

血“战”到底

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003081

基于 CRISPR-Cas12a 系统反式切割活性的 凝血酶检测技术研究

涂 伟¹, 刘芸悠², 赵贤贤¹, 邓文平¹, 黄 廷¹, 张 洪³, 罗 阳⁴

(1. 重庆大学附属涪陵医院医学检验科, 重庆 408000; 2. 陆军军医大学附属西南医院医学检验科, 重庆 400000;

3. 山东大学第二医院检验医学中心, 济南 250000; 4. 重庆大学医学院智慧检验与分子医学中心, 重庆 400000)

【摘要】目的:通过构建快速、灵敏的凝血酶检测技术,为多种血管栓塞性疾病,如脑静脉窦血栓形成(cerebral venous sinus thrombosis, CVST)的早期诊断和治疗提供新的策略。**方法:**利用所筛选的高特异性凝血酶适配体设计发夹结构变构探针,用于高特异性识别凝血酶并将凝血酶信号转化为核酸信号。在变构探针识别凝血酶后,适配体结合凝血酶引发变构探针变构,暴露 Cas12a 活性部分。CRISPR-Cas12a 系统识别活性部分后,其反式切割特性被触发,开始无序切割周围存在的单链 DNA 荧光探针,导致标记在荧光探针两端的荧光基团(Cy3)和淬灭基团(BHQ)分离,使处于被淬灭状态的 Cy3 荧光重新出现。所产生的荧光信号的强度与体系中存在的凝血酶浓度呈正相关。**结果:**通过荧光实验证实所设计的变构探针对于凝血酶表现出极高的识别特异性和稳定性;在所优化的实验条件下,该方法表现出良好的检测性能,检测限为 0.23 pmol/L。**结论:**该方法结合了高灵敏度、低成本和良好的便携性等优点,为凝血酶相关疾病的检测与精准诊断提供了强有力的技术支持。

【关键词】CRISPR-Cas12a; 凝血酶; 脑静脉窦血栓形成

【中图分类号】R331

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-06-12

Study on thrombin detection technology based on trans-cleavage activity of CRISPR-Cas12a system

Tu Wei¹, Liu Yunyou², Zhao Xianxian¹, Deng Wenping¹, Huang Ting¹, Zhang Hong³, Luo Yang⁴

(1. Department of Medical Laboratory Science, Chongqing University Fuling Hospital; 2. Department of Medical Laboratory Science, The Southwest Hospital of Army Medical University; 3. Laboratory Medicine Center, The Second Hospital of Shandong University; 4. Center for Intelligence Testing and Molecular Medicine, School of Medicine, Chongqing University)

【Abstract】Objective: To provide new strategies for the early diagnosis and treatment of a variety of vascular embolic diseases, like cerebral venous sinus thrombosis (CVST), by constructing a rapid and sensitive thrombin detection technology. **Methods:** The screened aptamer, which could recognize thrombin with high specificity, was used to construct the allosteric probe and to convert the thrombin signal into a nucleic acid signal. After the allosteric probe recognized thrombin, aptamer section in allosteric probe bound to thrombin, exposing the Cas12a active moiety. CRISPR-Cas12a system subsequently recognized the active moiety, and then activated its trans-

作者介绍:涂 伟, Email: 374118130@qq.com,
研究方向: 检验指标的应用价值研究。

通信作者:罗 阳, Email: luoy@cqu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号: 82125022、82072383、81871733); 重庆市川渝联合实施重点研发资助项目(编号: CSTC2020JSCX-CYLHX0001); 四川省重点研发资助项目(编号: 22ZDYF0318); 重庆市自然科学基金重点资助项目(编号: CSTC2020JCYJ-ZDXMX0006); 重庆市教委重点自然科学基金资助项目(编号: KJZD-M202000101); 重庆市教委研究生导师团队资助项目(编号: YDSTD1924)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.1154.022.html>
(2022-08-31)

