

CRISPR 传感检测技术的研究进展

王佳慧^{1#}, 赵佩佩^{1#}, 秦梦飞², 赵燕秋¹, 刘成伟³, 夏雪奎^{1*}

- 1 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103
- 2 黑龙江大学现代农业与生态环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150080
- 3 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

王佳慧, 赵佩佩, 秦梦飞, 赵燕秋, 刘成伟, 夏雪奎. CRISPR 传感检测技术的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 367-377.
WANG Jiahui, ZHAO Peipei, QIN Mengfei, ZHAO Yanqiu, LIU Chengwei, XIA Xuekui. Advances in CRISPR sensing and detection technology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 367-377.

摘 要: CRISPR 传感检测技术具有便宜、简单、便携、高灵敏和高特异等优点, 被称为“下一代分子诊断技术”。由于 CRISPR-Cas 系统具有特异的识别、顺式切割和非特异性的反式切割能力, 已经实现了对 DNA 和 RNA 等核酸靶标以及蛋白质、外泌体、细胞和小分子等非核酸靶标的检测。为了解不同 CRISPR 传感检测技术的优势和发展历程, 促进该技术的发展和应用, 本文根据不同 Cas 蛋白的活性特征, 对目前的 CRISPR 传感检测技术进行了分类总结, 并在此基础上根据检测的靶标类型, 依次总结了各种 CRISPR 传感检测技术的应用情况, 以期开发新型 CRISPR 传感检测技术提供参考。

关键词: 规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR); 生物传感器; 即时检测; 分子诊断

Advances in CRISPR sensing and detection technology

WANG Jiahui^{1#}, ZHAO Peipei^{1#}, QIN Mengfei², ZHAO Yanqiu¹, LIU Chengwei³, XIA Xuekui^{1*}

- 1 Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, Shandong, China
- 2 School of Modern Agriculture and Ecology and Environment, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang, China
- 3 College of Life Sciences, Northeastern Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

Abstract: The CRISPR sensing and detection technology has the advantages of cheap, simple,

资助项目: 山东省重点研发计划(2022SFGC0105); 山东省自然科学基金创新发展联合基金(ZR2021LSW022); 泰山学者青年专家岗位(tsqn202103100); 齐鲁工业大学(山东省科学院)重大创新专项(2022JBZ01-06); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合试点工程基础研究类项目(2022PX051, 2022PX027); 山东省自然科学基金青年基金(ZR2022QC186)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2022SFGC0105), the Innovation and Development Joint Fund of Natural Science Foundation from Shandong Province (ZR2021LSW022), the Young Taishan Scholarship (tsqn202103100), the Key Innovation Project of Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) (2022JBZ01-06), the Basic research project of Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) Science, Education and Industry Integration Pilot Project (2022PX051, 2022PX027), and the Natural Science Foundation from Shandong Province (ZR2022QC186).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: xiakx@sdas.org

Received: 2023-07-01; Accepted: 2023-09-08; Published online: 2023-09-21

portable, high sensitivity, and high specificity, therefore is regarded as the “next-generation molecular diagnostic technology”. Due to the specific recognition, *cis*-cleavage and nonspecific *trans*-cleavage capabilities, CRISPR-Cas systems have been implemented for the detection of nucleic acid targets (DNA and RNA) as well as non-nucleic acid targets (e.g., proteins, exosomes, cells, and small molecules). This review summarizes the current CRISPR sensing and detection technologies in terms of the activity characteristics of different Cas proteins, with the aim to understand the advantages and development history of different CRISPR sensing and detection technologies, as well as promote its development and application. Moreover, this review summarizes the applications of various CRISPR sensing and detection technologies according to the types of detection targets, hoping to facilitate the development of novel CRISPR sensing detection technology.

