

基于 CRISPR/Cas 系统的核酸即时检测技术现状及研究进展

冯 柳, 唱 凯, 陈 鸣

(陆军军医大学第一附属医院检验科, 重庆 400038)

【摘要】在全球疫情背景下, 现场条件下的核酸检测在疫情防控中发挥越来越重要的作用, 这促使核酸即时检测(point-of-care testing, POCT)工具的开发面临空前的需求。基于规律间隔成簇短回文重复序列及其相关蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated nuclease, CRISPR/Cas)应用于核酸POCT在近年来得到飞速发展并取得良好成果。在疫情封控区、海关以及灾区等特殊现场, 可以将恒温放大技术与CRISPR有机结合并集成到小型手持设备中, 这些技术使用起来更简单, 非专业人员能够更快捷准确地进行感染源的核酸检测。这篇综述首先简要介绍了CRISPR/Cas系统和不同的效应蛋白, 回顾了基于CRISPR/Cas系统特异识别和切割特性在核酸POCT中的不同应用策略, 最后讨论CRISPR/Cas用于核酸POCT面临的挑战及未来的研究前景。

【关键词】CRISPR/Cas; 即时检测; 核酸

【中图分类号】R446.19

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-06-18

Current status and progress of nucleic acid point-of-care testing technology based on CRISPR/Cas system

Feng Liu, Chang Kai, Chen Ming

(Department of Clinical Laboratory, The Southwest Hospital of Army Medical University)

【Abstract】In the context of the global epidemic, nucleic acid detection under on-site conditions plays a more and more important role in epidemic prevention and control, which makes the development of nucleic acid point-of-care testing(POCT) tools facing unprecedented demand. The application of clustered regularly interspaced palindromic repeats-associated nuclease(CRISPR/Cas) to nucleic acid POCT has been developed rapidly and achieved good results in recent years. In the epidemic control areas, customs and disaster areas and other special sites, combining isothermal amplification techniques with CRISPR and being integrated into small handheld devices, these technologies are easier to use and non-professionals can quickly and accurately detect the nucleic acid source of infection. This review first briefly introduces the CRISPR/Cas system and different effector proteins, reviews the different application strategies in nucleic acid POCT based on the specific recognition and cleavage characteristics of CRISPR/Cas system, and finally discusses the challenges and future research prospects of CRISPR/Cas in nucleic acid POCT.

【Key words】clustered regularly interspaced palindromic repeats-associated nuclease; point-of-care testing; nucleic acid

作者介绍:冯 柳, Email:275290568@qq.com,

研究方向:生物传感的临床检验新技术。

通信作者:陈 鸣, 主任医师、教授、博士生导师, 长期从事生物传感器、纳米科技研究。主持国家自然科学基金重点项目、国家863项目等15项, 获国家科技进步二等奖2项、重庆市技术发明一等奖1项、军队科技进步二等奖5项。以第一或通信作者在*N Engl J Med*等杂志发表SCI论文42篇。获首批重庆市医学领军人才、重庆市学术技术带头人、陆军科技英才等荣誉。Email:chming1971@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:82030066、82122042、81972027); 军队青年培育资助项目(编号:20QNPY010)。

优先出版:[\(2022-09-01\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.1155.034.html)

2022年6月,中国疾病预防控制中心和国家卫生健康委办公厅先后印发了猴痘防控技术指南(2022版)和猴痘诊疗指南(2022年版)。自2022年5月以来,世界多个非流行国家报告了社区传播猴痘病例。与此同时,不断变异的COVID-19持续暴发,加之全球范围抗生素耐药性问题日益严重,凸显了传染病早期检测对患者及时治疗和控制传播风险的重要性。核酸检测作为传染病诊断的关键方式,开发能够在采样现场即刻进行核酸分析的即时检测(point-of-care testing, POCT)设备变得更为迫切^[1-4]。

基于规律间隔成簇短回文重复序列及其相关蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated nuclease, CRISPR/Cas)是一种以病原体的基因组为目标的原核适应性免疫系统, CRISPR/Cas系统能够识别

特定核苷酸序列能力并具有附属核酸切割活性,2016 年前后张锋团队先后报道了以 RNA 为向导的 Cas12a、Cas13a 之后^[5-6],2017 年该团队将 CRISPR/Cas 应用于生物传感开发出 SHERLOCK 检测平台,依赖 Cas13 靶结合后反式切割含猝灭荧光的核酸释放荧光信号,将原始目标序列的浓度放大至 10 000 倍^[7]。近年来,Cas9、Cas12、Cas13 和 Cas14 等多种效应蛋白已被证明可检测低至 Zeptomolar 浓度和单核苷酸分辨率的核酸传感,促使 CRISPR/Cas 系统在核酸 POCT 中展现出极大的应用前景^[3,7-23](图 1)。本研究将介绍分子诊断中常用的 CRISPR/Cas 系统,回顾其在核酸 POCT 中的不同应用策略,讨论 CRISPR/Cas 在核酸 POCT 发展中的挑战并描述未来的研究前景。