cleavage property to cleave the surrounding single-stranded DNA fluorescent probes disorderly, resulting in separation of a fluorescent group (Cy3) and a quenching group (BHQ) which were originally labeled at both ends of the fluorescent probe. As a result, fluorescence signal of Cy3 reappeared. The intensity of the generated fluorescent signal was positively correlated with the concentration of thrombin present in the system. **Results:** The fluorescence experiment confirmed that the designed allosteric probe showed high recognition specificity and stability for thrombin. This method exhibited good detection performance in detection, with a limit of 0.23

pmol/L. **Conclusion:** This method combines the advantages of high sensitivity, low cost and good portability, and can provide strong support for the detection and accurate diagnosis of thrombin-related diseases.

[Key words] CRISPR-Cas12a; thrombin; cerebral venous sinus thrombosis

脑静脉窦血栓形成(cerebral venous sinus thrombosis, CVST)是一种特殊的脑血管疾病,其临床表现多样、诊断难度大^[1-4]。该疾病作为一种进展迅速的脑血管病变,具有死亡率高、预后差等特点,对人类健康构成巨大威胁^[5-8]。凝血酶作为一种在凝血级联反应中具有活性的胰蛋白酶样变构丝氨酸蛋白酶,在血栓形成中扮演重要角色^[9-10]。最近的研究表明,多种血栓形成因素最终通过影响循环系统中凝血酶水平变化而参与血栓形成。因此凝血酶是CVST诊断和治疗中极具潜力的候选者。然而现有的凝血酶检测方法存在操作复杂、检测时间长、灵敏度不足等问题,无法满足临床疾病诊断预警的需求。

本研究基于凝血酶特异性适配体设计发夹结构变构探针用于识别凝血酶,将凝血酶信号转化为核酸信号,并触发后续基于CRISPR-Cas12a的信号放大技术,开发了一种易于操作且灵敏的凝血酶检测方法。当所设计的变构探针处在发夹结构状态下,凝血酶适配体序列与CRISPR-Cas12a结合点序列互补作为发夹结构的茎。当凝血酶存在时,其与适配体结合导致变构探针变构,暴露的结合位点可以作为Cas12a-sgRNA复合物的激活剂,激活Cas12a非特异性单链DNA(single-strand DNA, ssDNA)切割活性,产生放大的荧光信号。因此,通过荧光测量记录Cas12a酶的反式切割活性,可以确定凝血酶的浓度。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

本文中使用的DNA序列均根据以前的参考文献设

计并由Sangon Biotech(中国上海)合成(表1)。所得到的DNA序列经HPLC水纯化,并在4℃冰箱中保存。EnGen®Lba Cas12a酶以及相关检测缓冲液购自New England Biolabs(中国上海),其他试剂均为分析水平。在整个研究过程中使用了由Sangon Biotech提供的DEPC水。荧光分光光度计为日立F-4700(日本东京)。

1.2 研究方法

变构探针组装:将购买的DNA在3 000 r/min离心10 min,而后加入上海生工公司提供的人DEPC水将其稀释至100 μmol/L。对于捕获探针的组装,合成的发夹结构探针首先在95℃加热10 min,并逐渐冷却至室温后使用。

变构探针特异性研究:取10 μL组装好的荧光变构探针(10 μmol/L)与2 μL凝血酶混合在20 mmol/L Tris-HAc缓冲液(20 mmol/L Tris-HAc、50 mmol/L NaAc、25 mmol/L KAc、10 mmol/L MgAc2, pH=7.4)并孵育30 min,检测该体系中当凝血酶存在或者不存在时荧光信号的变化。

方法可行性分析:对于凝血酶检测,将10 μL不同浓度的凝血酶与10 μL变构探针(50 nmol/L)孵育约30 min,而后在该体系中加入10 μL模板DNA序列(50 nmol/L)并继续孵育1 h。然后,将混合物与CRISPR-Cas12a系统一起孵育,包括Cas12a酶(1 U/L)、crRNA(100 nmol/L)和报告探针(1 μmol/L),并在室温下孵育20 min。荧光强度由荧光分光光度计检测。

