

DOI:10.13350/j.cjpb.221123

• 综述 •

## CRISPR 在临床疾病诊断中的应用\*

张晓宇,张郁勃,沈方园,葛萧,李猛,李恒\*\*

(潍坊医学院医学检验学院,山东潍坊 261053)

**【摘要】** 由成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统是细菌、古生菌特有的自身免疫系统,当外源基因入侵细菌时,CRISPR 可特异性的识别并利用 Cas 蛋白对外源基因进行特异切割,从而达到自我防御的目的。CRISPR/Cas 系统因其高效、特异、高灵敏度、且成本低廉的优势,在基因编辑、农业、医学、食品、环境等领域具有广阔前景。本文介绍了 CRISPR 系统的原理、技术特点及类别等,对基于 CRISPR 系统的多种核酸检测工具的优缺点进行了比较,综述了 CRISPR 在金属离子、蛋白质、小分子检测、临床诊断与治疗等方面的应用展望。

**【关键词】** CRISPR/Cas; 核酸检测; 小分子检测; 综述

**【中图分类号】** R37

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)11-1349-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Nov. ;17(11):1349-1355.]

### Application of CRISPR in pathogen detection

ZHANG Xiao-yu, ZHANG Yu-bo, SHEN Fang-yuan, GE Xiao, LI Meng, LI Heng (*Department of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China*)

**【Abstract】** The CRISPR/Cas system composed of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas) is a unique autoimmune system of bacteria and archaea. When exogenous genes invade bacteria, CRISPR can specifically recognize and use Cas protein to specifically cleave exogenous genes for self-defense. Because of its high efficiency, specificity, high sensitivity and low cost, CRISPR/Cas system has broad prospects in gene editing, agriculture, medicine, food and environment. In this paper, we introduce the principle, technical characteristics and categories of CRISPR system, compare the advantages and disadvantages of various nucleic acid detection tools based on CRISPR system, and summarize the application of CRISPR in metal ions, proteins, small molecule detection, clinical diagnosis and treatment.

**【Key words】** CRISPR/Cas; nucleic acid detection; small molecule detection; review

\*\*\*成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)于1987年在大肠埃希菌中首次被发现<sup>[1]</sup>, 2012年 Jennifer Doudna 和 Emmanuelle Charpentier<sup>[2]</sup>第一次将 CRISPR 和 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)组成的 CRISPR/Cas 系统作为基因编辑工具,证明了在双链 RNA 指导下 Cas 蛋白可以精确切割双链 DNA。自此,CRISPR 技术迎来革命式的进步。CRISPR/Cas 介导的免疫防御包括适应、表达和干扰 3 个阶段<sup>[3]</sup>。当外源基因入侵细菌时,免疫防御进入适应阶段,细菌获取外源基因,并切割成一定长度的间隔区序列插入到自身基因组中,当外源基因再次入侵,CRISPR 基因组转录出带有间隔区序列的 RNA(CRISPR RNA, crRNA)与 Cas 蛋白形成复合体发挥切割作用,从而达到自我防御目的。通过设计 crRNA 的序列,使 crRNA/Cas 蛋白复合体特异识别外源片段,激活 Cas 蛋白的核酸剪切酶活性,对体系中的外源片段发挥切割作用。CRISPR/Cas 系统具有灵活、便捷、高效的特点,已被广泛应用于肿瘤功能基因筛选、信号通路研究、药物靶点及耐药靶点筛选等领域。作为一种高通量基因筛选技术,CRISPR/Cas 系统有望更高效、全面地筛选出靶标基因,为临床疾病的诊治提供新思路、新方法。

### 1 CRISPR/Cas 系统的分型

原核生物的 CRISPR/Cas 适应性免疫系统根据效应子模块组织分为两个不同的类别。1 类 CRISPR/Cas 系统利用多蛋白效应复合物,2 类 CRISPR/Cas 系统利用单一蛋白效应器。基于不同的效应蛋白家族,1 类系统分为 3 种类型和 12 种亚型<sup>[4]</sup>;2 类系统可分为 3 种类型和 9 个亚型<sup>[5]</sup>。CRISPR/Cas 系统有众多 Cas 蛋白分型,下文针对常见的 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12、CRISPR/Cas13 进行了简要分析(表 1)。

**1.1 CRISPR/Cas9** CRISPR/Cas 系统中 crRNA 与 tracrRNA(反式激活的 crRNA)形成嵌合 RNA 分子,即 sgRNA (Single guide RNA)。sgRNA 通常有 100 个核苷酸,通过碱基配对,5' 端 20nt 的 DNA 与靶 DNA 序列杂交,可以介导 Cas9 蛋白在特定序列处进行切割,导致靶 DNA 双链断裂。Cas9 核酸酶有两个内切酶功能域:RuvC 和 HNH<sup>[6]</sup>。Cas9 在与靶基

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81902170)。

\*\* **【通讯作者】** 李恒, E-mail: Leehome1985@163.com

**【作者简介】** 张晓宇(1998-),女,山东济宁,硕士,主要从事结核分枝杆菌的分子诊断的研究。E-mail: zhangxiaoyu1143@163.com

因结合时发生构象变化,最终导致靶 DNA 内的双链断裂,这种双链的断裂可以通过细胞的非同源末端连接和同源末端连接进行修复,但在修复过程中,尤其是非同源末端连接可能会导致无关序列的连接或碱基的缺失<sup>[7]</sup>。