Keywords: clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR); biosensors; instant detection; molecular diagnostics

高灵敏、高特异、低成本的生物传感技术的开发,有助于代谢产物、环境分子、疾病标志物和流感病毒等靶标检测传感器的构建,对于生物学研究、环境监测、卫生安全和食品安全等具有重要的意义。同时,大型仪器因昂贵和操作繁琐无法适应日益增长的检测需求,需要小巧且便于应用于现场即时检测的生物传感器进行补充和替代。因此,拓展新工具并开发通用的传感检测平台,将有利于加快各种生物传感器的构建和应用。

规律间隔成簇短回文重复序列与关联蛋白系统 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein, CRISPR-Cas)是古菌和细菌的一种适应性免疫系统,包括 CRISPR 和 Cas 蛋白,已被用作强大的 RNA 引导的 DNA/RNA 靶向平台。CRISPR-Cas 系统具有强大的基因编辑能力,由于其对 Cas 蛋白的特异性或非特异性切割活性,极大地激发了人们对开发新型检测工具的兴趣。利用 CRISPR-Cas 系统的多样性来设计不同的基因序列,能够对不同的靶标进行特异性和低成本的检测。因此,理解和应用 CRISPR-Cas 技术将有助于进一步探索疾病诊断的边界。随着 CRISPR-Cas 技术的增强,该系统的应用逐渐从

核酸扩展到非核酸,如蛋白质、金属离子等。Cas 系统对核酸的特异性识别使其被纳入各种信号放大方法中,用于灵敏检测微量物质,并有助于在现场及时检测,以进行后续研究。

CRISPR-Cas 技术的出现极有可能成为生物传感领域的一个里程碑。本文首先总结了 CRISPR-Cas 系统的不同结构、特征和能力,以更好地了解每个 Cas 系统之间的异同(表 1)。随后,将 Cas 测定的靶标分为核酸类和非核酸类,强调它们在生物测定中的经典应用。这些检测方法已用于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP)、miRNA、蛋白质和外泌体等的检测。相信随着技术的进一步发展,CRISPR-Cas 相关生物传感器可能会发生革命性的变化。

1 CRISPR-Cas 传感检测系统的分类

1.1 基于 Cas9 的传感技术

Cas9 属于 II 型 CRISPR 系统,含有 HNH 和 RuvC 结构域,由 Cas9 蛋白、反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)和 crRNA 复合体对目的基因进行编辑。Cas9 能够识别质粒

表 1 不同 CRISPR-Cas 系统的结构和特点

Table 1 Structures and features of different CRISPR-Cas systems

Item	Cas9	Cas12	Cas13	Cas14
Subtypes	Type II	Type V	Type VI	Type V
Nuclease domains	HNH, RuvC	RuvC	HEPN	RuvC
Guide RNA	tracrRNA, crRNA	crRNA	crRNA	crRNA, tracrRNA
Target	dsDNA, ssDNA, ssRNA	dsDNA, ssDNA	ssRNA	ssDNA, dsDNA
<i>Trans</i> -cleavage substrates	–	ssDNA	ssDNA	ssDNA
PAM/PFS	5'-NGG-3'	TTTN	Non-G-PFS	–
Advantages	DNA target detection; signal amplification by <i>trans</i> -cleavage	No PAM sequence restrictions; distinguish single base differences	PAM sequence restriction for dsDNA detection; lower specificity for ssDNA detection	Smaller size; no PAM sequence restrictions; distinguish single base differences
Disadvantages	RNA target detection; signal amplification by <i>trans</i> -cleavage	PAM sequence restriction; additional signal amplification means	PAM sequence restriction	longer sgRNA

–: No *trans*-cleaving activity or no PAM/PFS sequence.

和噬菌体的原型间隔序列毗邻基序(protospacer adjacent motif, PAM) NGG 序列, 然后 crRNA-tracrRNA 复合体与 cDNA 进行配对, Cas9 随后对目标 DNA 进行双链切割(图 1A)^[1]。研究人员通过结合 DNA 荧光原位杂交及构建核酸酶失活的 dCas9 等方式, 开发了不依赖于反式切割活性的基于 Cas9 的生物传感检测技术^[2-3]。此外通过补充相关的 PAM 序列, 也可以靶向单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA)^[4]。虽然基于 Cas9 的生物传感检测技术表现不俗, 但真正开启 CRISPR 传感检测技术时代帷幕的, 是基于 Cas13 反式切割放大活性开发的特异性高灵敏度酶报告基因解锁(specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking, SHERLOCK)技术。