1 用于分子诊断的 CRISPR/Cas 系统

古细菌和细菌 CRISPR/Cas 自然防御系统在结构和作用

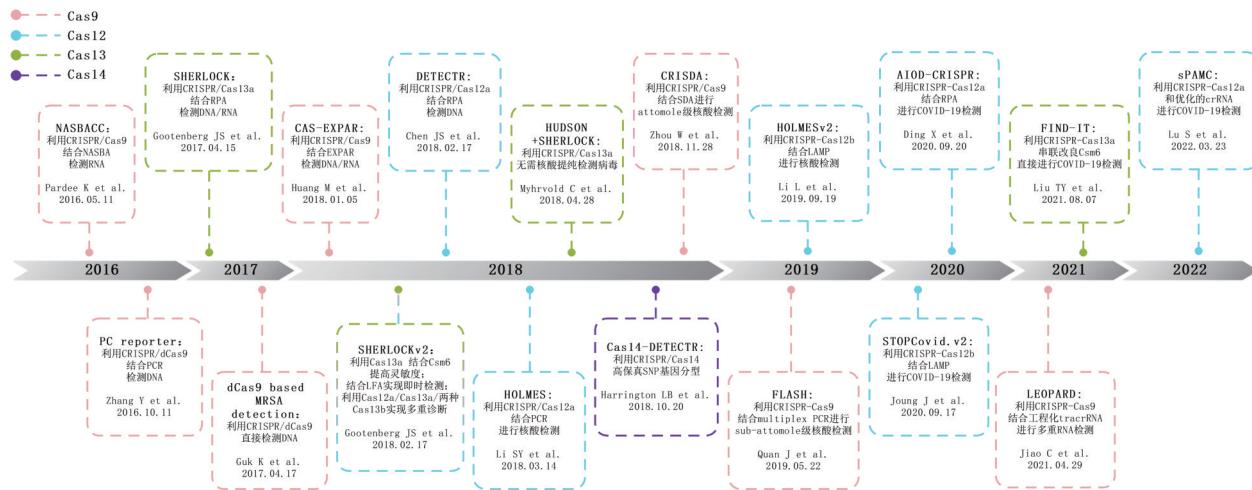


图 1 CRISPR/Cas 系统应用于 POCT 的发展时间线(基于电子出版发布日期)

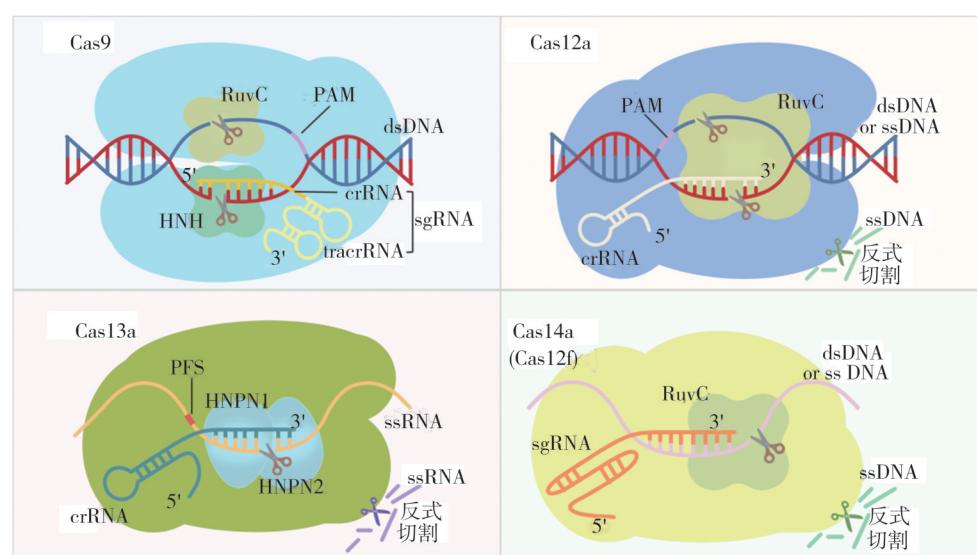


图 2 CRISPR-Cas9、-Cas12a、-Cas12f 和 -Cas13a 系统的基本组成部分

机制上表现出广泛的多样性,并且仍在报道新的变体。2020 年 Makarova KS 等^[24]根据系统发育关系提出并改进了目前公认的 CRISPR/Cas 系统分类。CRISPR/Cas 的 1 类系统包含多种 Cas 蛋白组成的效应复合物,包括 I、III 和 IV 型,其中每种蛋白在 CRISPR 过程中发挥单一功能。相比之下,2 类系统是以蛋白质组成的复合体发挥多种功能,更加简单高效^[25]。本次综述的重点将放在最常用于生物工程和分子诊断的 2 类 CRISPR/Cas 系统上(图 2,表 1)。

第 2 类 CRISPR/Cas 系统的特征是一个单一的多结构域蛋白,与 RNA 序列结合形成一个核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物,这个 RNA 序列被称为向导 RNA(guide RNA, gRNA)。gRNA 由称为 crRNA 的可定制组件以及一个包含二级结构的非编码 RNA 部分组成,crRNA 定义了对目标 DNA 的特异性和选择性,非编码部分通过特有结构促进 gRNA 和效应蛋白之间的关联。gRNA 扫描核酸并靶向与其 crRNA 互补序列进行酶促降解。2 类系统在 CRISPR 传感中

