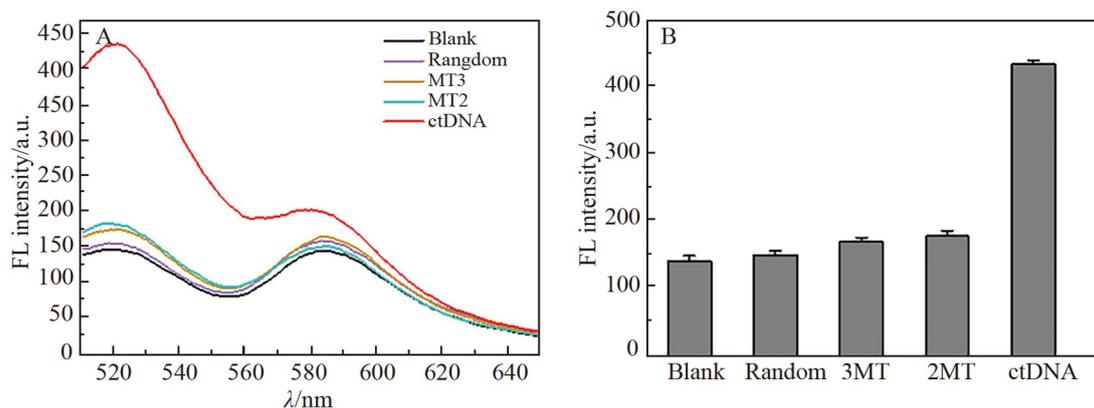


图7 传感器的选择性: (A)不同 DNA 链的荧光光谱图; (B)不同 DNA 链在 518 nm 处的荧光强度
 Fig. 7 Selectivity analysis of this sensor: (A) Fluorescence spectra of different sequences; (B) Fluorescence intensity of different sequences at 518 nm

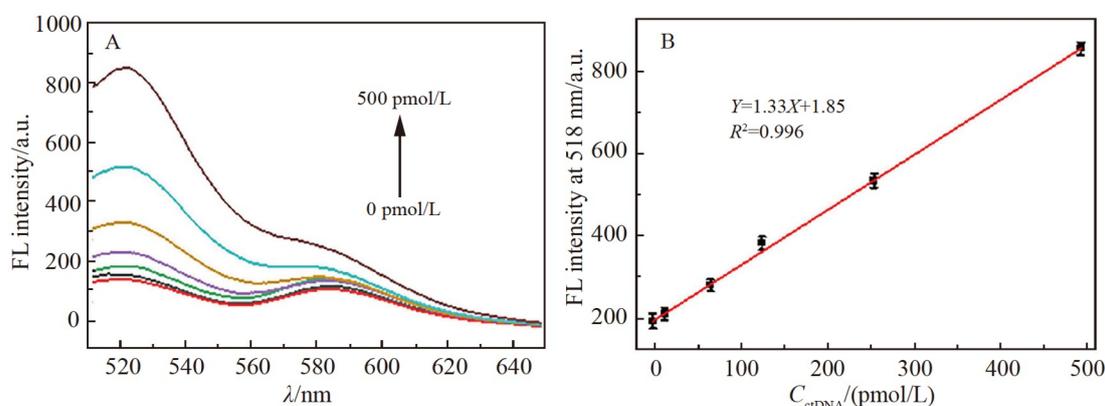


图8 传感器用于血清样本中 ctDNA 的检测: (A)加入不同 ctDNA 时的荧光光谱图; (B) 传感器检测血清中 ctDNA 的校正曲线
 Fig.8 Detection of ctDNA in serum samples by this sensor: (A) Fluorescence spectra in the presence of different concentrations of ctDNA; (B) Calibration curve for detection of ctDNA in serum

选取两个不同的血清样本,每个样本加入 3 个不同浓度水平的 ctDNA,采用本传感器进行测定。实验结果如表 3 所示,血清样品中 ctDNA 的回收率在 93%~110%之间,表明此传感器有望用于复杂生物样本中 ctDNA 的检测。

表3 人血清样本中ctDNA的检测结果

Table 3 Detection results of ctDNA in human serum samples

样本序号 NO.	加入值 Added/ (pmol/L)	测得值 Found/ (pmol/L)	回收率 Recovery/ %	标准偏差 Relative standard deviation/ (%, n=3)
1	20.0	22.1	110	3.8
	40.0	37.2	93	2.6
	60.0	64.3	107	2.9
2	20.0	18.8	94	3.1
	40.0	38.8	97	1.9
	60.0	62.5	104	2.3