1.2 基于 Cas12 的传感技术

Cas12a 属于 V 型 CRISPR 系统, 由王金团队于 2015 年发现, 是第一个用于基因组编辑的 Cas12 核酸酶^[5]。与 Cas9 不同的是, Cas12a 只有一个 RuvC 催化结构域, 在 crRNA 的介导下靶向切割双链 DNA^[6], 并在切割完成后形成特定构象的三元复合物, 激活对非特异性单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)的反式切割活性(图 1B)。此外 CRISPR-Cas12b (又称 C2c1)是一种独特的 V-B 型 DNA 核酸内切酶系统。与

Cas12a 不同, crRNA 和 trrRNA 与 Cas12b 的结合对于向导链和靶标链之间的配对至关重要^[7]。值得注意的是, Cas12b 的体积比 Cas9 和 Cas12a 小, 并对在单核苷酸错配极其敏感^[8]。

1.3 基于 Cas13 的传感技术

Cas13 属于 VI 型 CRISPR 系统, 具有两个较高的真核生物和原核生物核苷酸结合(higher eukaryotic and prokaryotic nucleases domains, HEPN)结构域(图 1C), 在 crRNA 的介导下靶向切割 RNA, 产生对非特异性 RNA 的反式切割活性^[9-10]。利用这些特性, 张峰团队建立了第一个基于 CRISPR-Cas13a 的核酸检测系统 SHERLOCK, 利用 T7 转录结合重组聚合酶扩增使信号二次放大, 实现了以单碱基分辨率检测 DNA 和 RNA 靶标^[11]。进一步改善的 SHERLOCKv2 结合核糖核酸酶 Csm6 使信号灵敏度提高了 3.5 倍, 并且检测时间缩短到 30 min^[12]。

1.4 基于 Cas14 的传感技术

Cas14 属于 V 型 CRISPR-Cas 系统, 大小只有 400–700 个氨基酸, 迄今为止被证明是最小的第 II 类 CRISPR 效应器。它是一种靶向 ssDNA 的 CRISPR 内切酶, 与 CRISPR-Cas12a 不同, 在 gRNA 的介导下, Cas14 以不依赖 PAM 位点的方式特异性识别靶 ssDNA 序列^[13], 并激活其特

异性的顺式切割活性以及非特异性的反式切割活性。与 Cas12 类似, Cas14a 也是 V 型的, 能与目标核酸结合, 进而激活 ssDNA 反式切割活性(如图 1D), 可用于目标核酸的分子检测。各种 CRISPR-Cas 检测系统比较见表 1。

2 CRISPR 检测技术的应用

2.1 核酸

2.1.1 基因检测

CRISPR-Cas 系统对核酸的特异性识别在核酸检测中提供了独特的优势, 而靶标量少、粗品

浓度的信号转换和放大是分析系统中的关键挑战。一开始需将 CRISPR-Cas 系统与核酸扩增技术相结合实现信号放大, 但随着对 Cas12a、Cas13a 和 Cas14 蛋白反式切割活性的鉴定, 利用靶标结合后激活的反式切割活性, 可以在一定程度上实现对原始信号的扩增。此外通过结合各种信号输出方法, 一系列的无扩增系统被相继开发出来, 实现了对核酸的高灵敏度和选择性的检测。

CRISPR-Cas9 系统在 sgRNA 的指导下可实现对 dsDNA 特异性切割。Huang 等^[14]建立了 CRISPR-Cas9 触发的等温指数放大反应(CAS-