表 1 4 种 Cas 蛋白主要结构特征

结构特征	Cas9	Cas12a	Cas13a	Cas14
间隔区长度	~30 nt	18~25 nt	22~30 nt	20~40 nt
核酸酶域	HNH、RuvC	RuvC	HEPN	RuvC
向导 RNA	sgRNA	crRNA	crRNA	sgRNA
PAM/PFS 区域	PAM 3' 富含 GC	PAM 5' 富含 T	3'PFS	5'T 或 PAM 富含 C
靶标形式	dsDNA	dsDNA; ssDNA	ssRNA	dsDNA; ssDNA
靶向切割	平头末端	黏性末端 5' 悬垂	尿嘧啶位点	黏性末端 5' 悬垂
反式切割	无	非特异 ssDNA	非特异 ssRNA	非特异 ssDNA

常用的 3 种类型: II 型、V 型和 VI 型。

2 类 II 型系统能够靶向双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA), 典型效应蛋白是 Cas9。CRISPR 序列和反式激活的 CRISPR/CasRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 被转录后产生 pre-crRNA 和 tracrRNA, 这 2 种 RNA 通过互补序列形成双链向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)。Cas9-sgRNA 复合物搜索靶序列下游的 protospacer 相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 与间隔序列匹配的 DNA 序列发生结合, 随后切割 PAM 位点上游 3 nt 位置的 DNA。PAM 序列取决于 Cas 效应蛋白的类型及其来源的物种, 如果 PAM 区域和 Cas9 的类型不匹配, 可能会发生非特异性 DNA 切割, 目前 CRISPR/Cas9 实验中运用最广泛的核酸酶是来自化脓性链球菌的 spCas9^[26~28]。

2 类 V 型效应蛋白发挥 2 种酶促切割反应, 一种是与 Cas9 相似的靶序列切割, 另一种是在原型间隔区靶识别时激活非靶向侧链切割单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)^[16,24]。V 型效应蛋白包括 Cas12 和 Cas14, Cas12 对 dsDNA 具有更高的特异性, 而 Cas14 对 ssDNA 具有更高的特异性。Cas12a 和 Cas12b 是 CRISPR 核酸检测技术中常用的 Cas12 亚型, 二者都能识别和切割 dsDNA 中 PAM 位点附近的靶序列, Cas12a 可以介导其自身 crRNA 的成熟从而不需要 tracrRNA 和额外的核酸酶来处理 crRNA^[29~30]。2018 年 Jennifer 团队发现隶属于 V-F 型 CRISPR 系统的 Cas14 核酸酶能够不依赖 PAM 序列进行单链 DNA 的靶向切割^[16]。Cas14a 显示出对只有 1 个核苷酸差异的 ssDNA 序列的识别, 这使 Cas14a 具有检测无 PAM 序列要求的 ssDNA SNP 的可能性^[16]。2020 年 Makarova KS 等^[24]在对 Cas 系统的总结中将 Cas14 核酸酶和其他 V-F 效应因子归类并系统命名为 Cas12f 核酸酶。

2 类 VI 型 CRISPR/Cas 目前主要是 Cas13 家族, 该效应器包含 2 个负责切割单链 RNA (single-strand RNA, ssRNA) 靶序列的催化结构域 HNPN, 核酸检测技术中常用的 Cas13 家族亚型是 Cas13a 和 Cas13b, 其中 Cas13b 被认为在细胞工程中更加稳健和稳定^[31]。当复合物结合靶向 ssRNA 并且在 crRNA 结合位点识别前间隔侧翼序列 (protospacer flanking sequence, PFS) 时, Cas13 的核溶解活性被触发^[32]。该 PFS 区域相当于 Cas9 中用于 RNA 靶识别的 PAM 序列, 并且在 CRISPR/Cas13 的多个亚型之间变化, 从而实现不同的核酸靶向^[27]。Cas13 与 V 型效应蛋白类似, 在目标识别时可以进

行 2 种酶促切割反应:除了针对可编程目标序列的酶切, 还会对附近 RNA 序列非特异性切割^[32~33]。

2 核酸 POCT 中的 CRISPR/Cas 检测策略

2.1 先靶核酸扩增再利用 CRISPR/Cas 反式切割的检测策略

在核酸扩增后, 集成具有反式切割活性的 CRISPR/Cas 系统, 其识别特定核酸序列继而激活反式切割活性, 如同颗粒碎纸机般反复随机切割核酸, 产生放大的读出信号。在提高灵敏度的同时, 产生的不同报告信号可以扩大适用范围。