1.3 统计学处理

采用Graph-Pad进行数据分析和图标制作。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2组间差异性比较采用t检验;多组数据间的比较采用单因素方差分析;双变量间相关性分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 传感机制

该方法的工作细节如图1所示。为了建立简单、快速、

表1 研究中所使用的核酸序列

名称	序列(5'-3')
发夹探针	GGTGTGTTGCTCAGCAATAATTCGCGCATGCGCGTTGCTGTGTTGGCTTGCTCCTCAGCAAGCCAACACACCA
模板链	TGCCGCGCAATTATTGCTGA
引导RNA(sgRNA)	UUCUACUGUUGUAGAGCCGCGAAUUAUUGCUGA

高效的凝血酶检测方法,本研究首先设计了一个由4个DNA功能性片段组成的ssDNA序列。具体来说,a部分可以与d部分杂交,b部分可以激活CRISPR-Cas12a系统的反式切割特性,d是凝血酶特异性适配体。在加热退火后,a部分与d部分杂交,形成变构探针的“茎”,并协助该ssDNA序列形成发夹结构。在所形成的发夹结构中,b段最初被保护不被CRISPR-Cas12a识别。当凝血酶存在时,发夹探针中的d段(适配体序列)可以与凝血酶特异性结合并引发变构探针变构,导致其余部分从该探针分离释放出来。此时,形成的发夹探针-凝血酶复合物可以与模板序列杂交,形成可以被CRISPR-Cas12a系统特异性、高效识别的dsDNA序列复合物。通过在体系中加入由Cas12酶、引导RNA(sgRNA)和两端分别标记有Cy3和BHQ-2的报告探针组成的CRISPR-Cas12a系统,Cas12a酶的反式切割特性能够被所形成的dsDNA激活。一旦启动Cas12a酶的反式切割活性,它就可以稳健而快速地切割附带的报告探针,分离Cy3(荧光团)和BHQ-2(猝灭剂),从而在Cy3的发射通道处产生增强的信号用于凝血酶定量。

2.2 方法的可行性

为了验证变构探针的设计和组装,首先进行荧光实验。如图2A所示,探针的两端分别用Cy3和BHQ-2标记,由于Cy3和BHQ-2之间的距离较远,可以在原始状态下检测到荧光信号。在将变构探针加热至90℃、10 min后冷却至室温后,ssDNA探针可自组装成发夹结构,在此状态下Cy3的荧光因荧光共振转移而被BHQ-2猝灭。因此,检测到的荧光信号减少可能暗示发夹结构探针的组装。同时,荧光发夹探针也用于凝血酶识别的研究。从图2B的结果可以看出,发夹探针在其原始ssDNA状态下获得的荧光信号为1 032 au,该强度比组装后的探针高约7.2倍,说明发夹结构变构探针组装成功。此外,当凝血酶加入系统时荧光信号从132 au恢复

到934 au。为了证明所设计的变构探针的特异性,本研究在混合物中添加了癌胚抗原(CEA),结果显示当CEA存在时体系中的荧光强度并没有明显增加。之后评估了该体系的检测性能,结果如图2C所示。当传感系统中存在凝血酶时,观察到荧光信号明显增强,其强度比凝血酶不存在时的对照组高约7.6倍。同时,在没有Cas12a酶的情况下,获得的荧光信号与对照组相比没有明显变化,说明Cas12a酶在信号产生和放大中的重要作用。