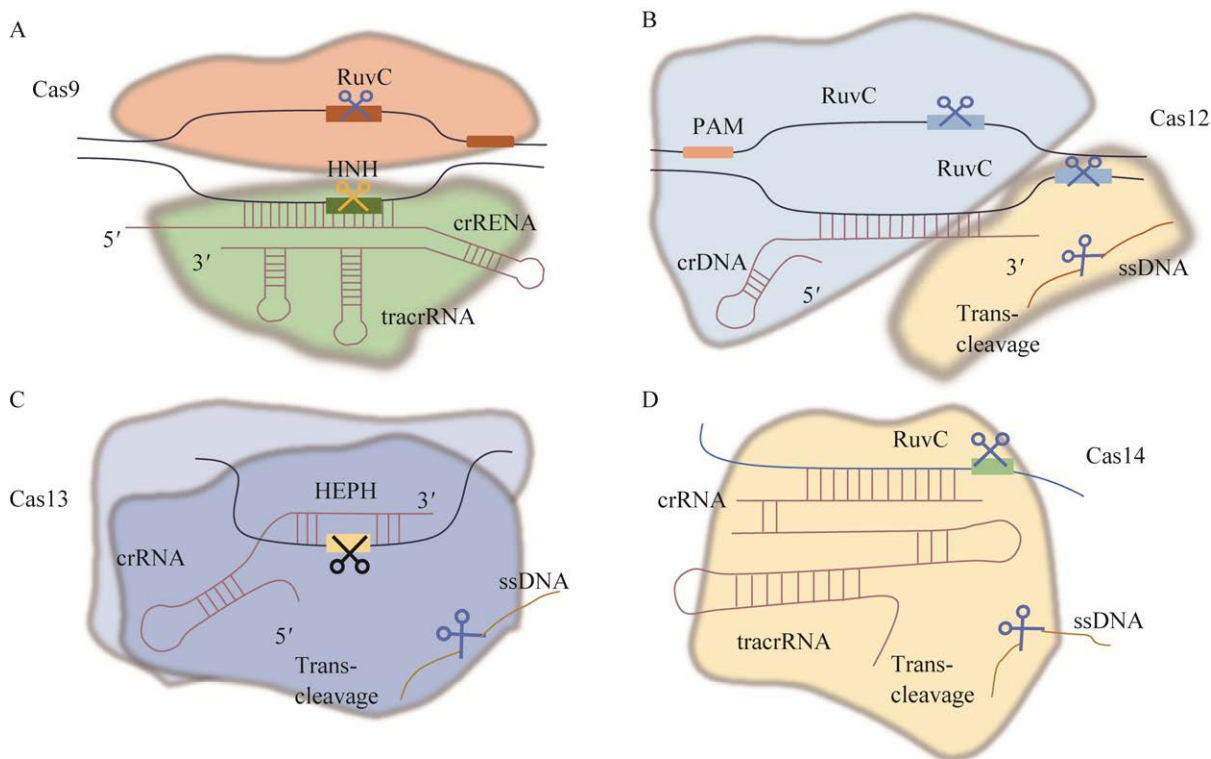


图 1 CRISPR-Cas 结构和切割活性示意图^[1]

Figure 1 Schematic representation of CRISPR-Cas structure and cleavage activities^[1]. A: Schematic diagram of Cas9 cleavage activity. crRNA can bind to tracrRNA and guide Cas9 to recognize and cleave specific dsDNA with PAM sequences. The HNH structural domain of Cas9 cleaves one strand of dsDNA complementary to crRNA, and the RuvC structural domain cleaves another strand of dsDNA. B: Schematic diagram of Cas12a cleavage activity. Cas12a has only one RuvC catalytic structural domain. Under the guidance of crRNA, Cas12a can recognize the T-rich PAM sequence and specifically cleaves dsDNA while non-specifically cleaving surrounding ssDNA. C: Schematic diagram of Cas13a cleavage activity. Cas13a contains two HEPN domains that can specifically recognize and cleave target ssRNA while non-specifically cleaving surrounding ssRNA under the guidance of crRNA. D: Schematic diagram of Cas14a cleavage activity. Under the guidance of tracrRNA and crRNA, Cas14 can specifically bind and cleave target ssDNA without PAM, and non-specifically cleave ssDNA in the vicinity.