表 1 CRISPR/Cas 系统的特点  
Table 1 Characteristics of the CRISPR/Cas System

Cas 蛋白类型 Cas protein type	顺式切割 Cis-cleavage	反式切割 Trans-cleavage	PAM 位点 Protospacer adjacent motif	sgRNA 大小 (bp) sgRNA size (bp)	
Class 1	I (Cas3)	DNA	5'-AAG-3'	-	
	III (Cas10)	RNA	RNA, ssDNA	-	
	IV (Csf1)	-	-	-	
Class 2	II (Cas9)	DNA	5'-NGG-3', 5'-NNG-3' 等	20-24	
	V (Cas12)	DNA	5'-TTN-3', 5'-TTN-3' 等	24	
	VI (Cas13)	RNA	RNA	PFS	28

注:N表示 A、T、C、G 碱基中任一种;Cas3、Cas10、Csf1、Cas9、Cas12、Cas13 均为具有代表性的 6 种亚型 Cas 蛋白。

**1.2 CRISPR/Cas12** Cas12 和 Cas9 具有相似的结构形状,包含一个单一的 RuvC 核酸酶结构域,该结构域可以特异性识别并切割 PAM (protospacer adjacent motif) 序列附近的双链 DNA (double stranded DNA, dsDNA),非特异性地切割任意单链 DNA<sup>[8]</sup> (single stranded DNA, ssDNA)。与 Cas9 形成切割复合体需要 tracrRNA 和 crRNA 两种 RNA 不同的是,Cas12a 仅需 crRNA 即可发挥切割作用<sup>[9]</sup>;Cas12a 所识别的 PAM 序列富含 T,通常是 5'-TTN-3',位于间隔蛋白上游;另外,Cas12a 切割靶 DNA 产生粘性末端,更加有利于目的基因的插入<sup>[10]</sup>,且脱靶效应更低<sup>[11,12]</sup>。

**1.3 CRISPR/Cas13** CRISPR/Cas13 由 Cas13a、Cas13b、Cas13c 和 Cas13d 四种亚型组成,与 Cas12、Cas9 不同的是,CRISPR/Cas13 中的一个 DNA 酶结构域被两个高等真核生物和原核生物核苷酸结合域 (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding domain, HEPN) 所取代用于切割 RNA。Cas13a 不仅可以特异识别并切割靶 RNA,还可以非特异切割体系内任意的单链 RNA,这一特性被称为 Cas13a 的附带切割活性 (Collateral cleavage)<sup>[13]</sup>。

**1.4 其他 CRISPR/Cas 分型** 随着研究的深入,越来越多的 Cas 蛋白被鉴定发现。几乎普遍存在的 Cas1 和 Cas2 作为适应蛋白在各种 CRISPR/Cas 系统中发挥作用<sup>[14]</sup>。有研究表明,Cas3 亦可作为基因编辑工具,精确度极高,在真核系统中有巨大的基因编辑潜力和应用价值<sup>[15]</sup>。CRISPR/Cas3 可以有效地清除人类基因组中目标位置的长片段 DNA,还可以有效地筛选非编码遗传元件和长序列 DNA,是少有的高质量大规模编辑工具<sup>[16]</sup>。

**2 基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测原理**

目前,临床上应用最广泛的核酸检测方法包括实时荧光定量 PCR (qPCR)、荧光原位杂交 (FISH) 和新一代测序 (NGS),但以上三种方法在操作,仪器,实验环境等方面存在局限性,无法作为适用于所有场景的金标准检测方法。CRISPR 系统灵敏度高、特异性强、灵活便携,在临床核酸检测领域具有巨大的潜

力。根据各种 Cas 酶被开发使用的时间顺序,文章对多种经典的 CRISPR 核酸检测技术进行了汇总及讨论。

**2.1 Cas9 介导的核酸检测技术** Cas9 是使用最广泛的效应蛋白之一。除野生型 Cas9 外,目前已开发出多种变体,如丧失酶切活性的 Cas9 (dead Cas9, dCas9)、含切口酶型 Cas9 (Cas9 nickase, Cas9n) 等应用于核酸检测,常见的方法有 3 类<sup>[17]</sup>: (I) 单链向导 RNA 引导的 Cas9 切割 dsDNA,其中靶标 DNA 被特异性识别以启动 Cas9 的切割活性,最终引起靶标 DNA 双链的断裂 (图 1a); (II) sgRNA 引导的 dCas9 靶向结合 DNA,通过将酶或荧光或显色化合物转运到所需位置进行检测 (图 1b); (III) sgRNA 引导的 Cas9n 使靶标 DNA 产生单链断裂,并不会造成 DNA 双链的断裂,随后加入与 DNA 单链断裂处特异性结合的引物对,即可实现 DNA 单链的扩增,产生丰富的 dsDNA 扩增子,用于核酸检测 (图 1c、1d)。

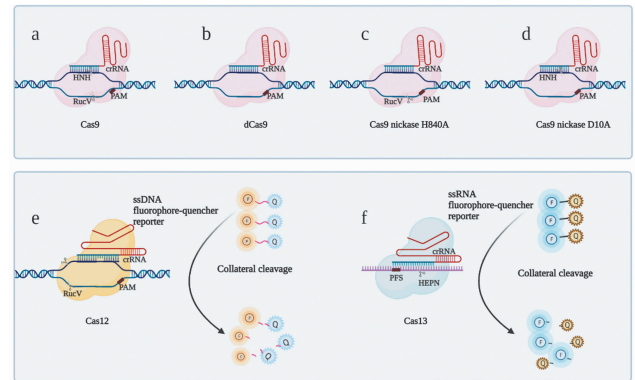


图 1 基于不同 CRISPR/Cas 系统切割核酸原理示意图  
Fig.1 Principles for Nucleic Acid Cutting Based on Different CRISPR/Cas Systems