3 结论

本研究将 CRISPR/Cas12a 体系与 MB 探针相结合,构建了一种用于检测 ctDNA 的荧光传感器。基于

CRISPR/Cas12a 体系的信号放大效应,本传感器表现出很高的灵敏度,检出限低至 0.6 pmol/L。MB 探针的设计不仅可在不影响 Cas12a 切割效率的条件下提高探针信号的稳定性和通用性,而且可有效避免随机信号的干扰,更加精准地检测 ctDNA。将此传感器用于血清样本中 ctDNA 的检测,结果令人满意。

References

- [1] BURRELL R A, MCGRANAHAN N, BARTEK J, SWANTON C. *Nature*, 2013, 501(7467): 338-345.
- [2] MURTAZA M, DAWSON S J, TSUI D W Y, GALE D, FORSHEW T, PISKORZ A M, PARKINSON C, CHIN S F, KINGSBURY Z, WONG A S C, MARASS F, HUMPHRAY S, HADFIELD J, BENTLEY D, CHIN T M, BRENTON J D, CALDAS C, ROSENFELD N. *Nature*, 2013, 497(7447): 108-112.
- [3] YOUNG E, PHILPOTT H, SINGH R. *World J. Gastroenterol.*, 2021, 27(31): 5126-5151.
- [4] GANDARA D R, PAUL S M, KOWANETZ M, SCHLEIFMAN E, ZOU W, LI Y, RITTMAYER A, FEHRENBACHER L, OTTO G, MALBOEUF C, LIEBER D S, LIPSON D, SILTERRA J, AMLER L, RIEHL T, CUMMINGS C A, HEGDE P S, SANDLER A, BALLINGER M, FABRIZIO D, MOK T, SHAMES D S. *Nat. Med.*, 2018, 24(9): 1441-1448.
- [5] SIRAVEGNA G, MARSONI S, SIENA S, BARDELLI A. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2017, 14(9): 531-548.
- [6] BEDARD P L, HANSEN A R, RATAIN M J, SIU L L. *Nature*, 2013, 501(7467): 355-364.
- [7] WAN J C M, MASSIE C, GARCIA-CORBACHO J, MOULIERE F, BRENTON J D, CALDAS C, PACEY S, BAIRD R, ROSENFELD N. *Nat. Rev. Cancer*, 2017, 17(4): 223-238.
- [8] DIEHL F, SCHMIDT K, CHOTI M A, ROMANS K, GOODMAN S, LI M, THORNTON K, AGRAWAL N, SOKOLL L, SZABO S A, KINZLER K W, VOGELSTEIN B, DIAZ JR L A. *Nat. Med.*, 2008, 14(9): 985-990.
- [9] FREIDIN M B, FREYDINA D V, LEUNG M, MONTERO FERNANDEZ A, NICHOLSON A G, LIM E. *Clin. Chem.*, 2015, 61(10): 1299-1304.
- [10] STAHLBERG A, KRZYZANOWSKI P M, JACKSON J B, EGYUD M, STEIN L, GODFREY T E. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44: e105.
- [11] DAS J, IVANOV I, MONTERMINI L, RAK J, SARGENT E H, KELLEY S O. *Nat. Chem.*, 2015, 7(7): 569-575.
- [12] TEENGAM P, SIANGPROH W, TUANTRANONT A, VILAIVAN T, CHAILAPAKUL O, HENRY C S. *Anal. Chem.*, 2017, 89(10): 5428-5435.
- [13] NOH S, HA D T, YANG H, KIM M S. *Analyst*, 2015, 140(12): 3947-3952.
- [14] FAURE G, SHMAKOV S A, YAN W X, CHENG D R, SCOTT D A, PETERS J E, MAKAROVA K S, KOONIN E V. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019, 17(8): 513-525.
- [15] YAN W X, HUNNEWELL P, ALFONSE L E, CARTE J M, KESTON-SMITH E, SOTHISELVAM S, GARRITY A J, CHONG S, MAKAROVA K S, KOONIN E V, CHENG D R, SCOTT D A. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91.
- [16] QIAO J, LIN S, SUN W, MA L, LIU Y. *Chem. Commun.*, 2020, 56(83): 12616-12619.
- [17] KLEINSTIVER B P, SOUSA A A, WALTON R T, TAK Y E, HSU J Y, CLEMENT K, WELCH M M, HORNG J E, MALAGON-LOPEZ J, SCARFÒ I, MAUS M V, PINELLO L, ARYEE M J, JOUNG J K. *Nat. Biotechnol.*, 2019, 37(3): 276-282.
- [18] STELLA S, MESA P, THOMSEN J, PAUL B, ALCÓN P, JENSEN S B, SALIGRAM B, MOSES M E, HATZAKIS N S, MONTOYA G. *Cell*, 2018, 175(7): 1856-1871.e21.
- [19] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, DA COSTA M, TIAN X, PALEFSKY J M, DOUDNA J A. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [20] ZHANG G, ZHANG L, TONG J, ZHAO X, REN J. *Microchem. J.*, 2020, 158: 105239.
- [21] XIONG Y, ZHANG J, YANG Z, MOU Q, MA Y, XIONG Y, LU Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, 142(1): 207-213.
- [22] ZHANG H, ZHOU Y, LUO D, LIU J, YANG E, YANG G, FENG G, CHEN Q, WU L. *RSC Adv.*, 2021, 11(9): 4983-4990.
- [23] YING Z M, WU Z, TU B, TAN W, JIANG J H. *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139(29): 9779-9782.
- [24] PENG L, ZHOU J, YIN L, MAN S, MA L. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1125: 162-168.
- [25] LI S Y, CHENG Q X, LIU J K, NIE X Q, ZHAO G P, WANG J. *Cell Res.*, 2018, 28(4): 491-493.
- [26] LI X, ZHANG D, GAN X, LIU P, ZHENG Q, YANG T, TIAN G, DING S, YAN Y. *ACS Synth. Biol.*, 2021, 10(6): 1481-1489.
- [27] LOO A H, SOFER Z, BOUSA D, ULBRICH P, BONANNI A, PUMERA M. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8(3): 1951-1957.
- [28] UYGUN Z O, YENIAY L, GIRGIN SAĞIN F. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1121: 35-41.
- [29] SOARES J C, SOARES A C, RODRIGUES V C, MELENDEZ M E, SANTOS A C, FARIA E F, REIS R M, CARVALHO A L, OLIVEIRA O N. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, 11(50): 46645-46650.
- [30] CHANG H, ZHANG Y, YANG F, WANG C, DONG H. *Front. Chem.*, 2018, 6: 530.