EXPAR)方法,在无外部引物条件下,通过将单碱基甲基化转化为单碱基突变,实现位点特异性 DNA 甲基化检测,这对于监测肿瘤的诊断和预后至关重要。与石墨烯相结合开发了一种基于 CRISPR 的石墨烯场效应晶体管技术(CRISPR-chip)^[15],对靶 DNA 进行无扩增的直接检测。

而 Cas12a 的反式切割活性提供了一种新思路:通过将非特异性报告基因(如 ssDNA)加载到 Cas12a 系统中,在检测到靶 DNA 的同时,报告基因将被切割以释放荧光等信号。基于这一特性开发了 DNA 核酸内切酶靶向 CRISPR 反式报告基因(DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter, DETECTR)^[16],实现了对人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的检测。利用 Cas12a 反式切割荧光标记的 ssDNA 的活性开发了 HOLMES,将相关的 PAM 序列引入引物中,对 SNP 位点进行检测。HOLMES 与 DETECTR 系统的不同之处在于, HOLMES 借助 PCR 扩增。进一步研究发现 Cas12b 具有与 Cas12a 相似的切割活性,并具有单碱基分辨率。王金团队开发了基于 LAMP 和 Cas12b 的一锅一步诊断系统(HOMLESv2)^[17],可特异性鉴别 SNPs,检测病毒 RNA、人细胞 mRNA 和环状 RNA 等多种靶标。李维等开发了 Cas12b 介导的 DNA 检测方法(CDetection)^[18],可以在单碱基水平上区分 HPV 病毒核酸序列的差异。为了提高信号检测器的灵敏度,CRISPR-Cas12a 与电化学结合开发了 E-CRISPR 系统,Cas12a 的反式切割可以在靶核酸存在的情况下被激活,并且与金电极偶联的亚甲基蓝(methylene blue, MB)修饰的 ssDNA 可以被切割,导致 MB 的分离和导电性的转变,通过电流值的变化来监测目标核酸^[19]。

Cas13 没有严格的序列限制,具有遗传修

饰功能,可作为干扰 RNA 的工具用于编辑病原体突变的 RNA 序列等领域。张峰团队^[10]首先提出 SHERLOCK 方法,在低浓度下检测到 DNA 和 RNA 的单分子。Myhrvold 等^[20]将 SHERLOCK 方法优化为加热未提取的诊断骨质样品以消除核酸酶(heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases, HUDSON),简化了 DNA/RNA 提取和纯化等操作,使 SHERLOCK 方法可用于直接检测临床样品中的病毒核酸。Freije 等基于 SHERLOCK 开发了 Cas13 辅助限制病毒表达和读出(Cas13 assisted restriction of viral expression and readout, CARVER),增加了 Cas13 的切割功能,用于快速诊断和治疗^[19]。

将 DETECTR 的原理与 Cas14a 的非特异性切割活性相结合,开发了 Cas14a-DETECTR,它可以实现高保真 SNP 基因组分型^[21]。结果表明,当检测与蓝色或棕色眼睛相关的 *HERC2* 基因时,Cas12a 不能区分 2 个 ssDNA 靶点,而 Cas14a 在识别蓝色眼睛 SNPs 方面表现出增强作用。CRISPR-Cas14 系统与 HUDSON 结合^[20],检测更加方便,并已成功应用于细小病毒检测人类博卡病毒(human bocavirus, HBoV1)^[22]。

2.1.2 miRNA 检测

miRNA 是长度约为 22 bps 的小的单链非编码 RNA,通过与靶 mRNA 结合来调节基因表达。miRNA 的基因调控对人类的发育、分化、生长和代谢至关重要。miRNA 可作为各种疾病相关的生物标志物。Qiu 等^[23]开发了滚动圆扩增-CRISPR-分裂-辣根过氧化物酶(rolling circle amplification-CRISPR-split-horseradish peroxidase, RCH)系统,通过 RCA 技术对靶 miRNAs 进行等温扩增,再使用一对分别与半个分裂辣根过氧化物酶(split-horseradish peroxidase, sHRP)蛋白融合的 dCas9 效应子,用于结合扩增的靶序列。dCas9 效应子与附近靶序列的结合,会导致

sHRP 的重建, 最后加入显色底物四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 产生相应的比色信号。该方法灵敏度高, 适用于检测临床血清样品中的 miRNAs。Shan 等^[24]基于 Cas13a/crRNA 复合体通过对靶标 miRNAs 进行特异性识别, 激活了 Cas13a 的酶切活性, 从而产生荧光信号。该方法简便、快速, 但需要与等温扩增等方法相结合以进一步提高检测灵敏度。Zhou 等^[25]将 Cas13a 切割活性与电化学发光技术相结合, 构建了 PECL (portable-electroche milumi nescence)-CRISPR 平台。通过靶标 miRNAs 激活 Cas13a 的酶切活性, 对设计好的引物进行裂解, 从而触发指数扩增和 ECL 检测。该方法可达到单核

