

- [44] GOULD S E, JUNTILA M R, DE SAUVAGE F J. Translational value of mouse models in oncology drug development[J]. Nat Med, 2015, 21(5): 431-439.
- [45] BAFADHEL M, MCKENNA S, TERRY S, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(6): 662-671.
- [46] ZHANG Y S, ALEMAN J, SHIN S R, et al. Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(12): E2293-E2302.
- [47] PALASANTZAS V, TAMARGO-RUBIO I, LE K, et al. iPSC-derived organ-on-a-chip models for personalized human genetics and pharmacogenomics studies[J]. Trends Genet, 2023, 39(4): 268-284.
- [48] DEL PICCOLO N, SHIRURE V S, BI Y, et al. Tumor-on-chip modeling of organ-specific cancer and metastasis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 175: 113798.
- (收稿日期: 2023-06-10 修回日期: 2023-08-16)

• 综 述 •

CRISPR/Cas 系统在感染性疾病诊断中的应用进展^{*}

潘 兴¹, 林永红², 杨 柳², 马 可²综述, 于 霞^{2△}审校

1. 重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016; 2. 电子科技大学医学院附属妇女儿童医院/
成都市妇女儿童中心医院检验科, 四川成都 610091

摘 要: 感染性疾病对人类与动物的健康会造成重大威胁, 尤其是新发和大流行发作的传染病。开发快速、灵敏、特异的诊断方法能有效防控感染性疾病。规律间隔成簇短回文重复序列及其相关蛋白 (CRISPR/Cas) 系统作为原核生物抵御病毒的获得性免疫系统, 近年来已开发成为一种高效的分子诊断工具, 其与核酸扩增、荧光标记、侧向横流等技术结合, 创建了快速、灵敏、便携的检测系统, 在病原体诊断中展现了极佳的发展前景。文章综述了 CRISPR/Cas 系统的结构、分类、工作原理, 重点阐述了 CRISPR 操作系统在感染性疾病诊断中的应用进展。

关键词: CRISPR/Cas; 感染性疾病; 病原体; 分子诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.20.021

中图法分类号: R511

文章编号: 1673-4130(2023)20-2542-07

文献标志码: A

Advances in the application of CRISPR/Cas systems in the diagnosis of infectious diseases^{*}

PAN Xing¹, LIN Yonghong², YANG Liu², MA Ke³, YU Xia^{2△}

1. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Women's and Children's Hospital Affiliated to
School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China/
Chengdu Women's and Children's Hospital, Chengdu, Sichuan 610091, China

Abstract: Infectious diseases pose a major threat to human and animal health, especially emerging and pandemic outbreaks. Development of rapid, sensitive, and specific diagnostic methods can effectively prevent and control infectious diseases. As the acquired immune system of prokaryotes against viruses, a cluster of regularly spaced short palindrome repeats and its associated protein (CRISPR/Cas) system, has been developed as an efficient molecular diagnostic tool in recent years. It combines with nucleic acid amplification, fluorescent labeling, lateral cross flow, and other technologies to establish a fast, sensitive and portable detection system, which has shown excellent potential in pathogen diagnosis. Therefore, this article reviews the structure, classification, and mechanisms of CRISPR/Cas system, and focuses on the application of CRISPR operating system in the diagnosis of infectious diseases.

Key words: CRISPR/Cas; infectious diseases; pathogen; molecular diagnosis

^{*} 基金项目: 北京康华中西医发展基金会 2021 年度第一批“妇科肿瘤专项研究基金”项目 (KH-2021-LLZX-008); 2021 年成都市医学科研课题 (2021031)。

[△] 通信作者, E-mail: irisylue2021@uestc.edu.cn。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230804.1334.002.html> (2023-08-04)

感染性疾病是各种病原微生物感染机体造成的疾病,如人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、新型冠状病毒(SARS-CoV-2)等。根据世界卫生组织(WHO)2019 年全球死亡原因统计数据,全球范围内因感染病原体死亡人数达 1 020 万,占全部死亡病例的 18%^[1]。截至 2022 年 4 月,在全球快速传播的新型冠状病毒感染病例已超过 5.04 亿,死亡 600 万例^[1]。快速、灵敏、特异的病原体检测方法是预防和控制感染性疾病暴发的重要保证^[2]。根据 WHO 的标准,最理想的病原体检测方法应低成本、高灵敏度、特异性、即时和便携^[3]。目前,常用的病原体检测方法包括:形态学检查、分离培养与鉴定、免疫学方法、实时荧光定量 PCR(qPCR)、基因组测序方法、质谱法等。但这些方法存在检测周期长、操作复杂、依赖昂贵仪器等缺陷,极大地限制了其在感染性疾病中的应用。