Cas13 是 RNA 引导的 RNA 核酸内切酶, 特异性切割 ssRNA 后, 继续保持活性并切割其他非靶标 RNA。张峰团队开发的特异的高灵敏度酶报告因子解锁版本 SHERLOCK 检测平台, 将靶核酸经通过 RPA 等温扩增, 并引入 T7 启动子序列, 通过 T7 聚合酶转录成 ssRNA, 扩增的 ssRNA 与 Cas13a-crRNA 结合, 激活 Cas13a 核酸酶活性, 切割 ssRNA 荧光探针, 释放荧光基团被测^[7](图 3A)。在此基础上通过对 CRISPR 酶学和应用开发升级到 SHERLOCKv2, 该系统可以同时检测多达 4 种病毒^[12]。Cas13 切割产物可激活另一种 Cas 蛋白辅助性酶 Csm6。被活化的 Csm6 裂解的第 2 个 ssRNA 构建体, 相对于背景增强了信号并且改善了 SHERLOCKv2 反应的动力学, 使信号灵敏度提高 3.5 倍(图 3B)。该团队发现 Cas13 变体的一个子集(LwaCas13a、PsmCas13b、CcaCas13b、AsCas12a)存在靶向相互排斥的序列, 并为每种蛋白质设计特定的报道基因, 开发了 4 通道单反应复合平台(图 3C)。最后该团队将所有这些进展与简便的 POCT 结合, 将一滴样品应用于侧流分析试纸可视化检测, 给出比色读数(图 3D)。SHERLOCKv2 定量测量输入降至 2 aM, 展示了其作为核酸 POCT 的多通路、便携、快速和定量的优势。Myhrvold C 等^[15]将加热未提取的诊断样本以消除核酸酶即 HUDSON 法与 SHERLOCK 结合, 可以检测临床样品中没有提取和纯化病毒核酸, 检测浓度低至 1 拷贝/ μ L, 能够直接检测患者尿液和唾液样本中的寨卡病毒和登革热病毒。2021 年 Liu TY 等^[23]设计了串联快速集成核酸酶检测平台 FIND-IT。该系统利用 Csm6 来放大 Cas13 的效果, 并通过添加一种稳定免受降解的化学修饰激活剂, 改良了 Csm6 因迅速分解激活剂分子而限制荧光信号产生数量的问题, 由此灵敏度比使用原始活化剂提高 100 倍。该团队整合了优化的导向 RNA 组合, 使 Cas13 与 Csm6 及其改良激活剂结合使用时, 20 min 内检测到低至 31 拷贝/ μ L 的 SARS-CoV-2 RNA。