苷酸分辨率, 适用于检测肿瘤细胞中的 miRNAs, 在分子诊断方面具有广阔的应用前景。一些 CRISPR-Cas 核酸检测系统见表 2。

2.2 小分子

2.2.1 基于别构转录因子的小分子检测

别构转录因子(allosteric transcription factors, aTFs)通常用于基于配体识别时 aTF 和 DNA 序列之间结合亲和力的变化来调节基因表达。因此, 基于 aTF 的生物传感器可广泛应用于检测多种分子。Liang 等开发了 CaT-SMElor 成功地检测了人类血清样本中的尿酸和对羟基苯甲酸及其结构相似的类似物^[39]。当 aTF 与其他小分子结合时, 它与 dsDNA 基序的亲和力降低。

表 2 基于 CRISPR-CAS 的核酸检测系统

Table 2 Nucleic acid detection system based on CRISPR-Cas systems

Cas	Target	Technology	Amplification	Detection	References
Cas9	DNA	DNA-FISH	-	Fluorescence detection	[1]
	DNA	PC	PCR	Fluorescence detection	[2]
	DNA/RNA	CAS-EXPAR	EXPAR	Real-time fluorescence	[14]
	DNA/RNA	FELUDA	RPA/PCR	Paper-based IF device	[26]
	DNA/RNA	CASLFA	RPA/PCR	Paper-based IF device	[27]
Cas12	DNA	DETECTR	RPA	Fluorescence detection	[16]
	DNA/RNA	HOLMESv2	LAMP	Fluorescence detection	[17]
	DNA	CDetection	RPA	Fluorescence detection	[18]
	DNA/RNA	HOLMES	PCR	Fluorescence detection	[28]
	RNA	CRISPR-Cas12a-NER	RT-RAA	Naked eye	[29]
	DNA	CRISPR-Cas12a	PCR/LAMP	Naked eye	[30]
	DNA	POC	RPA/LAMP	Fluorescence detection	[31]
	RNA	STOPCovid	RT-LAMP	Fluorescence/ Lateral flow detection	[32]
	RNA	CASdetec	RT-RAA	Naked eye	[33]
Cas13	RNA	HUDSON	RPA	Fluorescence detection	[20]
	RNA	SHERLOCKv2	RPA	Fluorescence detection	[11]
	DNA/RNA	mCas13	RT-LAMP	Fluorescence detection	[34]
	RNA	SHERLOC	-	Fluorescence detection	[35]
	DNA	SHERLOC	RPA	qPCR	[36]
	DNA	CREST	RPA/PCR	Fluorescence detection	[37]
	DNA	APC-Cas	RT-qPCR	Fluorescence detection	[38]
Cas14	DNA	Cas14-DETECTR	PT	Fluorescence detection	[21]

-: No expansion is required.

随后, 释放 dsDNA 以触发 CRISPR-Cas12a 的反式切割活性。通过测量荧光信号的变化, 可以准确地测量目标小分子。此外, CRISPR-Cas12a 阵列结合四环素阻遏因子(tetracycline inhibitor, TetR), 在配体存在的情况下, aTF 的解离使 CRISPR 阵列进行转录; 激活 Cas12a 反式切割活性, 裂解单链 DNA 连接物以释放猝灭的荧光团, 以其高灵敏度和特异性检测了不同的四环素类抗生素^[40]。

2.2.2 基于适配体的小分子检测

CRISPR-Cas 系统可以与功能核酸(functional nucleic acids, FNAs)和分子翻译器结合使用, 用于检测非核酸目标。FNAs 和分子翻译器将非核酸靶标的检测转化为替代核酸靶标, 例如单链 DNA, 它们可以启动扩增检测策略。目前研究实现了利用通用性功能 DNA (functional DNA, fDNA) 检测 ATP 或 Na^+ ^[41], 以及将 CRISPR-Cas 系统与适配体对目标物的良好亲和力相结合, 成功检测了肿瘤标记物 AFP 和可卡因^[42]。基于 SHERLOCK 的体外转录分析系统 (SPRINT)^[43]利用核糖开关或蛋白质通过特定的效应器分子来调节转录, 定量检测了辅因子、核苷酸、氨基酸的代谢物、四环素和单原子离子。此外 CRISPR-Cas 系统也能与金属同位素检测相结合^[44], 在室温(25 °C)下 45 min 内实现痕量氨基青霉素水溶液的定量检测。