规律间隔成簇短回文重复序列及其相关蛋白(CRISPR/Cas)系统是由细菌和古细菌在抵御病毒的过程中演化而来的适应性免疫系统^[4-6]。当病毒感染细菌时会把病毒的 DNA 切下一部分并整合入 CRISPR 序列中,CRISPR 基因可加工成靶向特定病毒 DNA 的小向导 RNA(sgRNA),sgRNA 随即指导 Cas 核酸酶蛋白对病毒 DNA 进行精准切割,从而起到清除外来物的作用^[7-8]。理论上,通过改变 sgRNA 序列可定向识别切割任一核酸序列^[9]。CRISPR/Cas 系统最早被应用于基因编辑,随着人们对 CRISPR/Cas 系统的不断研究,发现了其在分子诊断领域的巨大前景。因此,本文针对 CRISPR/Cas 系统及其在感染性疾病诊断领域的应用进展进行综述。

1 CRISPR/Cas 系统简介

1.1 结构 CRISPR/Cas 系统主要包括 CRISPR 基因和 Cas 基因 2 个部分。CRISPR 基因包含位于上游的前导序列(leader)、重复序列(repeat)和间隔序列(spacers)。前导序列启动 CRISPR 基因转录,产生一个长度约为 200 bp 的 CRISPR RNA(即 crRNA),富含 AT 碱基;有许多高度保守的重复序列,序列长度 24~47 bp,平均长度 32 bp,其中包括回文序列 5~7 bp,可形成发卡结构;间隔序列分隔多个重复序列,是一系列长度相等的非重复序列,由病毒等外源 DNA 被细菌识别切割而整合入重复序列之间,长度为 17~84 bp,平均长度为 36 bp。Cas 基因位于 CRISPR 基因的上游,被称为 CRISPR 的相关基因。Cas 编码的 Cas 蛋白为一类核酸酶,在 crRNA 引导下识别并切割与 crRNA 互补的核酸片段。Cas 基因也可以编码解旋酶、聚合酶、RNA 结合酶等,这些酶参与了免疫过程并发挥免疫功能^[8,10-11]。DELTCHEVA 等^[12]还发现了位于 Cas 基因上游的反式编码的 CRISPR RNA(tracrRNA)。tracrRNA 与 crRNA 通过碱基互补作用结合,从而靶向外源 DNA 并指导 Cas 蛋白发挥核

酸酶水解作用^[13]。

1.2 分类 2011 年,MAKAROVA 等^[14]提出了多元分类法,整合系统发育、基因序列和结构分析将 CRISPR/Cas 系统分成三大类:I 型、II 型、III 型(type I~III),即仅含有 Cas3 蛋白为 I 型,仅含 Cas9 蛋白为 II 型,以及含有 Cas10 蛋白为 III 型,I~III 都含有 Cas1、Cas2。这是最早的 CRISPR/Cas 系统公认的分类方法。2015 年,MAKAROVA 等^[15]利用 PSSM 矩阵库综合分析 2 751 个细菌与真菌的基因组数据,提出了 IV 型与 V 型两个新型别,继而得出更广泛的分类方式,即将 CRISPR/Cas 系统分成两大类:第 1 类具有多重亚基 crRNA 效应子复合物,包含多个执行单一功能的 Cas 蛋白,而第 2 类效应子复合物的所有功能均由单一 Cas 蛋白执行,如 Cas9 蛋白。随后,MAKAROVA 等^[16]又丰富了 CRISPR/Cas 系统的分类,发现了 33 个亚型和靶向 RNA 切割的 VI 型^[17]。最新的分类将已鉴定的 CRISPR/Cas 系统分为两大类,第 1 类包括 I、III、IV 型,标志性蛋白分别为 Cas3、Cas10、Csf1,第 2 类包括 II、V、VI 型,标志性蛋白为 Cas9、Cas12a、Cas13^[18]。每一型根据 Cas 蛋白的作用位点不同又可分为多种亚型。由于第 2 类 CRISPR/Cas 系统用单一、多功能 Cas 蛋白进行基因编辑,相较于第 1 类系统更为高效简单,因此一直是研究应用的热点。

2 工作原理

CRISPR/Cas 系统是细菌对病毒入侵的免疫防御系统,其发挥功能的机制分为 3 个阶段:适应、表达、干扰^[14-15]。在适应阶段,病毒 DNA 片段被剪切整合进 CRISPR 基因的间隔序列中,细菌便保留了对病毒的记忆性,以抵抗病毒的再次入侵。在表达阶段,CRISPR 基因的前导序列启动一级转录,产生 pre-crRNA,然后经过加工成熟处理,生成 crRNA。在干扰阶段,crRNA 能引导 Cas 蛋白识别目标 DNA 的前间区序列邻近序列(PAM)从而引起 DNA 双链断裂。