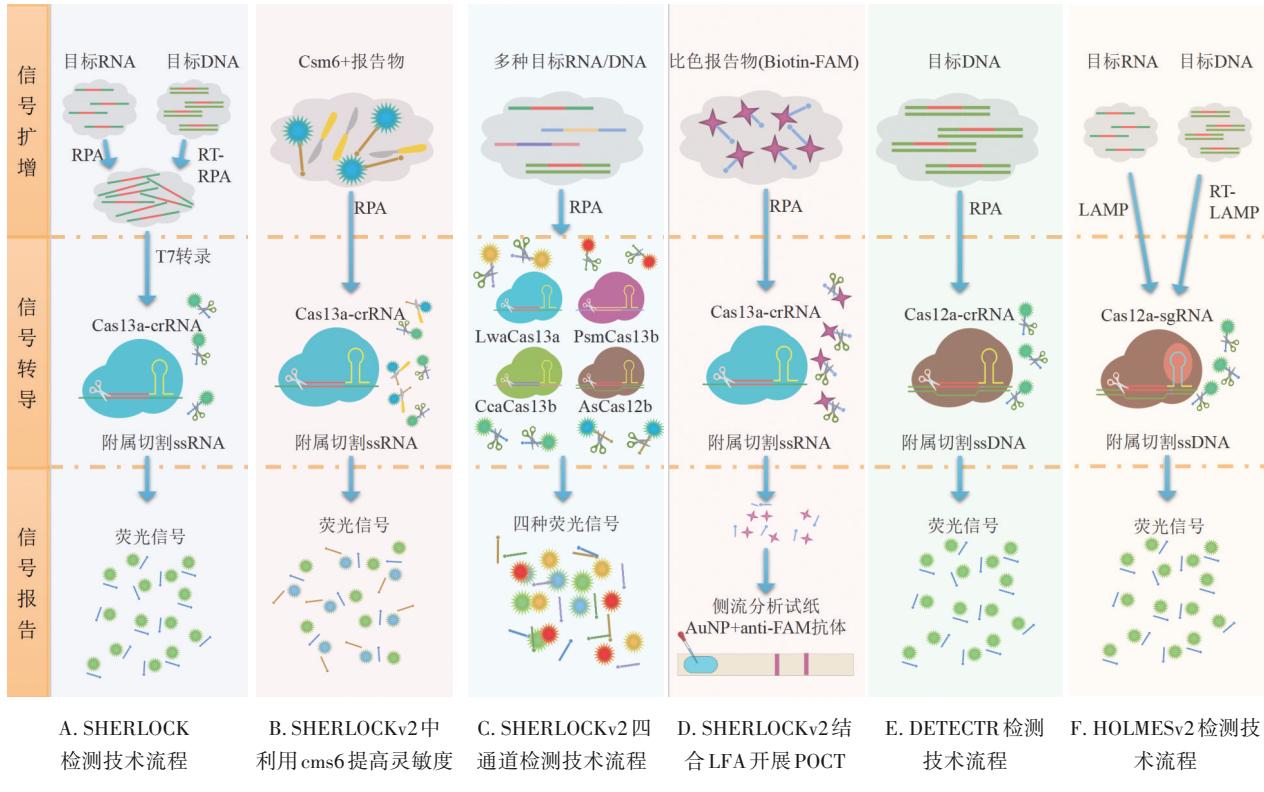


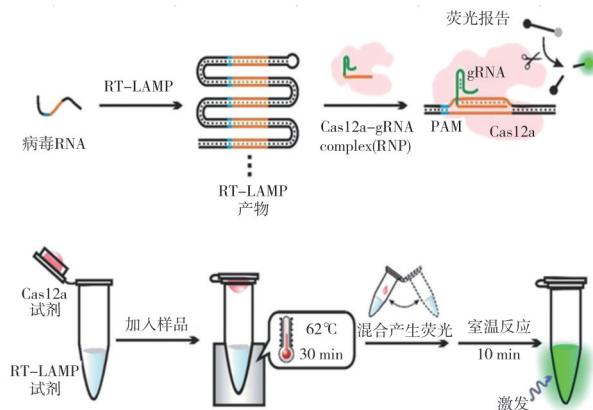
图3先靶核酸扩增再利用CRISPR/Cas反式切割的检测策略的典型技术流程示意图

Cas12在crRNA引导下即可识别靶标dsDNA，并靶向富含T的PAM位点，对靶序列进行特异性切割，同时附带非特异性切割ssDNA的活性。RPA结合Cas12a的检测平台，称为DNA核酸内切酶靶向CRISPR Trans Reporter(DETECTR)，该策略与SHERLOCK类似用Cas12a代替Cas13a，由于Cas12以DNA为目标，因此可以直接检测DNA扩增物，无需额外的转录便可识别从患者样本中提取的病毒DNA^[13]。RPA和CRISPR/Cas12的温度兼容性使得这2个过程都可以进行放置在同一个反应管中，适用于POCT(图3E)。一种称为一小时低成本多用途高效系统(HOLMES)的技术将DETECTR中Cas13a更换为Cas12a，由于Cas12的ssDNA激活不依赖于PAM，因此使用不对称PCR来生成ssDNA扩增产物以避免需要PAM。ssDNA和dsDNA扩增产物启动Cas12a的反式切割活性进行检测。在PCR期间的变性温度(95℃)下CRISPR/Cas12a是无活性，因此HOLMES扩增和检测步骤必须分开进行不适用于POCT。进一步升级的HOLMESv2由于LAMP的扩增产物是dsDNA，因此PAM序列是预先设计的引物引入的。LAMP和RT-LAMP的典型反应温度(60~65℃)可以被Cas12b(>40℃)耐受。因此将LAMP或RT-LAMP与CRISPR/Cas12b结合，可以在一个程序步骤中进行等温扩增和信号生成(图3F)。

Cas14作为一种RNA引导的靶向ssDNA核酸酶，该酶分子量更小，Cas14a(Cas12f)需要sgRNA的种子区域的完全互补性才能识别ssDNA底物。基于该酶特点，Harrington LB等^[16]将DETECTR技术使用的Cas12a更换为Cas14a，开发出了Cas14-DETECTR诊断技术。其反应原理是先将用于扩

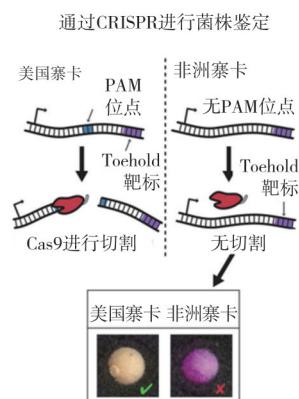
增富集靶核酸的其中一条引物进行硫代磷酸化(phosphothioate, PT)修饰，由此扩增产生的dsDNA经T7核酸外切酶作用，降解其中一条未被PT保护的DNA链形成ssDNA，从而激活Cas14a内切酶活性，非特异性切割ssDNA荧光探针生成信号。该技术能够区分与眼睛颜色相关的基因HERC2中的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。

SHERLOCK和DETECTR技术都只需要加热块或水浴、侧向流动装置、微量离心机和移液器，这些都是便携式的并且适合POCT。以POCT为导向改进的检测平台也不断研发，COVID-19的SHERLOCK筛查测试的改进一锅法测试称为STOPCovid，集成了样品处理、核酸扩增和检测^[20]。这种“一锅法”试验成功的关键是使用了新的Cas直系同源物AapCas12b，因为这种酶(来自嗜酸脂环酸杆菌)在RT-LAMP反应温度(60℃)下仍保持活性与RT-LAMP的温度条件良好兼容。Pang B等^[34]为了克服RT-LAMP和CRISPR/Cas12a试剂巧妙地放置在同一个PCR反应管中(图4)。当使用加热块将管底部RT-LAMP试剂加热到62℃时达到最佳反应温度，盖子上CRISPR/Cas12a的温度约为31℃。RT-LAMP扩增30 min后，将试管从加热块中取出。在室温下将试管倒置并轻弹以将扩增产物与CRISPR/Cas12a检测试剂混合，即刻产生荧光并在10 min内进行检测。对100份呼吸道拭子样本(SARS-CoV-2阳性和阴性数量相等)的RNA提取物的分析显示，临床特异度为100%，临床敏感度为94%。该测定法在单管中的集成简化了操作，并将检测过程中的交叉污染风险降至最低。