2.3 蛋白质

蛋白质检测的挑战是如何进行特异性识别和有效的信号转导。适配体可以有效地与靶蛋白结合, 产生 CRISPR-Cas 系统识别的核酸激活剂。Dai 等^[19]使用这种方法与电化学生物传感器结合, 检测了转化生长因子 b1 蛋白。将 Cas12a 的反式 ssDNA 切割活性与适配体对广泛的目标分析物的良好亲和力相结合, 检测了肿瘤标记物甲胎蛋白^[42]。通过 CRISPR-Cas12a 生物传感器

实现对乌拉西-DNA 糖酶(Ulasi-DNA glycase, UDG)和 T4 多核苷酸激酶(T4 polynucleotide kinase, T4 PNK)的超敏感检测^[45], 而且可作为检测单细胞解氧和人体血浆的强大工具箱^[46]。电化学适配体传感器已广泛用于蛋白质生物标志物的检测和定量, 但其实际应用中受到信号放大效率低下和探针表面固定过程费力费时的限制。Qing 等^[47]通过将 BIDSD 与滚环扩增(roll ring amplification, RCA)和 CRISPR-Cas12a 相结合, 实现了对凝血酶的特异性检测。基于 CRISPR-Cas12a, 整合无 PCR 扩增和双核酸适配体协同传感, 实现在唾液或血清样品中超灵敏、快速和稳定性检测 SARS-CoV-2 抗原核衣壳蛋白^[48]。

2.4 外泌体

外泌体是非侵入性疾病诊断和治疗的最有前景的生物标志物。在外泌体表明通常含有过度表达特定的蛋白受体时, 可用来检测外泌体。Zhao 等^[49]开发了一种基于 CD63 适配体和 CRISPR-Cas12a 系统的快速灵敏的 CD63 蛋白检测方法。首先 CD63 适配体被部分互补的 ssDNA 固定在磁珠上, 当 CD63 适配子捕获 CD63 蛋白时, 释放 ssDNA 阻断剂, 然后利用磁铁收集 CD63 蛋白和 CD63 适配体的复合体。上清液中的 ssDNA 阻断剂可被 CRISPR-Cas12a 系统识别, 导致单链 DNA 报告分子的裂解产生荧光信号, 为外泌体的检测和诊断提供了一种高度灵敏和特异的方法。

2.5 细胞

在 CRISPR-Cas 检测策略中, 一般使用适配体与细胞表面受体结合, 使信号从细胞到核酸的传递, 从而激活 CRISPR 系统。将核酸的变构探针和 CRISPR-Cas13a 相结合开发的 APC-Cas 系统^[50], 可高灵敏度检测肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)细胞, 该系统可以使用

三级放大来生成强大的荧光信号,无需分离即可检测极少量的细菌病原体。在肿瘤的发展过程中,循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)会发生转移。Lv 等^[51]建立了一个多价双链适配体网络 Cas12a (multivalent double-stranded aptamer network Cas12a, MDANs-Cas12a), 用于检测 CTCs 和调查癌症转移。该系统由多价双链核酸适配体网络(multivalent double-stranded aptamer network, MDANs)调节, 通过滚环扩增(RCA)在磁珠表面合成 MDANs。靶细胞存在时可以触发游离“激活 DNA”从 MDANs 结构中释放出来, 激活下游的 Cas12a 进行信号放大。CTCs 的检测为 CRISPR-Cas 系统在细胞检测中提供了一种新策略。