2.1 CRISPR/Cas9 CRISPR/Cas9 工作原理与免疫机制类似,不同在于 crRNA 还需与 tracrRNA 结合成 sgRNA,sgRNA 指导 Cas9 蛋白识别外源 DNA 的 PAM 序列使靶标序列解链,同时 Cas9 蛋白的 HNH 与 RuvC-like 结构域分别剪切 crRNA 互补链和非互补链^[19]。DNA 双链断裂(DSB)会启动修复机制包括非同源末端结合(NHEJ)与同源重组修复(HDR)^[20]。因而改变 sgRNA 序列即可对任何 DNA 进行基因编辑。

2.2 CRISPR/Cas12 CRISPR/Cas12 包括 Cas12a 和 Cas12b。以 Cas12a 为例,对比 CRISPR/Cas9 系统作用机制有以下不同:(1)不需 tracrRNA 帮助 crRNA 成熟和指导 Cas 蛋白识别切割靶标序列^[21]。(2)Cas12a 包含 RuvC-like 结构域与 Nuc 结构域,不包含 HNH 结构域,仅 RuvC 结构域切割 DNA 双链

即顺式切割^[22]。(3)Cas12a 具有反式切割活性,即非特异性 DNA 剪切活性,能将非靶标序列的任意单链 DNA 切割^[23]。利用 Cas12a 的反式切割活性,通过在反应系统中加入信号标记的单链 DNA 从而实现特异基因的检测。

2.3 CRISPR/Cas13 CRISPR/Cas13 包括 Cas13a、Cas13b、Cas13c 和 Cas13d。Cas13 特点在于它可以识别剪切单链 RNA。Cas13a 由 REC 结构域与 NUC 结构域组成,为双瓣叶形的球状蛋白结构。REC 结构域包含 NTD 和 Helical-1 结构域,其中 NUC 结构域包括两个 HEPN 结构域、Helical-2 结构域以及连接两个 HEPN 结构域的连接结构域(Helical-3)^[24-25]。Helical-1 负责切割 crRNA 前体使之成熟。HEPN 结构域识别靶标 RNA 的 PFS 位点(protospacer flanking sites),进而激活 Cas13a 蛋白 RNA 酶活性对靶标 RNA 顺式切割,在顺式切割后 Cas13a 还会对非靶标单链 RNA 进行反式切割^[17,26]。

3 CRISPR/Cas 系统在感染性疾病中的应用

3.1 CRISPR/Cas9 将 CRISPR/Cas9 系统应用于感染性疾病检测的首次亮相是在 2016 年。2016 年,PARDEE 等^[27]研发了一种能以单碱基分辨率检测寨卡病毒的纸基传感器,该检测系统将等温 RNA 扩增技术 NASBA、toehold 开关 RNA 传感器和 CRISPR/Cas9 系统相结合,根据 NASBA 反应扩增的双链 DNA 有无特异性 PAM 序列和 sgRNA 作用靶点,使 Cas9 对扩增产物产生不同切割活性。未被切割的 DNA 双链转录出长链 RNA 而激活传感器,从而使纸基上发生颜色变化。2018 年,HUANG 等^[28]建立了一种基于 CRISPR/Cas9 系统的等温指数核酸扩增方法(CAS-EXPAR),扩增的引物由 Cas9/sgRNA 复合物对目标 DNA 序列定点剪切而产生,从而诱导扩增反应产生大量 DNA,并采用 qPCR 进行检测。将其用于李斯特菌检测,灵敏度可达 0.82 a mol/L 级(阿摩尔每升级),且有识别单碱基错配的特异性。2020 年,WANG 等^[29]结合 CRISPR/Cas9 系统与侧向横流技术,构建了新型的比色生物传感器 CASLFA (CRISPR/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay),该技术能够在 1 h 内对非洲猪瘟病毒进行检测。

除了利用 Cas9 的定点切割功能检测外,对于失去剪切能力但保留了结合能力的 dCas9 (nuclease-deactivated Cas9) 也能很好地应用于病原体检测中。2017 年,ZHANG 等^[30]利用一对具有荧光素酶分离结构域的 dCas9 对两个靶向序列进行检测,当两个荧光素酶的分离结构域靠近时,会发生荧光素氧化反应产生可检测的荧光信号;GUK 等^[31]基于 SYBR GREEN I 荧光染料开发了 dCas9/sgRNA-SG I DNA-FISH 系统:dCas9/sgRNA 复合物能够特异性识别靶标序列并形成三元复合物。由于 dCas9 蛋白带有 His 标签,所以利用 anti-His 磁珠可以将三元复