**2.2 Cas12/Cas13 介导的核酸检测技术** Cas12/Cas13 核酸检测主要依赖于 CRISPR/Cas 系统对靶序列的特异性识别能力,而信号的产生则依赖于 Cas 蛋白的附带切割活性。其中 Cas12a 靶向 ssDNA, Cas13a 靶向 ssRNA。当 Cas 蛋白、crRNA、靶序列特异性识别形成复合物后,即可激活 Cas12/Cas13 的附带切割活性。该活性可以切割检测体系中的短 ssRNA 或 ssDNA 报告分子,产生检测信号 (图 1e、1f)。报告分子有两端是荧光基团和淬灭剂,当荧光基团在附带切割活性作用下与淬灭剂分离时发出荧光;及两端是荧光素和生物素,配合侧向流动测试条即可显示结果。

**3 基于 CRISPR/Cas 系统检测方法的临床应用**

随着对 CRISPR/Cas 系统的深入研究,科研人员发现此系统具有极高特异性与灵敏度,可作为新型传感器应用于核酸检测,如感染性疾病诊断、药敏检测和癌症诊疗等方向;另有一些研究表明,CRISPR/Cas 系统也可用于金属离子、蛋白质和小分子等非核酸的检测。下文对基于 CRISPR/Cas 系统检测方法的临床应用进行了汇总与讨论 (表 2、表 3)。

**3.1 CRISPR 技术在感染性疾病诊断中的应用**

**3.1.1 Cas9 介导的病原体核酸检测方法** 2016 年,Pardee 等提出了一种基于 Cas9 的具有单碱基分辨率的寨卡变异基因分型方法,称为核酸序列扩增 CRISPR 裂解检测方法<sup>[18]</sup> (nucleic acid sequence-based amplification CRISPR cleavage,

NASBACC),可以用来检测血样中的寨卡病毒。该方法首先对寨卡病毒 RNA 序列通过 NASBA 进行预扩增,期间得到足够多的目标中间体 dsDNA。在 PAM 序列和相邻靶位点存在的情况下,目标中间体 dsDNA 可以被 Cas9/sgRNA 复合物切割,导致 NASBA 反应被阻断,因而不能扩增出足够的 RNA 用于

检测,但当扩增过程中得到的是非目标中间体时则不会被 Cas9/sgRNA 复合物切割 dsDNA 中间体保持完整,以便可以继续后续的扩增和检测。NASBACC 可以在数小时内准确地对非洲和美国寨卡变异体进行基因分型,这是 Cas9 首次用于核酸生物传感试验。

表 2 基于 CRISPR 的病原微生物核酸检测系统  
Table 2 CRISPR-based nucleic acid detection system for pathogenic microorganisms

分类 Type	核酸检测系统 Detection system	靶标 Target	扩增方法 Amplification method	检测方法 Detection method	检测时间 Detection time	灵敏度 Sensitivity	特异性 Specificity	参考文献 References
基于 Cas9 的检测系统	NASBACC	寨卡病毒	NASBA	颜色变化	2-6 h	fM	高	[18]
	CASEXPAN	李斯特菌	EXPAN	荧光信号	1 h	aM	高	[19]
	CASLFA	李斯特菌等	RPA/PCR	条带显色	3-4 h	150-200 copies	高	[20]
	CADD	人类乳头瘤病毒	无	荧光信号	0.5 h	fM	高	[21]
基于 Cas12 的检测系统	DETECTR	人类乳头瘤病毒	RPA	荧光信号	1 h	aM	高	[22]
	STOP	新型冠状病毒	LAMP	荧光信号	1 h	100 copies	高	[24]
	HOLMES	伪狂犬病毒等	PCR	荧光信号	1 h	aM	高	[25]
	HOLMESv2	乙脑病毒	LAMP	荧光信号	1 h	aM	高	[26]
	SHERLOCK	寨卡病毒等	RPA	荧光信号	2-5 h	$2 \times 10^{-8}$ M	高	[27]
基于 Cas13 的检测系统	SHERLOCKv2	寨卡病毒、戈登热病毒等	RPA	荧光信号 条带显色	0.5-4 h	$8 \times 10^{-21}$ M	高	[30]
	CARVER	甲型流感病毒等	RPA	条带显色	2 h	-	高	[31]
	手机检测法 串联核酸酶法	新型冠状病毒 新型冠状病毒	无 无	荧光信号 荧光信号	0.5 h 0.5 h	$10^{-4}$ M $3.1 \times 10^{-5}$ M	高 高	[32] [33]

表 3 基于 CRISPR 的非病原微生物检测系统  
Table 3 CRISPR-based detection system for non-pathogenic microorganisms

核酸检测系统 Detection system	Cas 酶 Cas type	辅助成分 Auxiliary component	检测物质 Detection component	检测方法 Detection method	检测时间 Detection time	灵敏度 Sensitivity	特异性 Specificity	参考文献 References
CaT-SMolor	Cas12a	aTFs	小分子	荧光信号	5-25 min	fM	高	[42]
-	Cas12a	DNAzymes	金属离子	荧光信号	-	-	高	[44,45]
CARPID	dCasRx	lncRNAs	蛋白质	荧光显色	-	-	高	[46]
PICASSO	dCas9	抗体	蛋白质	荧光显色	-	-	高	[47]