2.3 优化实验条件

随后优化实验条件以获得更好的检测性能。考虑发夹结构探针对凝血酶特异性识别,首先优化a段和d段的互补长度。从图3A的结果中观察到,互补长度为6 bp到14 bp之间,荧光信号逐渐增加;互补长度超过14 bp时没有观察到更多的荧光增强。因此,a段和d段的互补长度确定为14 bp。之后优化了发夹结构探针的孵育时间。最终,获得的荧光信号随孵育时间从0 min到30 min逐渐增加,并且在孵育超过30 min后不再明显增加(图3B)。随后通过将发夹探针-凝血酶复合物与不同的缓冲溶液孵育来优化CRISPR-Cas系统的条件,包括超纯水、PBS缓冲液和一系列在分子生物学中广泛使用的商业缓冲液(NEBuffer1.1、2.1和3.1)。最后发现在NEBuffer2.1中获得了最高的荧光增强,这可能来自合适的pH和离子强度(图3C)。

2.4 生物传感器的分析性能

优化实验条件后研究了该方法的检测性能,包括灵敏度、特异性和重复性。图4A显示随着凝血酶浓度的增加,该体系中所检测到的荧光强度(EM=570 nm)逐渐增加,揭示凝血酶量与获得的荧光强度之间可能存在一定相关性。因此,随后通过绘制凝血酶浓度与荧光强度的关系来研究两者之间的线性关系。最终,所获得的荧光强度和凝血酶浓度的相关方程被确定为 $Y=349.0 \times \log_2 C - 534.6$,其中C是指凝血酶的