图 4 STOPCovid 反应流程图^[34]

2.2 先靶核酸扩增再利用 CRISPR/Cas 切割的检测策略

CRISPR/Cas 对特定序列的识别作为对预期序列被扩增和检测的基础。早在 2016 年 Pardee K 等^[8]就开发了 NASBA-CRISPR Cleavage(NASBACC)技术,将恒温扩增技术 NASBA、toehold 开关 RNA 传感器和 CRISPR/Cas9 系统进行结合实现了寨卡病毒的分型检测。检测原理如下:首先靶标 RNA 通过 NASBA 技术在引物的设计上,引入 T7 转录启动子和带有 toehold 开关触发的序列,扩增过程中美国 ZIKV 的 dsDNA 产物含有 PAM 区域和 gRNA 识别位点时,被 Cas9 切割成两段,含有 T7 转录启动子的序列经 T7 RNA 聚合酶转录出截短的 RNA,该短 RNA 由于缺乏传感器 H 触发序列,无法激活传感器 H 的 toehold 开关;而不含 PAM 序列的非洲 ZIKV 的 dsDNA,则可被 T7 RNA 聚合酶转录出含有传感器 H 触发序列的全长 RNA 产物,从而激活传感器 H;传感器 H 在被激活前,通过隔离核糖体结合位点(RBS)和起始密码子顺式阻断 LacZ 基因的翻译;当 toehold 开关与互补的触发 RNA 结合后,RBS 和起始密码子被释放,激活 LacZ 基因翻译表达 β -半乳糖苷酶,该酶可将黄色底物(氯酚红- β -D-吡喃半乳糖苷)转化为紫色产物(氯酚红),从而实现肉眼可见的颜色变化,在 PAM 区域有一个核苷酸差异的 2 个菌株被区分开来(图 5)。但是 NASBACC 中的 NASBA 技术反应时长在 90~120 min,需要变性步骤且在 120~250 bp 范围内的 RNA 扩增效率较低^[35],因此在已有与 CRISPR/Cas 相结合的 POCT 中应用较少。

图 5 NASBACC 法对寨卡病毒进行分型^[8]

2.3 先靶核酸扩增再利用 CRISPR/Cas 识别的检测策略

具有序列特异性结合且无切割活性的 CRISPR/dCas9 被用作识别探针,以从复杂样品中提取和分离感兴趣的核酸。Zhang YH 等^[9]开发了 Paired dCas9(PC)技术,该技术使用一对 dCas9 蛋白,分别融合荧光素酶的 2 个分离结构域(NFluc 和 CFLuc),并通过 2 个靶向相邻序列的 gRNA 实现检测。当存在靶标 DNA 时,2 个分别带有荧光素酶结构域的 dCas9 在 gRNA 的引导下结合到相邻的靶标序列上,荧光素酶的 2 个分离结构域相互靠近,形成有活性的荧光素酶,在 ATP 和氧气存在条件下,催化荧光素氧化生成氧化荧光素,并产生可检测的荧光信号。Uygun ZO 等^[36]利用 CRISPR/dCas9 系统和电化学阻抗谱(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)检测循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)。通过 CRISPR/dCas9 作为结合元件形成 dCas9 效应子、sgRNA 和靶序列的复合物,该复合物可以固定在氧化石墨烯丝网印刷电极特异性识别并与 ctDNA 结合,这种生物识别事件会产生表面电子转移电阻的变化,可以通过 EIS 测量,由此分析检测肿瘤相关突变(PIK3CA 外显子 9 突变),即使是单核苷酸错配,因其他 ctDNA 序列没有阻抗信号,该生物传感器亦显示出高特异性。该装置检测速度很快,耗时 40 s;但是它的灵敏度相对较差只有 0.65 nmol/L。