合物分离,最后加入 SYBR GREEN I 与体系中的靶标 DNA 结合实现检测。该方法成功用于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的检测。2019 年,REZA 等^[32]联合 dCas9 和石墨烯晶体管建立了高灵敏度的便携电化学生物传感器。将 dCas9 连接到石墨烯晶体管上,当 dCas9 识别并结合靶向序列会引起石墨烯电导率发生变化,从而可检测到电信号。这种方法无需扩增,灵敏度达 1.7 fmol/L 级(飞摩尔每升级)。此外,KUMAR 等^[33]利用了一种能与特定 SARS-CoV-2 突变株中核酸序列特异结合的 Cas9 蛋白(FnCas9),开发了用于诊断 SARS-CoV-2 感染的 FELUDA (FnCas9 editor-linked uniform detection assay) 平台。这种 Cas9 蛋白对靶标序列变化高度敏感,可利用侧向横流技术检测这种特定的 Cas9 蛋白,从而检测 SARS-CoV-2。

3.2 CRISPR/Cas12 最先应用于感染性疾病核酸检测中的是 Cas12a,最早于 2015 年被张锋团队发现,又称为 Cpf1^[34]。由于 Cas12a 既能顺式切割靶标双链 DNA(dsDNA),又能反式切割非靶标单链 DNA(ssDNA),因此在感染性疾病核酸检测方面较 Cas9 应用更为广泛。2018 年,CHEN 等^[35]将重组酶聚合酶扩增(RPA)与 CRISPR/Cas12 系统结合,建立了灵敏准确的病原体检测系统 DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter),成功应用于人乳头状病毒(HPV)的诊断,灵敏度达 amol/L 级。该检测系统在反应体系中引入分子探针(一端连接荧光基团,一端连接猝灭基团),Cas12a 识别靶标序列后产生非特异性切割活性,荧光基团与猝灭基团分离从而释放荧光信号。RPA 使荧光信号累积从而提高检测灵敏度。2020 年,DETECTR 被用于基于 CRISPR/Cas12 的 SARS-CoV-2 检测,结合侧向横流技术能快速(30~40 min)检测临床样本中 SARS-CoV-2^[36]。2018 年,LI 等^[37]将检测系统 DETECTR 中的 RPA 扩增步骤替换成传统的 PCR 研发了快速、有效的核酸检测平台 HOLMES (one hour low-cost multipurpose highly efficient system),其可用于检测伪狂犬病病毒(DNA 病毒)和日本乙型脑炎病毒(RNA 病毒)。2019 年,YAN 等^[38]开发出基于 Cas12b 和环介导等温扩增技术(LAMP)的检测平台 HOLMESv2。该检测系统利用了一种来自酸土环脂芽孢杆菌的 Cas12b (AacCas12b),这种 Cas12b 在 48 °C 有最佳的 DNA 切割活性,由于 Cas12b 和 LAMP 的工作温度相同,可将 LAMP 扩增和 Cas12b 反式切割整合到一个恒温的一步系统中,从而为检测提供了方便,同时还能有效消除 LAMP 反应产生的非特异性信号,提高灵敏度。2022 年,BHATT 等^[39]联合逆转录-LAMP(RT-LAMP)、CRISPR/Cas12 系统以及侧向横流技术,建立了一种无需 RNA 提取步骤并可直观诊断 SARS-CoV-2 感染的方法,称为 CLEVER as-

say。该诊断技术在保证灵敏度、特异性及速度的情况下,还大大简化了检验程序、降低检测成本,适合于资源有限的地区进行大规模 SARS-CoV-2 感染检测。

为避免移液和开盖过程造成的污染,SUN 等^[40]提出一管化的 CRISPR/Cas12 系统检测系统 OR-DETECTR。在此检测系统中,将 RPA 扩增体系与 Cas12a 混合物在一个管内进行反应,2 个体系采用物理隔离方式分开,RPA 扩增后通过瞬时离心混合,RPA 产物即可被 Cas12a 识别切割产生荧光信号。利用免疫层析试纸条可视化检测反应产物可以简化仪器,使结果呈现更为直观^[41-43]。若采用耐热的 Aac-Cas12b 和 LAMP 扩增方法,即可一管化混合反应且无需物理隔离和离心混合。JOUNG 等^[44]便是基于这一原理提出了 STOPCovid 一步化检测的方法,应用于 SARS-CoV-2 感染的检测。该检测方法使用了 AacCas12b 和 LAMP 共同反应缓冲液,将 RT-LAMP 扩增和切割反应混合于一管进行,并采用磁珠提取 RNA,去掉了乙醇提取和洗脱的过程,简化了检测步骤。除了借助仪器监测荧光信号,还可直接肉眼观察。2023 年,CHEN 等^[45]设计了一种基于 CRISPR/Cas 的便携式猴痘病毒裸眼检测系统。该系统利用了 CRISPR/Cas12 的高选择性和 RPA 的等温核酸扩增能力,放大荧光信号,随即用 LED 照射反应产物可肉眼观察颜色变化,使用智能手机捕捉图像获得颜色随时间的变化。