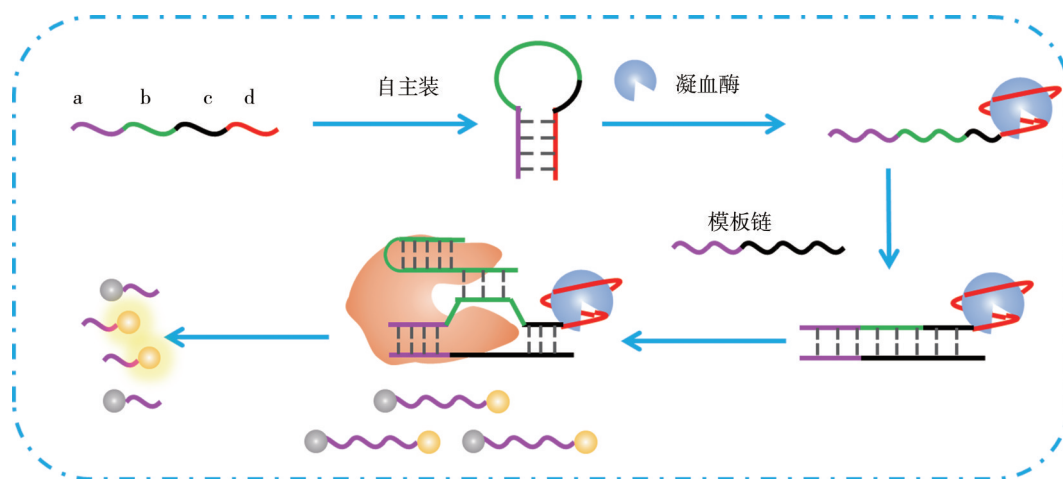


图1 凝血酶检测方法的工作机制

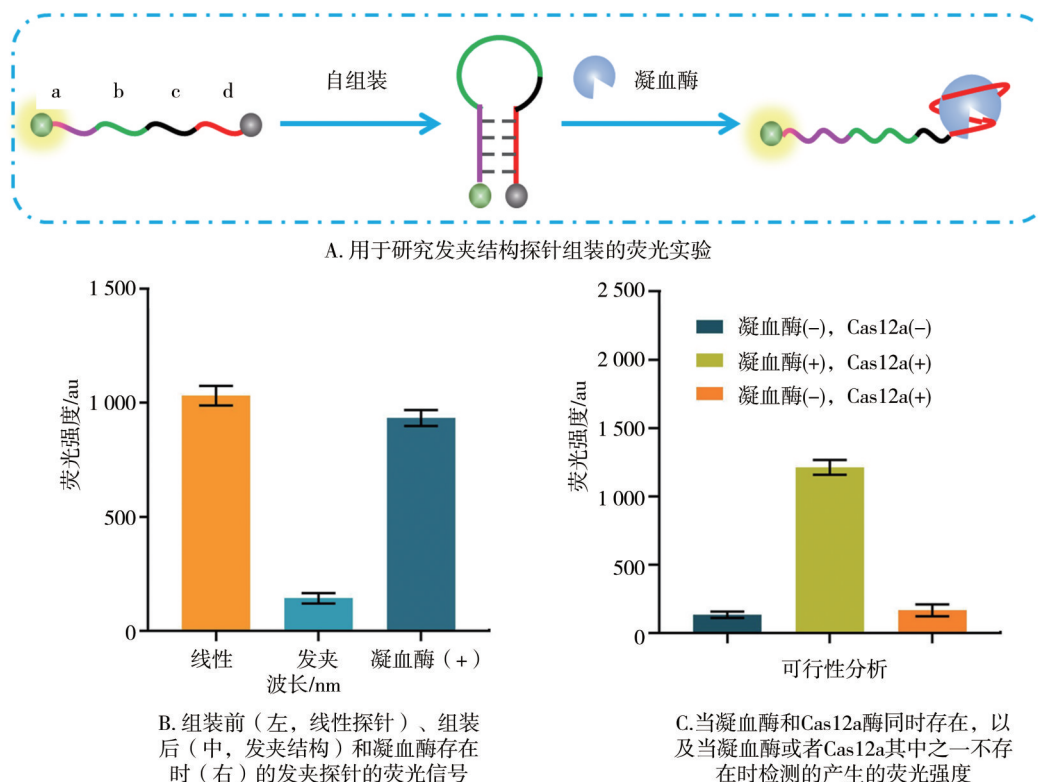


图2 所建立的凝血酶检测方法的可行性

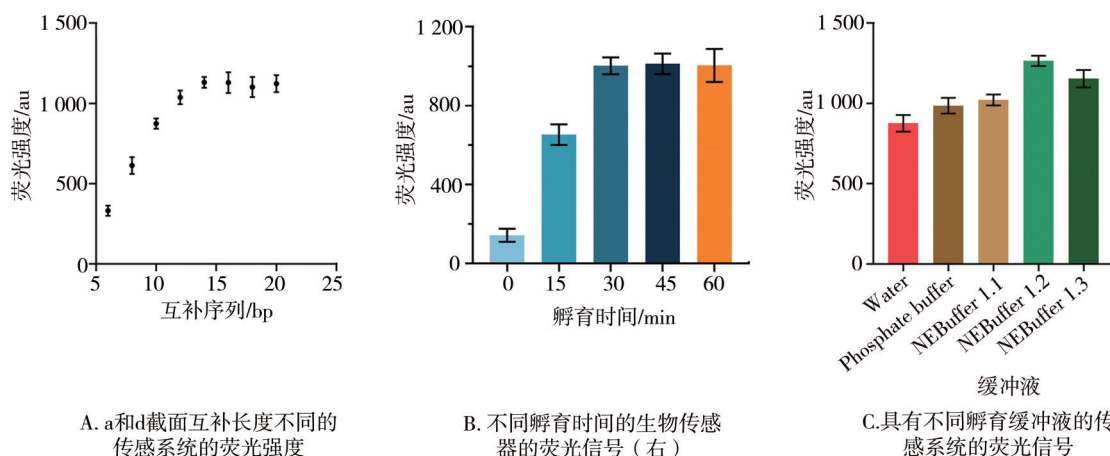


图3 实验条件的优化

浓度, Y 是指获得的荧光强度 (图 4B)。根据 $S/N \geq 3$ 和 $S/N \geq 10$ 的规则, 该传感器针对凝血酶的检测限和定量限分别确定为 0.23 pmol/L 和 0.45 pmol/L。许多其他相关的生物标志物可能会干扰生物传感器的选择性。因此, 通过将其应用于不同蛋白质分子的检测, 测试了该方法的特异性。对于干扰物的检测 (图 4C), 该方法所获得的荧光强度几乎可以忽略, 而对于凝血酶检测则观察到明显增强的荧光强度, 表明该方法具有较高选择性。该方法的高特异性可能源于适配体之间的特异性识别以及 CRIPR-Cas12a 对靶序列的特异性识别。