在随后的研究中,CRISPR/Cas9 与等温扩增技术相结合,开发出了多种高灵敏度和特异性的核酸检测器,如:CASEXPAN 单链核酸生物传感器<sup>[19]</sup>,是将 CRISPR/Cas9 与指数扩增反应(EXPAN)相结合。Cas9 在含 PAM 位点的独立寡核苷酸的帮助下将 ssDNA 切割成短片段,短片段可作为引物启动 EXPAN 过程,得到丰富的扩增产物。该方法已被应用于快速高效地检测出李斯特菌 DNA。与上述生物传感器相比,CRISPR/Cas9 介导的侧流核酸试验(CRISPR/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay,CASLFA)<sup>[20]</sup>,无需依赖复杂的设备,通过将 Cas9 的切割作用整合到试纸条中实现了检测的可视化。利用 RPA(Recombinase Polymerase Amplification)或 PCR 扩增方法,CASLFA 检测微生物基因组 DNA 的灵敏度达到 150-200 拷贝/反应,可以区分单核细胞增生李斯特菌,交叉反应少。以上检测方法避免了试剂转移过程中的污染,但还是需要加热、扩增等步骤,在此基础上,东南大学研究团队开发了 CADD(CRISPR-Cas9-assisted DNA detection)<sup>[21]</sup> 检测平台,CADD 中提到了 Beads-HCR(磁珠-荧光杂交链式反应)方法。检测时,dCas9-sgRNA(包含 sgRNAa 和 sgRNAb)首先与靶 DNA 结合形成 dCas9-sgRNA-DNA 复合物,sgRNAa 序列与偶联在磁珠上的寡核苷酸结合,将 dCas9-sgRNA-DNA 复合物捕获到磁珠表面;sgRNAb 序列与由荧光素标记的信号报告分子

DNA 特异性结合,形成由荧光素标记的 dCas9-sgRNA-DNA-信号报告分子复合物,故通过 HCR 可以在磁珠表面产生荧光信号用于检测靶 DNA。

3.1.2 Cas12 介导的病原体核酸检测方法 2019 年,Jennifer Doudn 等开发了 Cas12a 内切酶靶向检测平台 DETECTR(CRISPR Trans Reporter)<sup>[22]</sup>。该平台利用等温扩增和 Cas12a 附带切割活性进行检测,能够专一地对两株人乳头瘤病毒株进行高精度鉴别。张文宏团队开发的 CRISPR-MTB 检测平台实现了结核病的快速诊断<sup>[23]</sup>,通过对 179 名患者的筛查,CRISPR-MTB 展现出了相比培养法和 Xpert 更高的灵敏度(79% vs 33%、66%),并且对样本要求更低,周期更短,表现出极大的优越性。但以上核酸检测过程中需要反复开盖提取,张锋在 2020 年,推出“一根管”技术用于 COVID-19 病毒的检测,检测过程中的 COVID-19 病毒以及所有反应被整合在一个试管中完成,团队将此技术命名为 STOP(SHERLOCK Testing in One Pot)<sup>[24]</sup>。他们选择了环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)联合 AapCas12b 进行反应,AapCas12b 可以在 LAMP 反应所需的 60 °C 下保持活性;同时简化了提取 RNA 的步骤,只需要在含有 COVID-19 病毒的咽拭子或唾液样本中加入裂解病毒的试剂,就可以将释放出来的病毒 RNA 用于检测,避免了核酸检测过程中反复开盖造成的

假阳性影响。王金团队推出的一小时低成本多用途高效系统 (an one-hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System, HOLMES)<sup>[25]</sup> 与 DETECTR 的原理相似, 具有快速、经济、多重、高效的特点, 与 DETECTR 不同的是, 它既可以检测 DNA 病毒, 如伪狂犬病病毒; 还可以检测 RNA 病毒, 如乙型肝炎病毒。随后此团队又推出了 HOLMESv2 系统<sup>[26]</sup>, 针对部分序列没有 PAM 位点的情况, 通过在 LAMP 引物中引入 PAM 位点方法来扩增靶 DNA, 将 PAM 位点引入引物后, 其扩增后产生的 dsDNA 产物则都带有 PAM 位点, 即可以被 Cas12b 识别和切割, 进而激活 Cas12b 的附带切割活性。

**3.1.3 Cas13 介导的病原体核酸检测方法** 2017 年张锋等开发了一种名为 SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unlocked) 的检测平台, 该平台结合了等温扩增技术和 Cas13a 的附带切割作用, 用于检测单个 RNA 分子<sup>[27]</sup>; SHERLOCK 具有较高的特异性, 可以较好的区分亲缘关系相近的寨卡病毒和登革热病毒。基于 Cas13 蛋白的 SHERLOCK 系统不仅被用于检测病毒, 多个团队将其用于疟疾的检测<sup>[28-29]</sup>, 实现了超敏锐地检测和区分恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫和其他疟原虫。随后, 张锋推出了将 SHERLOCKv2<sup>[30]</sup> 检测平台和 Cas13 的抗病毒活性与其诊断能力结合起来的 CARVER 系统 (Cas13-assisted restriction of viral expression and readout)<sup>[31]</sup>, 用以检测和破坏人类细胞中的 RNA 病毒。CARVER 系统可用于甲型流感病毒等的检测, 检测结果可以直观地展示在试纸条上, 整个过程只需要不到 2 h。2021 年 Fozouni 等<sup>[32]</sup> 开发了一款连接智能手机的 COVID-19 病毒检测技术, 从取样到手机报告结果, 仅需 15~30 min, 进一步缩短了检测时间。此前 CRISPR 诊断要求病毒 RNA 在被检测之前逆转录为 DNA 并进行扩增, 而这项研究跳过了逆转录和扩增步骤, 使用 CRISPR 直接定量检测病毒 RNA, 降低了实验污染概率。Csm6 是一种 Cas 酶, 可以感知小环状 RNA 的存在, 并切割细胞中的各种 RNA 分子, 被认为是反应中的“放大镜”。利用这一特性, Liu 等<sup>[33]</sup> 进一步将 Cas13、Csm6 及其激活剂结合使用, 创造串联核酸酶方法用以检测 COVID-19 病毒, 避免了 RNA 的原始扩增, 以及扩增后带来的样本交叉污染的可能性。