2.4 先利用 CRISPR/Cas 靶向切割再核酸扩增的检测策略

在 CRISPR/Cas 切割后进行核酸扩增的主要目的是去除丰富的干扰核酸,同时靶向富集稀有和低丰度的核酸靶标。Huang MQ 等^[11]开发了一种 CRISPR/Cas9 触发等温指数放大反应(CRISPR/Cas9 triggered isothermal exponential amplification reaction, CAS-EXPAR),是基于 CRISPR/Cas9 的切割反应和切口内切酶(nicking endonuclease, NEase)介导的核酸扩增反应,能够在 1 h 内检测到具有阿摩尔(attomole, aM)灵敏度和单碱基特异性的 DNA 靶标。该系统已针对扩增效率、灵敏度和特异性进行了优化,并成功验证了其检测 DNA 甲基化和单核细胞增生李斯特菌 hly mRNA 的能力。CAS-EXPAR 技术首先使 Cas9 与 sgRNA 结合形成复合物,并在定制的 PAM 序列协助下识别靶标序列,在特异位点 Cas9 切割生成目标片段 X;片段 X 可作为引物,与扩增模板结合(该扩增模板含有被 NEase 识别序列间隔开的 2 个与目标片段 X 互补的区域 X'),并在 DNA 聚合酶作用下,合成含有 NEase 识别位点的完整双链 DNA;NEase 通过识别酶切位点在双链 DNA 上引入切口,DNA 聚合酶在切口处再次延伸形成双链 DNA,并置换出目标片段;置换出的目标片段可作为引物,与另一个扩增模板结合启动 DNA 合成,从而形成循环扩增过程,生成大量双链 DNA 产物,可用荧光染料进行检测。

CRISPR/Cas9 触发的缺口内切酶介导的链位移扩增方法(即 CRISDA 技术)利用 CRISPR 效应子的高灵敏度/特异性和独特的构象重排来识别目标 DNA,从而替代指数链置换扩增(E-SDA)等技术中的加热步骤^[17]。一对被编程 nCas9 蛋白展开并切开感兴趣的 dsDNA 区域的末端,聚合酶在 ssDNA 结合蛋白(Single-stranded DNA-binding protein, SSB)的帮助下延伸引物以稳定未缠绕的 DNA,新形成的链在被核酸内切酶切割后释放,促进了指数扩增。结合多肽核酸

(peptide nucleic acid, PNA) 入侵介导的端点测量, 该方法在复杂样本背景下检测各种 DNA 靶点时表现出了 aM 敏感性和单核苷酸特异性。CRISDA 反应温度只需 37℃ 是一种具有潜力的核酸 POCT 检测设备。

CRISPR/Cas9 被用于靶向和切割感兴趣的序列, 从而产生更短的寡核苷酸, 以便随后通过扩增进行富集。这种通过杂交寻找低丰度序列的技术已被用于富集下一代测序的目标片段^[18]。

3 CRISPR/Cas 用于核酸 POCT 总结与展望

CRISPR/Cas 应用于核酸 POCT 的时间虽不到十年, 但为发展多样化的分析技术和分析提供了新的机遇。如何快捷有效地实现目标放大以降低 LOD, 是 CRISPR/Cas 应用于核酸 POCT 策略时的重要可改进环节, 等温扩增的工作温度应与 RNP 复合物的工作温度在同一范围内。不同的效应蛋白具有不同的最适温度。例如, Cas12a 的活性最佳温度约为 28℃, Cas12b 为 48℃。在 HOLMESv2 中利用 Cas12b 的高温耐受性, 其中 LAMP 和 CRISPR 传感都被纳入 55℃ 的一锅反应中^[19]。现有最常与 CRISPR 传感组合的等温扩增方法是 RPA 和 LAMP, 他们扩增时间短 (LAMP 为 15~60 min, RPA 为 5~60 min, 具体取决于初始核苷酸浓度), 这对于 POCT 应用非常友好。RPA 与 LAMP 相比, RPA 的一个主要优势是它在扩增过程中需要更低的温度, 甚至可在室温下使用 (RPA 为 37~42℃; LAMP 为 -65℃)。然而, 较低的操作温度也有缺点, 例如非特异性扩增产物和引物二聚体的形成^[35]。通过引入对其目标序列具有高度特异性的 CRISPR 复合物, 这些不需要的产物不会干扰传感过程, 从而不会影响最终结果。Yin K 等^[37]开发了一种用于分离目标扩增和 CRISPR 反应的替代方法。开发了一种利用蔗糖浓度的密度差异建立的动态水性多相反应 (dynamic aqueous multiphase reaction, DAMR) 系统, 通过相分离, 建立了两相体系, 在高密度底层 RPA 反应开始, 扩增的核苷酸可以扩散到低密度的顶相, Cas12a-RNP 可以补充并启动淬火荧光探针序列的侧链切割活性。这种多相混溶系统不相容但相关的反应结合在一起, 实现一锅定量分子检测。除此之外, 部分研究者将尝试无核酸扩增直接将 CRISPR/Cas 系统与石墨烯、cms6 有机结合, 提高了核酸 POCT 的效率, 但是上述方法因未对靶核酸进行扩增, 因此灵敏度有待进一步提升^[20,36,38]。

CRISPR/Cas 应用于核酸 POCT 仍面临着很多挑战。序列的限制使 CRISPR/Cas 效应蛋白可以检测到的序列是有限的, 这是 CRISPR 感知中的一个普遍问题。需要仔细选择目标序列上的效应蛋白和感应区域, 以避免非特异性背景信号。结果标准化问题是所有 POCT 设备所面临的共同问题, 不仅结果的判读标准要标准化, 为了确保每个用户都能在相同测试条件下获得准确结果, 操作程序和个体判读都必须标准化, 温湿度、酸碱度等影响条件的保证都需要与设备的便携性找到平衡点。其次是定量分析问题。对于核酸检测, 定量尤为重要。如果没有现场校准, 结果的量化很难建立, 已有的 CRISPR/Cas 应用于核酸 POCT 技术大多只能做到定性。