随后应用所构建的方法检测 10 组重复凝血酶样本的荧光值, 通过分析 10 组荧光值之间的变异系数 (coefficient of variation, CV) 评估所构建方法检测凝血酶的重复性。结果如图 4D 所示, 对于 10 组凝血酶浓度分别为 50 pmol/L 和 200 pmol/L 的重复样本, 利用本研究构建的方法所产生的荧光值之间的 CV 值分别为 6.73% 和 5.64%, 提示该方法对重复样本检测结果的离散区间小。与之前的方法相比, 本研究构建的方法 CV 值相对较低, 能够满足临床检测需求。

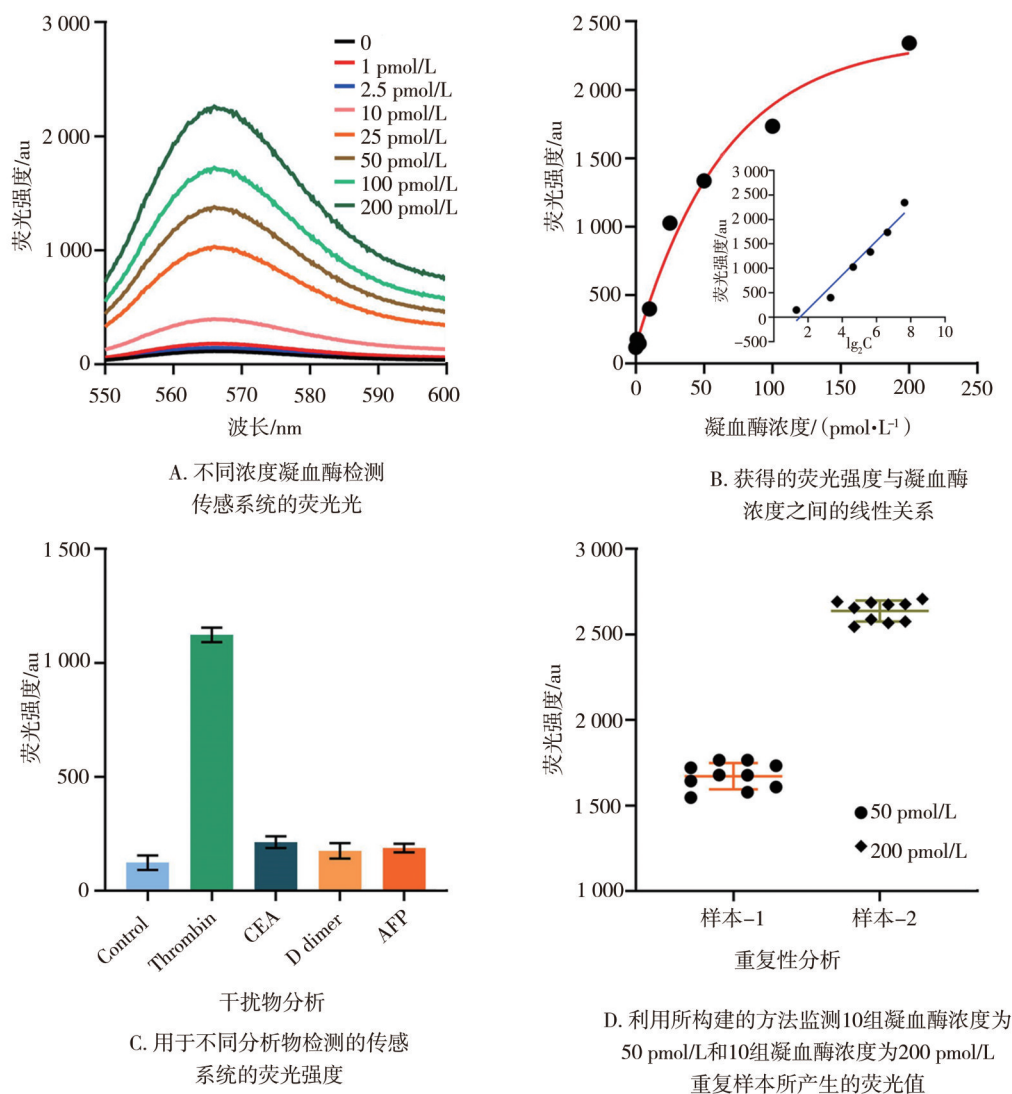


图4 已建立的生物传感器的分析性能

3 讨论

构建新型高效的凝血酶检测技术为多种疾病,尤其是血管疾病的诊断提供了强有力的技术支持。目前,免疫学为基础的方法是临床测定凝血酶最常用的方法,包括酶联免疫吸附实验和蛋白质印迹^[11]。尽管这些方法已成功应用于实验室和临床应用,但它们还存在劳动强度大、费时费力、设计复杂、特异性不足等特点。近年来,人们提出了多种采用荧光法、比色法、电化学法、拉曼法等简化和改进的凝血酶检测方法,大大提高了凝血酶^[12-17]检测的性能。在目前新建的方法中,荧光法由于其灵敏度高、环境友好和便携等特点,引起了广泛的关注。在目