**3.2 CRISPR 技术在耐药分析及治疗中的应用** 由于环境的多变以及抗生素的滥用使得临床疾病诊疗出现越来越多天然性耐药和获得性耐药的情况, 故病原体耐药性的分析诊断和如何解决多重耐药一直都是临床诊断的难题。随着 CRISPR 技术的发展, 更多成熟的检测系统被开发应用于耐药性的分析及治疗中, 不仅可以运用 CRISPR/Cas9 技术构建携带靶基因突变的稳定细胞系, 为乳腺癌药物敏感性及耐药靶点的筛选提供良好的平台<sup>[34]</sup>, 还可以利用 Cas 蛋白的特异性切割作用筛选突变病原体。拉米夫定是第一个被批准用于治疗慢性乙型肝炎的药物, 乙肝病毒的 YMDD 变异是引起拉米夫定耐药的主要机制。通过设计与 YMDD 突变体特异性结合的 crRNA, 可以用来检测耐药性乙型肝炎病毒<sup>[35]</sup>, 同时联合 PCR 开发 CRISPR-PCR 检测平台, 能够实现相比传统检测方法灵敏度更高、特异性更强的检测。利用同种原理, CRISPR 技术还被应用于检测耐药性甲型流感病毒 (pH1N1/H275Y)<sup>[36]</sup>、与抗疟药物

抗性有关的 A581G 突变型恶性疟原虫<sup>[28]</sup>、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌<sup>[37]</sup> 等。为了恢复细菌对抗生素的敏感性, Kim 等<sup>[38]</sup> 研发出一种抗生素耐药再增敏 (ReSAFR) 技术, 该技术通过 sgRNA 引导 Cas9 特异性切割与靶基因存在于同一质粒上的耐药性基因, 从而使抗生素耐药细胞重新敏感, ReSAFR 的发展有望成为临床耐药治疗的重大突破。

**3.3 CRISPR 技术在癌症诊疗中的应用** 近年来, MicroRNA (miRNA) 已被报道与肿瘤的发生、诊断及预后相关, Qiu 等<sup>[39]</sup> 基于 dCas9 建立的 RCH (RCA-CRISPR-split-HRP, RCH) 检测系统首次实现了 CRISPR/Cas9 技术对 miRNA 的检测, 此系统具有 fM 水平的灵敏度、单碱基的特异性, 并且已被证实可用于非小细胞癌的诊断。利用 DETECTR、CADD 等系统用于宫颈癌的诊断也在飞速发展, 其中以 HPV16、HPV18 亚型的诊断最为常见, DETECTR 检测 HPV16 感染的准确率高达 100%, 检测 HPV18 感染的准确率达 92%, 其灵敏度可达到 aM 水平。基于 PCR 扩增和 CRISPR/Cas12a 的 DNA 检测原理, Li 等<sup>[40]</sup> 通过肿瘤源性细胞外囊泡 (TEVs) 上蛋白靶标特异性结合的适配体与 Cas12a 结合来检测血清中超低浓度的 CD109<sup>+</sup> 和 EGFR<sup>+</sup> TEVs, 用于鼻咽癌的诊断和预后。同时此方法采用适配体作为靶蛋白的鉴定分子, 将蛋白信号转化为核酸信号, 可用于各种靶蛋白的检测。

**3.4 CRISPR 技术非核酸分子检测中的应用** CRISPR/Cas 系统可与功能性核酸 (FNAs) 和分子传感器 (molecular translators) 结合使用, 将非核酸的检测转化为检测靶标核酸, 该技术已被用于金属离子、蛋白质和小分子<sup>[41-43]</sup> 等的检测。

变构转录因子 (aTFs) 能够与小分子和特定的 dsDNA 结合, 是一种极具开发价值的小分子检测生物识别元件。aTFs 与小分子结合后会影响到 DNA 结合的敏感性, 梁敏东等将 aTFs 与 CRISPR/Cas12a 的 DNA 切割能力结合, 开发了一种简单、灵敏、快速和高通量的小分子检测平台, 命名为 CaT-SMelor (CRISPR/Cas12a and aTF-mediated small molecule detector)<sup>[42]</sup>。CaT-SMelor 已成功检测各种小分子, 包括尿酸和对羟基苯甲酸及其结构相似的类似物。研究还证明, CaT-SMelor 直接测量了临床人类血液样本中的尿酸浓度, 表明 CaT-SMelor 在检测小分子方面有很大潜力。