- [31] WANG J, HUA G, LI L, LI D, WANG F, WU J, YE Z, ZHOU X, YE S, YANG J, ZHANG X, REN L. *Analyst*, 2020, 145(16): 5553-5562.
- [32] WANG Y, KONG S L, SU X D. *RSC Adv.*, 2020, 10(3): 1476-1483.
- [33] LIU G, MA X, TANG Y, MIAO P. *Analyst*, 2020, 145(4): 1174-1178.

CRISPR/Cas12a Fluorescence Sensor Based on Molecular Beacon for Amplification Detection of Circular Tumor DNA

ZHANG Han-Xiao, DAI Xiao-Chun, ZHOU Ya-Nan, LYU Xu-Zhen, GONG Tao,
ZHAO Xu-Hua^{*}, YU Bao-Feng^{*}

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract A CRISPR/Cas12a-based biosensor using molecular beacon (MB) as the reporter was constructed for amplification detection of circular tumor DNA (ctDNA). The molecular beacon with good stability was labeled with FAM and TAMRA at its ends, respectively. In the absence of ctDNA, the CRISPR/Cas12a system was inactive and MB could not be cleaved. Therefore, two fluorophores were in close proximity to each other, resulting in fluorescence resonance energy transfer (FRET). In the presence of ctDNA, it could recognize the Cas12a/crRNA complex and activate the trans-cleavage activity of Cas12a. Because ssDNA was the most susceptible substrate of Cas12a, the loop of MB was rapidly cleaved first. After cleavage, two fluorophores were far from each other, leading to the disappearance of FRET phenomenon and an obvious fluorescent enhancement of FAM. The experimental conditions such as the base numbers of the hairpin loop, the concentration of MB, and the concentration ratio of crRNA to Cas12a were optimized. Under the optimal conditions, a linear relationship ranging from 1.7 pmol/L to 500 pmol/L for ctDNA quantitative detection was observed and its detection limit was 600 fmol/L. In addition, this sensor could be used to detect ctDNA in serum samples and the recoveries were in the range of 93%–110%.

Keywords CRISPR; Biosensor; Fluorescence resonance energy transfer; Circular tumor DNA

(Received 2022-04-26; accepted 2022-12-01)

Supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province, China (Nos. 202103021224240, 201901D211317, 201901D111190), the Open Fund from Key Laboratory of Cellular Physiology (Shanxi Medical University), Ministry of Education, China (No. KLMEC/SXMU-202011) and the Shanxi “1331 Project” Key Subjects Construction (No. 1331KSC).