前所构建的基于荧光学凝血酶检测技术中,适配体被用来介导凝血酶信号转化为核酸信号,通过整合后续核酸信号扩增技术,以获得更高的检测灵敏度。例如, Gulay Bayramoglu 等设计了一种基于适配体的磁性吸附剂和生物传感器系统,并成功地将其应用于凝血酶的高选择性和灵敏分离检测。尽管该方法表现出良好的检测性能,检测限低至 1.00 nmol/L。然而,该方法在镀金的 QCM 晶体表面制备的 L-半胱氨酸和凝血酶结合 DNA 适配体,需要高精度实验条件控制,且操作相对复杂,限制了其在多种复杂场景中的应用。因此,急需开发新型、简单、快速、灵敏度高的荧光凝血酶测定技术。

CRISPR/Cas 系统已广泛用于基因编辑和生物标志物检测^[18-22]。Cas 酶与 sgRNA(引导 RNA)的组

装使其具有特异性识别和切割目标核酸序列的能力。此外,CRISPR-Cas12a 具有独特的反式切割特性使其在识别靶序列之后能够对周围 ssDNA 的非特异性切割^[23]。基于此特性,CRISPR-Cas12a 被广泛应用于核酸检测信号放大。

本研究将基于适配体的识别与 CRISPR 报告系统相结合,完成凝血酶的检测。发夹结构可以保护 b 段不被 CRISPR-Cas 系统识别。当识别目标凝血酶并暴露 b 部分时,发夹结构探针的构象发生了变化。然后,与 ssDNA 模板杂交的剩余 b 部分可以激活 Cas12a 效应子的侧支切割,切割 DNA 报告基因以产生明显的荧光增强。最终,所提出的传感系统对凝血酶检测表现出良好的灵敏度和选择性,检测限为 0.45 pmol/L。综上所述,本研究开发了一种基于 CRISPR/Cas12a 的凝血酶定量信号放大传感系统,丰富了 CRISPR/Cas 生物传感和凝血酶检测的应用范围。