金属依赖性 DNA 酶仅在金属离子辅助因子存在的情况下才能切割其底物。因而 DNA 酶底物可被设计为与 crRNA 互补的单链 DNA, 从而激活 CRISPR/Cas12a 的活性, 进行金属离子的检测。例如, Na<sup>+</sup> 依赖性 DNA 酶与 CRISPR/Cas12a 配对用于检测 Na<sup>+</sup><sup>[44]</sup>。多种金属依赖性 DNA 酶 (例如 Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 等) 提供了开发 CRISPR/Cas12a 配对的机会, 用于选择性地检测多种金属离子<sup>[45]</sup>。

香港大学结合 CRISPR-CasRx 与邻近生物素标记技术开发了一种 CRISPR 辅助 RNA-蛋白相互作用检测方法 (CARPID)<sup>[46]</sup>。CRISPR-CasRx 是一种可以靶向 RNA 的可编程系统, 利用其靶向功能接近与蛋白质结合的长链非编码 RNAs (lncRNAs), 可将 CARPID 系统中的部分组件靠近 lncRNAs; 邻近生物素标记技术可用来确定蛋白质定位, 利用生物素连接酶 (BASU) 将生物素添加到与目标 RNA 结合的蛋白质上进行标记, 加入一种生物素结合蛋白可识别被 BASU 标记的蛋白, 从而可以检测任意长度或浓度的 RNA 结合蛋白。肽

检测平台 PICASSO 可以作为一种工具来识别患者血液样本中的抗体<sup>[47]</sup>。通过将重组肽融合到 dCas9 蛋白中,构建一个以 sgRNA 序列为标识的肽序列库。基于此方法,目前研究人员正使用 PICASSO 平台检测各种病原体的结合抗原抗体,包括正在康复的 COVID-19 患者血液中的 SARS-CoV-2 相关抗体。

#### 4 优势与挑战

对比传统的检测方法,基于 CRISPR/Cas 系统的病原体检测方法具有以下优点:(1)成本低。不需要昂贵的精密仪器,极大降低了检测成本。(2)灵敏度高。通过与恒温扩增技术相结合,提高灵敏度。(3)可视化。结合侧向流层析,可将检测结果直观的展示于试纸条上。(4)操作简便,耗时短。简化了实验步骤,提高了检测效率,缩短了检测所需时间。(5)多重检测<sup>[30]</sup>。利用具有不同切割靶向的 Cas 酶可实现对多种靶标分子的同时检测,展现出 CRISPR 系统在多重检测中的巨大潜力。

虽然基于 CRISPR/Cas 技术所建立的各种检测方法在病原体核酸检测、临床疾病诊断等方面取得了巨大的突破,但仍存在许多挑战和局限性。

(1)脱靶效应。即由于 sgRNA 与非靶点序列结合而发生意外的剪切<sup>[48]</sup>。当 CRISPR 技术用于核酸检测时,脱靶效应的存在可能造成检验结果的假阳性或假阴性,影响临床诊断的准确性。PAM 序列与 sgRNA 序列<sup>[49,50]</sup>的错配问题是目前引起脱靶效应的关键,Fu 等通过细胞实验证实脱靶效应可高达 66%<sup>[51]</sup>。因此,如何检测和减少脱靶效应已成为 CRISPR 技术亟待解决的问题。如 GUIDE-seq<sup>[52]</sup>、Digenome-seq<sup>[53]</sup>、CIRCLE-seq<sup>[54]</sup>、DISCOVER-Seq<sup>[55]</sup>等技术已被广泛应用于检测脱靶效应。杜克大学科学家通过在 sgRNA 上添加一段序列<sup>[56]</sup>,这段序列向后折叠,与其自身结合,形成一个“发夹”结构。由于 sgRNA 更倾向于与 DNA 结合,因此靶 DNA 序列可以打开“发卡”结构,反之无法特异性识别及发挥作用。此技术将 CRISPR 系统的准确性平均提高 50 倍,改善其自身的脱靶效应。通过优化/改进 sgRNA、dCas9 和采用 Cas9 类似物,已成功减少非特异性结合的发生,但脱靶率的降低有时也会导致靶向切割效率的降低。

(2)各种扩增反应所导致的假阳性风险。目前多种基于 CRISPR 技术的病原体检测平台,都需要一个初始扩增过程,如利用 LAMP、RPA 等扩增病原体靶标序列,从而提高整个检测系统的灵敏度。然而,扩增步骤的引入不仅增加了检测的复杂性,而且 CRISPR 原有的超灵敏和严格的 PAM 识别特性没有被完全利用,降低了 CRISPR 体系的优势,同时在扩增过程中,极易引起气溶胶污染,造成病原体检测假阳性结果。免扩增 CRISPR 检测技术可以避免此类假阳性的出现。目前,该技术分为以下三种策略<sup>[57]</sup>:(I)减少反应体积以增加靶标浓度。将靶标核酸和 CRISPR/Cas12a 反应试剂富集在微液滴反应器中,以此增加靶标核酸的局部浓度,同时开发双 crRNA 靶向液滴检测技术可实现单分子 DNA 定量,与已报道的 Cas12a 检测方法相比,灵敏度提高了 50 倍以上<sup>[58]</sup>,实现免扩增检测。(II)电化学生物传感器。如 E-CRISPR 系统<sup>[59]</sup>采用了灵敏更高的电化学生物传感器,在无需对靶标进行预扩增的条件下可以在 pM 水平上成功检测 HPV-16 和 HPV-18;利用 dCas9 和石墨