上述研究均以荧光作为信号输出,此外,电化学传感作为一种高灵敏度的信号传导装置已被应用于基于 CRISPR/Cas12 的核酸检测中,使得检测系统不需要通过扩增来增加反应灵敏度。DAI 等^[46]建立了一种名为 E-CRISPR 的电化学生物传感器。在该方法中,亚甲基蓝修饰的 ssDNA 通过硫醇键固定在金电极上,作为电化学报告探针。当 Cas12a 识别靶标序列激活反式切割活性,剪切电化学报告探针,从而 MB 从金电极表面释放并产生峰值电流改变。因此可通过电信号检测靶标序列的有无。该方法用于 HPV 的无扩增直接检测,灵敏度为 50 pmol/L 级(皮摩尔每升级)。随后,ZHANG 等^[47]对此进行了改善,用发夹状 DNA 代替了线性 ssDNA,这种独特的结构使得 MB 与电极之间距离更近,从而提高了峰值电流,同时还提高了 Cas12a 的切割效率,极大地提高了检测灵敏度。

3.3 CRISPR/Cas13 Cas13 与靶标序列识别结合后会激活对非靶标 ssRNA 反式切割的活性。2017 年,张锋团队利用该特性开发了 SHERLOCK 技术,该方法先将底物 DNA 或 RNA 经重组酶聚合酶扩增(RPA)或逆转录-RPA(RT-RPA),提高检测灵敏度,再利用 T7 转录酶将扩增后的 DNA 转录为可被 Cas13 靶向识别的 RNA,并与 LwaCas13、crRNA 反应液混合^[48]。当 crRNA 引导 LwaCas13 识别切割靶

标后,激活 LwaCas13 对非靶标 ssRNA 剪切活性,非靶标 ssRNA 两端的荧光基团和猝灭基团因此分离,从而释放荧光信号。SHERLOCK 技术整合了等温扩增技术 RPA 和 Cas13 的检测能力,将反应灵敏度提升至 amol/L 级。该团队利用 SHERLOCK 成功检测寨卡病毒和登革热病毒。后来,多项研究以 SHERLOCK 技术为基础将 CRISPR/Cas13a 应用于 HIV、禽流感病毒、SARS-CoV-2、HBV、非洲猪瘟病毒的核酸检测技术中^[49-53]。2018 年,张锋团队通过对 SHERLOCK 技术进行改进,推出了 SHERLOCKv2^[43],将 Csm6 与 Cas13 串联使用使反应灵敏度增加了 3.5 倍。Csm6 是Ⅲ型 CRISPR/Cas 系统中的二聚体 RNA 内切核酸酶,基于其在信号放大中的内源性功能,能提高 RNA 检测的灵敏度。此外,还根据不同 Cas13 剪切活性设计具有不同序列、带有不同荧光基团的非靶标分子,从而实现多通道检测平台。2021 年,LIU 等^[54]也将 Csm6 和 Cas13a 联用,研发了快速串联集成核酸酶检测(FIND-IT)的无扩增技术。由于减少了核酸扩增步骤大大加快了检测速度,能够快速诊断 SARS-CoV-2(约 20 min)且不牺牲测试的灵敏度,极大适用于感染性疾病的即时诊断。为优化 RNA 提取步骤以适应现场快速检测,MYHRVOLD 等^[55]将 HUDSON(指一种通过加热或化学还原反应来溶解病毒颗粒和灭活 RNA 酶的方法)与 SHERLOCK 结合,建立了一种能直接从体液中检测病毒的方法。经 HUDSON 处理过的尿液或唾液可以直接进行 RPA 反应,无需提取纯化 RNA。该方法能在 2 h 内检测出低于单拷贝(1 copy/ μ L)的寨卡病毒和登革热病毒。ARIZTI-SANZ 等^[56]对 HUDSON 进行优化,缩短了 HUDSON 的孵育时间,并利用智能手机摄像头实时监测管内荧光读数变化,避免了反复开盖造成的污染,开发了 SHINE(streamlined high lighting of infections to navigate epidemics)检测系统。该检测方法可在 10 min 内快速灭活鼻咽拭子和唾液中的 SARS-CoV-2,检测时间缩短到 50 min,极大地提高了诊断能力。