参 考 文 献

- [1] Agrawal K, Burger K, Rothrock JF. Cerebral sinus thrombosis[J]. Headache J Head Face Pain, 2016, 56(8): 1380-1389.
- [2] Behrouzi R, Punter M. Diagnosis and management of cerebral venous thrombosis[J]. Clin Med (Lond), 2018, 18(1): 75-79.
- [3] Javed I, Sultan T, Rehman ZU, et al. Clinical spectrum and outcome of cerebral venous sinus thrombosis in children[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2018, 28(5): 390-393.
- [4] Badimon L, Meyer BJ, Badimon JJ. Thrombin in arterial thrombosis[J]. Haemostasis, 1994, 24(2): 69-80.
- [5] Sato T, Terasawa Y, Mitsumura H, et al. Venous stasis and cerebrovascular complications in cerebral venous sinus thrombosis[J]. Eur Neurol, 2017, 78(3/4): 154-160.
- [6] Wei Y, Deng X, Sheng G, et al. A rabbit model of cerebral venous sinus thrombosis established by ferric chloride and thrombin injection[J]. Neurosci Lett, 2018, 662: 205-212.
- [7] Weimar C. Diagnosis and treatment of cerebral venous and sinus thrombosis[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2014, 14(1): 417.
- [8] Nagai M, Yilmaz CE, Kirchhofer D, et al. Role of coagulation factors in cerebral venous sinus and cerebral microvascular thrombosis[J]. Neurosurgery, 2010, 66(3): 560-565.
- [9] Tripodi A. Thrombin generation assay and its application in the clinical laboratory[J]. Clin Chem, 2016, 62(5): 699-707.
- [10] Davie EW, Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin[J]. Semin Thromb Hemost, 2006, 32(Suppl 1): 3-15.
- [11] Kintigh J, Monagle P, Ignjatovic V. A review of commercially available thrombin generation assays[J]. Res Pract Thromb Haemost, 2018, 2(1): 42-48.
- [12] Li XL, Wu YY, Niu JJ, et al. One-step sensitive thrombin detection based on a nanofibrous sensing platform[J]. J Mater Chem B, 2019, 7(34): 5161-5169.
- [13] Yu N, Wu JM. Rapid and reagentless detection of thrombin in clinic samples via microfluidic aptasensors with multiple target-binding sites[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 146: 111726.
- [14] Gao Y, Zhu ZY, Xi XX, et al. An aptamer-based hook-effect-recognizable three-line lateral flow biosensor for rapid detection of thrombin[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 133: 177-182.
- [15] Lin KC, Jagannath B, Muthukumar S, et al. Sub-picomolar label-free detection of thrombin using electrochemical impedance spectroscopy of aptamer-functionalized MoS₂[J]. Analyst, 2017, 142(15): 2770-2780.
- [16] Cheng L, Xu C, Cui HF, et al. A sensitive homogenous aptasensor based on tetraferrocene labeling for thrombin detection[J]. Anal Chimica Acta, 2020, 1111: 1-7.
- [17] Lin YN, Sun YL, Dai YX, et al. A "signal-on" chemiluminescence biosensor for thrombin detection based on DNA functionalized magnetic sodium alginate hydrogel and metalloporphyrinic metal-organic framework nanosheets[J]. Talanta, 2020, 207: 120300.
- [18] Zhao XX, Zeng LL, Mei Q, et al. Allosteric probe-initiated wash-free method for sensitive extracellular vesicle detection through dual cycle-assisted CRISPR-Cas12a[J]. ACS Sens, 2020, 5(7): 2239-2246.
- [19] Zhao X, Zhang W, Qiu X, et al. Rapid and sensitive exosome detection with CRISPR/Cas12a[J]. Anal Bioanal Chem, 2020, 412(3): 601-609.
- [20] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(R1): R40-R46.
- [21] Lino CA, Harper JC, Carney JP, et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches[J]. Drug Deliv, 2018, 25(1): 1234-1257.
- [22] Cho S, Shin J, Cho BK. Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1089.
- [23] Li SY, Cheng QX, Wang JM, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. Cell Discov, 2018, 4: 20.

(责任编辑:唐秋姗)