烯场效应晶体管结合构建获得的 CRISPR-Chip 平台<sup>[60]</sup>,可以实现 15 min 内检测到 1.7fM 水平的靶标,实现了在杜氏肌营养不良症患者未扩增的 DNA 样本中检测到肌营养不良蛋白基因的缺失;将 CRISPR/Cas13a、电化学和微流控技术结合起来的核酸检测体系<sup>[61]</sup>,可以在 9min 内实现潜在肿瘤标志物 miR-19b 和 miR-20a 的定量。(III)Cas 蛋白介导的级联放大。级联放大的策略在常规核酸检测中较为常见,如上文提到的串联 Cas13、Csm6 及其激活剂用于检测 COVID-19 病毒;聂舟团队发明的 CONAN 系统<sup>[62]</sup>则是通过巧妙设计一种特殊的 DNA/crRNA 杂合体,实现了 Cas12a 的自激活放大反应。在反应体系中加入 crRNA 激活 Cas12a 的附带切割活性,DNA/crRNA 杂合体被切割,形成游离的 crRNA;游离的 crRNA 进一步通过特异性的识别激活 Cas12a 的附带切割作用,继续解离更多的 crRNA,从而达到正反馈循环、快速放大信号的目的。

(3)过度依赖 PAM 位点所导致检测序列的限制性。crRNA 对靶标的识别高度依赖 PAM 序列,虽然增加了检测体系的特异性,但同时也降低了 crRNA 靶标序列选择和设计的灵活性。王金团队开发的 HOLMESv2 系统,通过在 LAMP 引物中引入 PAM 位点的方法,实现了扩增后的 dsDNA 产物均含 PAM 位点,用于 crRNA 的识别,从而激活 Cas12b 的附带切割活性,有效解决了 PAM 位点所导致的局限性。

综上,CRISPR 具有高效、便捷、适用范围广特点,随着新开发的检测平台和更多新型 Cas 直系同源物的出现,CRISPR 系统在为临床疾病的诊治提供理论基础。

#### 【参考文献】

- [1] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *Bacteriol*,1987,169(12):5429-5433
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*,2012,337(6096):816-821
- [3] Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes [J]. *Nature*,2015,526(7571):55-61
- [4] Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems[J]. *Cell*,2017,168(5):946
- [5] Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems[J]. *Cell*,2017,168(1-2):328
- [6] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms [J]. *Annu Rev Biophys*,2017,46:505-529
- [7] 李金环. CRISPR/Cas9 系统在基因组 DNA 片段编辑中的应用及 DNA 切割断裂末端连接机制研究[D]. 上海:上海交通大学,2016
- [8] Paul B, Montoya G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications[J]. *Biomed*,2020,43(1):8-17
- [9] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*,2014, 346(6213):1258096
- [10] Cui Y, Tang Y, Liang M, et al. Direct observation of the formation of a CRISPR-Cas12a R-loop complex at the single-molecule level[J]. *Chem Commun (Camb)*,2020, 56(14): 2123-2126
- [11] Gao L, Cox D, Yan WX, et al. Engineered Cpf1 variants with

- altered PAM specificities[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(8):789-792
- [12] Kim D, Kim J, Hur JK, et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(8):863-868
- [13] 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
- [14] He Y, Wang M, Liu M, et al. Cas1 and Cas2 from the type II-C CRISPR-Cas system of *riemerella anatipestifer* are required for spacer acquisition[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8:195
- [15] Pickar-Oliver A, Black JB, Lewis MM, et al. Targeted transcriptional modulation with type I CRISPR-Cas systems in human cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(12):1493-1501
- [16] Dolan AE, Hou Z, Xiao Y, et al. Introducing a spectrum of long-range genomic deletions in human embryonic stem cells using type I CRISPR-Cas[J]. *Mol Cell*, 2019, 74(5):936-950
- [17] Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods[J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165:112430
- [18] 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
- [19] 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
- [20] 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
- [21] Xu X, Luo T, Gao J, et al. CRISPR-assisted DNA detection: A Novel dCas9-Based DNA Detection Technique[J]. *CRISPR*, 2020, 3(6):487-502
- [22] 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
- [23] Ai JW, Zhou X, Xu T, et al. CRISPR-based rapid and ultrasensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1):1361-1369
- [24] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics[J]. *medRxiv*, 2020
- [25] Li SY, Cheng QX, Wang JM, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discov*, 2018, 4:20
- [26] 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
- [27] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336):438-442
- [28] Cunningham CH, Hennelly CM, Lin JT, et al. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of *Plasmodium* detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping [J]. *EBioMedicine*, 2021, 68:103415
- [29] Lee RA, Puig H, Nguyen PQ, et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of *Plasmodium* species in symptomatic and asymptomatic malaria[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(41):25722-25731
- [30] 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
- [31] Freije CA, Myhrvold C, Boehm CK, et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13[J]. *Mol Cell*, 2019, 76(5):826-837
- [32] Fozouni P, Son S, Diaz DLD, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy[J]. *Cell*, 2021, 184(2):323-333
- [33] Liu TY, Knott GJ, Smock D, et al. Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases[J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(9):982-988
- [34] 高伟健, 朱一超, 郑幽, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 CDH1 基因敲除的人乳腺癌 MCF-7 稳定细胞系[J]. *生物技术通讯*, 2020, 31(2):155-159
- [35] Wang S, Li H, Kou Z, et al. Highly sensitive and specific detection of hepatitis B virus DNA and drug resistance mutations utilizing the PCR-based CRISPR-Cas13a system[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021, 27(3):443-450
- [36] Moon J, Kwon HJ, Yong D, et al. Colorimetric detection of SARS-CoV-2 and drug-resistant pH1N1 using CRISPR/dCas9 [J]. *ACS Sens*, 2020, 5(12):4017-4026
- [37] 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
- [38] Kim JS, Cho DH, Park M, et al. CRISPR/Cas9-mediated re-sensitization of antibiotic-resistant *Escherichia coli* harboring extended-spectrum beta-lactamases[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(2):394-401
- [39] Qiu XY, Zhu LY, Zhu CS, et al. Highly effective and low-cost MicroRNA detection with CRISPR-Cas9[J]. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(3):807-813
- [40] Li H, Xing S, Xu J, et al. Aptamer-based CRISPR/Cas12a assay for the ultrasensitive detection of extracellular vesicle proteins [J]. *Talanta*, 2021, 221:121670
- [41] Xiong Y, Zhang J, Yang Z, et al. Functional DNA regulated CRISPR-Cas12a sensors for point-of-care diagnostics of non-nucleic-acid targets[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(1):207-213
- [42] Liang M, Li Z, Wang W, et al. A CRISPR-Cas12a-derived biosensing platform for the highly sensitive detection of diverse small molecules[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):3672
- [43] 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
- [44] Peng H, Newbigging AM, Wang Z, et al. DNAzyme-mediated assays for amplified detection of nucleic acids and proteins[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(1):190-207
- [45] Hwang K, Mou Q, Lake RJ, et al. Metal-dependent DNAzymes for the quantitative detection of metal ions in living cells: Recent progress, current challenges, and latest results on FRET ratiometric sensors[J]. *Inorg Chem*, 2019, 58(20):13696-13708