类似于基于 CRISPR/Cas12b 的 STOPCovid 检测方法,MAHAS 等^[57]发现了一种来自盲肠热梭状芽孢杆菌的 Cas13a(TccCas13a),这种耐热 Cas13a 与 LAMP 的工作温度相同,能于一管混合反应,因此建立了基于 CRISPR/Cas13a 检测 SARS-CoV-2 的一管化系统,称为 OPTIMA-dx。若采用侧向横流读取荧光信号,必须打开反应管读数增加了交叉污染的概率。而该方法用便携式荧光观察仪代替侧向横流读数,智能手机实时读取和收集检测结果,整个检测过程全封闭无需开盖,实现了一体化检测病毒的模式。

微流控技术具有小型化、集成化和自动化的优点^[58]。微流控技术与 CRISPR 系统的结合可以弥补基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测技术的缺陷,在病

原体的诊断上具有巨大前景。QIN 等^[59]将 CRISPR/Cas13a 与微流控技术结合,建立了一种用于检测埃博拉 RNA 的自动化 POC 系统。该检测系统不需要核酸扩增,能同时进行数十个样本中埃博拉病毒的检测,5 min 内检测限可达 20 PFU/mL(PFU 为空斑形成单位,PFU/mL 为感染性滴度的单位)。ACKERMAN 等^[60]将微孔阵列芯片与 CRISPR/Cas13a 结合,开发了一种用于核酸多重检测的组合阵列系统(CARMEN)。该平台能够实现 169 种人类病毒的区分、甲型流感病毒的全面分型以及数十种 HIV 耐药突变的多重鉴定。受此启发,WELCH 等^[61]设计了一种用于高通量检测 SARS-CoV-2 及其他呼吸道病毒的检测系统,称为 mCARMEN。mCARMEN 增加了监控功能,能在 1 d 内测试数百个样本,能够快速检测包括 SARS-CoV-2 在内的 21 种呼吸道病毒。

4 小结与展望

现有的病原体检测方法大多操作复杂、耗时长且依赖昂贵的仪器设备,而 CRISPR/Cas 系统作为一种强大的基因编辑手段,能结合核酸扩增技术 PCR、RPA、LAMP 等,将核酸剪切或结合的过程转换为荧光、比色、电子等信号,并通过荧光检测仪、LFAD、肉眼、智能手机、电化学传感器、微流控芯片等读取从而检测病原体核酸。基于 CRISPR/Cas 系统设计开发的新型核酸检测技术具有突出优势:(1)检测周期短、一般 2 h 内可出结果;(2)灵敏度高,可实现 amol/L 级的检测,而传统 PCR 检测限为 fmol/L 级;(3)特异性强、能识别单碱基变化;(4)简单便携、不依赖昂贵的仪器和实验环境,更适用于床旁即时检测(POCT);(5)结果读取方便,通过荧光检测和肉眼读取结果。这些优势必将使得 CRISPR/Cas 检测技术在感染性疾病检测领域中发挥重要作用。

然而,CRISPR 诊断工具仍然存在一些局限性:(1)样本中靶标浓度低,大多需要借助核酸扩增技术,使检测步骤烦琐,易造成污染,同时容易出现假阳性或假阴性的检测结果;(2)CRISPR/Cas 技术的脱靶效应会造成假阴性的检测结果。在 sgRNA 的引导下 Cas 蛋白识别靶标序列过程中,可能会与非靶点核酸序列部分错配,造成错误切割;(3)目前大多数基于 CRISPR/Cas 系统建立的分子诊断平台还难以实现对多种病原体的高通量检测;(4)需要根据已知病原体的基因序列来设计 crRNA,难以应对新出现或发生突变的病原体的检测;(5)sgRNA 精准识别靶标序列依赖于 PAM 序列,且不同类型 Cas 蛋白识别不同 PAM 序列。这一特性虽然增加了 CRISPR/Cas 系统的特异性,但也限制了靶标区域的选择,同时降低了 CRISPR/Cas 系统的灵活性。