为了解决这些问题, CRISPR 技术不断被整合到各种传统或新型检测方法中, 如电化学检测、横向流动分析、纳米材料传感器、微流体、水凝胶等。

基于 CRISPR/Cas 的检测技术实现前景广阔, 但仍处于早期阶段。随着基因组学的发展, 更多的 CRISPR 系统被挖掘发现, 探索其未知的功能将继续为核酸 POCT 分析应用带来巨大变革。随着材料学及交叉科学的迅速发展, CRISPR/Cas 应用于核酸 POCT 所存在的诸多问题会被不同策略的优化组合所解决, 从而在现场快速核酸检测方面做出卓越贡献。

参 考 文 献

- [1] Yesudhas D, Srivastava A, Gromiha MM. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics[J]. Infection, 2021, 49(2): 199–213.
- [2] Kozlov M. Monkeypox goes global: why scientists are on alert[J]. Nature, 2022, 606(7912): 15–16.
- [3] Lu SH, Tong XH, Han Y, et al. Fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using suboptimal protospacer adjacent motifs for Cas12a[J]. Nat Biomed Eng, 2022, 6(3): 286–297.
- [4] Xiong EH, Jiang L, Tian T, et al. Simultaneous dual-gene diagnosis of SARS-CoV-2 based on CRISPR/Cas9-mediated lateral flow assay [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2021, 60(10): 5307–5315.
- [5] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759–771.
- [6] Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-cas systems[J]. Mol Cell, 2015, 60(3): 385–397.
- [7] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356 (6336) : 438–442.
- [8] 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.
- [9] Zhang YH, Qian L, Wei WJ, 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.
- [10] 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.
- [11] Huang MQ, Zhou XM, Wang HY, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection[J]. Anal Chem, 2018, 90 (3): 2193–2200.
- [12] 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.
- [13] Chen JS, Ma EB, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target

- binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387):436–439.
- [14] Li SY, Cheng QX, Liu JK, et al. CRISPR–Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. *Cell Res*, 2018, 28(4):491–493.
- [15] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR–Cas13[J]. *Science*, 2018, 360 (6387) : 444–448.
- [16] Harrington LB, Burstein D, Chen JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR–Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362 (6416):839–842.
- [17] Zhou WH, Hu L, Ying LM, et al. A CRISPR – Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection[J]. *Nat Commun*, 2018, 9:5012.
- [18] Quan J, Langlier C, Kuchta A, et al. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(14):e83.
- [19] Li LX, Li SY, 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.
- [20] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (15) : 1492–1494.
- [21] Ding X, Yin K, Li ZY, et al. Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR–Cas12a assay[J]. *Nat Commun*, 2020, 11:4711.
- [22] Jiao CL, Sharma S, Dugar G, et al. Noncanonical crRNAs derived from host transcripts enable multiplexable RNA detection by Cas9[J]. *Science*, 2021, 372(6545):941–948.
- [23] Liu TY, Knott GJ, Smock DCJ, et al. Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases[J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17 (9) : 982–988.
- [24] Makarova KS, Wolf YI, Irañzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR – Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(2):67–83.
- [25] Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: class 2 CRISPR–cas systems[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2):328–328. e1.
- [26] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10):957–963.
- [27] Murugan K, Babu K, Sundaresan R, et al. The revolution continues: newly discovered systems expand the CRISPR–cas toolkit[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(1):15–25.
- [28] Jinek M, Jiang FG, Taylor DW, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation[J]. *Science*, 2014, 343(6176):1247997.
- [29] Yang H, Gao P, Rajashankar KR, et al. PAM-dependent target DNA recognition and cleavage by C2c1 CRISPR–cas endonuclease[J]. *Cell*, 2016, 167(7):1814–1828. e12.
- [30] Ghorbani A, Hadifar S, Salari R, et al. A short overview of CRISPR–Cas technology and its application in viral disease control[J]. *Transgenic Res*, 2021, 30(3):221–238.
- [31] Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI–D CRISPR effectors[J]. *Cell*, 2018, 173 (3):665–676. e14.
- [32] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR–cas13[J]. *Nature*, 2017, 550(7675):280–284.
- [33] 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.
- [34] Pang B, Xu JY, Liu YM, et al. Isothermal amplification and ambient visualization in a single tube for the detection of SARS-CoV-2 using loop-mediated amplification and CRISPR technology[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(24):16204–16212.
- [35] Zaghloul H, El-Shahat M. Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis[J]. *World J Hepatol*, 2014, 6(12):916–922.
- [36] Uygun ZO, Yeniyay L, Gürgün Sağın F. CRISPR–dCas9 powered impedimetric biosensor for label-free detection of circulating tumor DNAs[J]. *Anal Chimica Acta*, 2020, 1121:35–41.
- [37] 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.
- [38] Bruch R, Baaske J, Chatelle C, et al. CRISPR/Cas13a-powered electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid amplification-free miRNA diagnostics[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(51):e1905311.

(责任编辑:唐秋姗)