- [46] Yi W, Li J, Zhu X, et al. CRISPR-assisted detection of RNA-protein interactions in living cells[J]. Nat Methods, 2020, 17(7):685-688
- [47] Barber KW, Shrock E, Elledge SJ. CRISPR-based peptide library display and programmable microarray self-assembly for rapid quantitative protein binding assays[J]. Mol Cell, 2021, 81(17):3650-3658
- [48] Diane CW, Xiangdong W. Off-target genome editing: A new discipline of gene science and a new class of medicine[J]. Cell Biology and Toxicology, 2019, 35(3):179-83
- [49] Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(2):184-191
- [50] Zhang XH, Tee LY, Wang XG, et al. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2015, 4:e264
- [51] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9):822-826
- [52] Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(2):187-197
- [53] Kim D, Bae S, Park J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells[J]. Nat Methods, 2015, 12(3):237-243
- [54] Tsai SQ, Nguyen NT, Malagon-Lopez J, et al. CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets[J]. Nat Methods, 2017, 14(6):607-614
- [55] Wienert B, Wyman SK, Richardson CD, et al. Unbiased detection of CRISPR off-targets *in vivo* using DISCOVER-Seq[J]. Science, 2019, 364(6437):286-289
- [56] Kocak DD, Josephs EA, Bhandarkar V, et al. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(6):657-666
- [57] Zhang J, Lv H, Li L, et al. Recent improvements in CRISPR-based amplification-free pathogen detection [J]. Front Microbiol, 2021, 12:751408
- [58] Yue H, Shu B, Tian T, et al. Droplet Cas12a assay enables DNA quantification from unamplified samples at the single-molecule level[J]. Nano letters, 2021;21(11):4643-4653
- [59] Dai Y, Somoza RA, Wang L, et al. Exploring the trans-cleavage activity of Crispr-Cas12a (cpfl) for the development of a universal electrochemical biosensor[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, 58(48):17399-17405
- [60] 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
- [61] 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.
- [62] Sha Y, Huang R, Huang M, et al. Cascade CRISPR/cas enables amplification-free microRNA sensing with fM-sensitivity and single-base-specificity[J]. Chem Commun (Camb), 2021, 57(2):247-250.

【收稿日期】 2022-07-24 【修回日期】 2022-10-09

(上接 1348 页)

- [9] 张淳嘉. 41例恶性血腥病患者合并侵袭性真菌感染的临床分析[D]. 暨南大学, 2012.
- [10] Sun Y, Huang H, Chen J, et al. Invasive fungal infection in patients receiving chemotherapy for hematological malignancy: A multicenter, prospective, observational study in China [J]. Tumor Biology, 2015, 36(2):757-767.
- [11] 陈丽丽, 张俊玲, 杨娜. 等. 多发性骨髓瘤合并侵袭性真菌感染的临床特征及危险因素研究[J]. 航空航天医学杂志, 2020, 31(12):1432-1433.
- [12] Suan N, O'Brien, Nicole M, et al. Infections in patients with hematological cancer: recent developments [J]. Hematology, 2003, 24(6):438-472.
- [13] 赵小强, 汤平, 杨海平. 伏立康唑治疗多发性骨髓瘤并发侵袭性真菌感染效果与 CYP2C19 基因多态性的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(13):1968-1972.
- [14] Noginskiy I, Samra A, Nielsen K, et al. A case of multiple myeloma presenting as *Streptococcus pneumoniae* meningitis with candida auris fungemia[J]. Case Rep Oncol, 2018, 11(3):705-710.
- [15] Jodi L, William WH. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013, 9(7):911-926.

【收稿日期】 2022-06-19 【修回日期】 2022-09-07