基于以上挑战,未来可在如下方面进行改进。(1)简化 CRISPR/Cas 诊断程序:采用一系列措施减少工作步骤,如优化或免除核酸提取及扩增,可通过

使用更高灵敏度的检测设备如电化学传感器,结合免疫磁富集、微流控富集技术,开发对靶标序列变化高敏感的新型 Cas 蛋白,丰富 CRISPR 工具箱等手段。目前虽然已出现了基于 CRISPR/Cas 系统无需扩增的核酸检测技术,但仍存在灵敏度偏低的问题,因此未来还需对体系进一步改善。此外,可引入智能设备实时监测结果,数据自动上传,避免开盖降低污染,同时使检测结果读取简便直接。(2)降低 CRISPR/Cas 系统脱靶效应和 PAM 约束:Cas 蛋白作为 CRISPR/Cas 系统的核心元件之一,其结构和作用机制在很大程度上决定了该系统的功能走向,因此可对 Cas 蛋白进行工程化改造,设计高靶向特异性和更宽范围的 PAM 识别序列以优化提升 CRISPR/Cas 系统。对 crRNA 优化设计可提高 Cas 蛋白特异性,进而减少脱靶效应。除了改造 CRISPR/Cas 系统自身之外,还可以通过外源蛋白结构域的引入。(3)设计多通道或高通量检测系统:新材料、新技术与 CRISPR 系统的结合是实现高通量检测的关键。CARMEN 平台即是微孔阵列芯片与 CRISPR/Cas13a 结合成功用于核酸多重检测。微流控技术以其低成本、小体积和自动化的优势在高通量检测领域引起广泛关注。将微流控技术与新兴材料,如纳米材料、水凝胶相结合,将会使 CRISPR/Cas 检测平台向高通量、便携化、自动化发展的重要研究方向发展。尽管 CRISPR/Cas 技术存在一定局限,但其无可比拟的优势仍使其在核酸检测领域拥有革命性的应用潜力,相信随着科学家的不断研究和技术的不断发展,CRISPR/Cas 技术有望能成为感染性疾病诊断领域的利器。

参考文献

- [1] World Health Organization. World Health Statistics 2022 [R]. Geneva: WHO, 2022.
- [2] LI J, WANG Y, WANG B, et al. Application of CRISPR/Cas systems in the nucleic acid detection of infectious diseases[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2022, 12(10): 2455.
- [3] KOSTYUSHEVA A, BREZGIN S, BABIN Y, et al. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases [J]. *Methods*, 2022, 203: 431-446.
- [4] DEVI V, HARJAI K, CHHIBBER S. CRISPR-Cas systems: role in cellular processes beyond adaptive immunity [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2022, 67(6): 837-850.
- [5] FAURE G, MAKAROVA K S, KOONIN E V. CRISPR-Cas: complex functional networks and multiple roles beyond adaptive immunity [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(1): 3-20.
- [6] MEDINA-APARICIO L, DÁVILA S, REBOLLAR-FLOR ES J E, et al. The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae [J]. *Pathog Dis*, 2018, 76(1): fty002.
- [7] MOHANRAJU P, SAHA C, VAN BAARLEN P, et al. Alternative functions of CRISPR-Cas systems in the evolutionary arms race [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(6): 351-364.

- [8] WU Y, BATTALAPALLI D, HAKEEM M J, et al. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections [J]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 401.
- [9] LE C. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [10] BUTIUC-KEUL A, FARKAS A, CARPA R, et al. CRISPR-Cas system; the powerful modulator of accessory genomes in prokaryotes[J]. *Microb Physiol*, 2022, 32(1/2): 2-17.
- [11] HAFT D H, SELENGUT J, MONGODIN E F, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes[J]. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(6): e60.
- [12] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [13] LIAO C, BEISEL C L. The tracrRNA in CRISPR biology and technologies [J]. *Ann Rev Genetics*, 2021, 55: 161-181.
- [14] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-477.
- [15] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNBASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-736.
- [16] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO 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.
- [17] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [18] 房思昌, 宋馨, 薛玉玲, 等. CRISPR/Cas 技术在乳酸菌中的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(11): 317-323.
- [19] JANIK E, NIEMCEWICZ M, CEREMUGA M, et al. Various aspects of a gene editing system-CRISPR-Cas9[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9604.
- [20] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57.
- [21] HILLARY V E, CEASAR S A. A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering[J]. *Mol Biotechnol*, 2023, 65(3): 311-325.
- [22] BHARATHKUMAR N, SUNIL A, MEERA P, et al. CRISPR/Cas-based modifications for therapeutic applications: a review [J]. *Mol Biotechnol*, 2022, 64(4): 355-372.
- [23] LI S Y, CHENG Q X, LIU J K, et al. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. *Cell Res*, 2018, 28(4): 491-493.
- [24] O'CONNELL M R. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR-Cas systems. [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(1): 66-87.
- [25] LIU L, LI X, WANG J, et al. Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 121-134. e12.
- [26] LIU L, LI X, MA J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 714-26. e10.
- [27] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [28] HUANG M, ZHOU X, WANG H, 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.
- [29] 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.
- [30] ZHANG Y, QIAN L, WEI W, 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.
- [31] GUK K, KEEM J O, HWANG S G, 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.
- [32] HAJIAN R, BALDERSTON S, TRAN T, et al. Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6): 427-437.
- [33] KUMAR M, GULATI S, ANSARI A H, et al. FnCas9-based CRISPR diagnostic for rapid and accurate detection of major SARS-CoV-2 variants on a paper strip[J]. *Elife*, 2021, 10.
- [34] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [35] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [36] BROUGHTON J P, DENG X, YU G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 870-874.
- [37] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. *Cell Discov*, 2018, 4(1): 20.
- [38] YAN W X, HUNNEWELL P, ALFONSE L E, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91.
- [39] BHATT A, FATIMA Z, RUWALI M, et al. CLEVER assay: a visual and rapid RNA extraction-free detection of

- SARS-CoV-2 based on CRISPR-Cas integrated RT-LAMP technology[J]. *J Appl Microbiol*, 2022, 133(2): 410-421.
- [40] SUN Y, YU L, LIU C, et al. One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 74.
- [41] 栾天, 龚俊, 栾慧, 等. 利用 CRISPR/Cas12a 技术快速检测胸膜肺炎放线杆菌方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(8): 843-847.
- [42] MUKAMA O, WU J, LI Z, 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.
- [43] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [44] 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.
- [45] CHEN Q, GUL I, LIU C, et al. CRISPR-Cas12-based field-deployable system for rapid detection of synthetic DNA sequence of the monkeypox virus genome [J]. *J Med Virol*, 2023, 95(1): e28385.
- [46] DAI Y, SOMOZA R A, 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 Engl*, 2019, 58(48): 17399-17405.
- [47] ZHANG D, YAN Y, QUE H, et al. CRISPR/Cas12a-mediated interfacial cleaving of hairpin DNA reporter for electrochemical nucleic acid sensing[J]. *ACS Sens*, 2020, 5(2): 557-562.
- [48] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [49] 李小辉, 栗斌, 寇志华, 等. 基于 CRISPR-Cas13a 和 RT-RAA 的 HIV 核酸检测方法的建立[J]. *中国艾滋病性病*, 2022, 28(3): 264-270.
- [50] 殷宏, 金涌, 王玉峰, 等. 基于 CRISPR-Cas13a 无扩增直接检测 H7 亚型禽流感病毒方法[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2022, 45(1): 1-4.
- [51] ZHANG Q, LI J, LI Y, et al. SARS-CoV-2 detection using quantum dot fluorescence immunochromatography combined with isothermal amplification and CRISPR/Cas13a[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 202: 113978.
- [52] ZHANG X, TIAN Y, XU L, et al. CRISPR/Cas13-assisted hepatitis B virus covalently closed circular DNA detection[J]. *Hepato Int*, 2022, 16(2): 306-315.
- [53] HU F, LIU Y, ZHAO S, et al. A one-pot CRISPR/Cas13a-based contamination-free biosensor for low-cost and rapid nucleic acid diagnostics [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 202: 113994.
- [54] LIU T Y, KNOTT G J, SMOCK D C J, et al. Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(9): 982-988.
- [55] MYHRVOLD C, FREIJE C A, GOOTENBERG J S, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [56] ARIZTI-SANZ J, FREIJE C A, STANTON A C, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5921.
- [57] MAHAS A, MARSIC T, LOPEZ-PORTILLO MASSON M, et al. Characterization of a thermostable Cas13 enzyme for one-pot detection of SARS-CoV-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(28): e2118260119.
- [58] CHEN Y, QIAN S, YU X, et al. Microfluidics: the propellant of CRISPR-based nucleic acid detection [J]. *Trends Biotechnol*, 2023, 41(4): 557-574.
- [59] QIN P, PARK M, ALFSON K J, et al. Rapid and fully microfluidic ebola virus detection with CRISPR-Cas13a [J]. *ACS Sens*, 2019, 4(4): 1048-1054.
- [60] ACKERMAN C M, MYHRVOLD C, THAKKU S G, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13 [J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 277-282.
- [61] WELCH N L, ZHU M, HUA C, et al. Multiplexed CRISPR-based microfluidic platform for clinical testing of respiratory viruses and identification of SARS-CoV-2 variants [J]. *Nat Med*, 2022, 28(5): 1083-1094.

(收稿日期: 2023-03-03 修回日期: 2023-06-26)

• 综述 •

SEPT9 甲基化检测在结直肠癌早期诊断中价值的研究进展

董悠悠 综述, 陈昌国[△] 审校

解放军总医院第六医学中心检验科, 北京 100048

摘要: 结直肠癌是我国常见恶性消化道肿瘤之一, 其发病率逐年上升且预后不好, 病死率较高。早发现、早诊断可有效降低结直肠癌致死率。目前, 临床用于结直肠癌诊断及监测的肿瘤标志物有癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 19-9(CA199)、糖类抗原 242(CA242)等, 这些标志物在结直肠癌早期诊断中的临床价值不够理想。因

[△] 通信作者, E-mail: 1234_chen@sina.com。网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230801.1152.002.html> (2023-08-01)