3 总结与展望

CRISPR-Cas 传感技术具有高效、特异、灵敏、便携、便宜和通用的特征, 这对核酸和非核酸等靶标检测具有重要的意义。且具有检测放大能力的 Cas 蛋白种类丰富, 使得 CRISPR 传感技术表现出对不同类型核酸如 RNA、单链 DNA、双链 DNA 等专一的检测能力, 这对适应不同检测场景具有很好的底层支撑作用。此外, 别构转录因子、适配体等传感元件的使用, 大大拓展了 CRISPR 传感技术在不同尺度靶标下的检测能力; 便携荧光计、侧向流试纸条、石墨烯芯片等的使用提高了该技术即时简便的功能; 快速无污染的核酸提取技术如一锅法 SHERLOCK 技术的开发, 使得该技术更具有普适性; Cas 蛋白串联放大技术以及其他元件的串联应用, 使得该技术的灵敏度极高, 检测时长很短。CRISPR 传感技术因其优异的表现, 在该技术出现的短短几年时间就迅速发展, 成为广泛开发应用的新一代检测技术。

在已知的检测技术中, CRISPR 传感技术虽

然优异, 但相较于抗体检测不够即时, 相较于 PCR 检测不够灵敏, 这是阻碍其应用的主要因素。不过, 随着研究的深入, 电化学传感技术对于不依赖于 PCR 提高 CRISPR 传感技术灵敏度具有很好的助力。目前利用标有大量的亚甲基蓝(methylene blue, MB)信号探针, 将 CRISPR-CAS12a 与石墨烯电传感器相结合, 极大提高了检测灵敏度。此外, 对于非核酸目标的检测, 需要提前将其转换为核酸信号。适配子和 DNAzyme 是常用的单链 DNA 或单链 RNA 寡核苷酸, 可以与非核酸靶标特异结合, 作为 Cas 蛋白的激活剂。然而, 单链激活子获得的 Cas 蛋白活性低于双链激活子和 PAM 序列。设计一种互补的单链激活剂与之杂交是一种替代方法。此外, 通过合理优化单链激活子序列, 有可能提高 Cas 蛋白的切割活性。

本团队前期利用 CRISPR-Cas12a 系统分别构建了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 核酸检测传感器、尿素小分子检测传感器^[42]、甲胎蛋白检测传感器^[19]及新冠病毒检测传感器^[50]。近期利用 CRISPR-Cas12 系统实现对铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) 和丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*) 3 种检测体系在分子和菌体水平的高灵敏、便捷、快速同属或异种的鉴定, 并与荧光定量 PCR 的重合率高达 100%, 更适用于各种检测条件。从基础的核酸检测应用开始, 逐次引入别构转录因子、核酸适配体传感元件及创建双适配体协同放大策略, 不断拓展升级 CRISPR-Cas12a 检测的应用范围。随着检测尺度的拓展, 不同尺度多靶点的同时检测技术将是下一步发展的方向。同时一锅法多通道和高灵敏 CRISPR 传感检测技术的发展具有很大的吸引力, 但耗时短至秒级的即时检测是需要解决的难点。随着 CRISPR 传感技术的发展, 其

在科学研究、卫生医疗、工业发酵、农业生产和环境保护方面将会得到越来越广泛的应用。

REFERENCES

- [1] SU WR, LI JR, JI C, CHEN CS, WANG YZ, DAI HL, LI FQ, LIU PF. CRISPR/Cas systems for the detection of nucleic acid and non-nucleic acid targets[J]. *Nano Research*, 2023, 16(7): 9940-9953.
- [2] GUK K, KEEM JO, HWANG SG, KIM H, KANG T, LIM EK, JUNG J. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 95: 67-71.
- [3] ZHANG YH, QIAN L, WEI WJ, WANG Y, WANG BN, LIN PP, LIU WC, XU LZ, LI X, LIU DM, CHENG SD, LI JF, YE YX, LI H, ZHANG XH, DONG YM, ZHAO XJ, LIU CH, ZHANG HM, OUYANG Q, et al. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(2): 211-216.
- [4] O'CONNELL MR, OAKES BL, STERNBERG SH, EAST-SELETSKY A, KAPLAN M, DOUDNA JA. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9[J]. *Nature*, 2014, 516(7530): 263-266.
- [5] ZETSCHKE B, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, SLAYMAKER IM, MAKAROVA KS, ESSLETZBICHLER P, VOLZ SE, JOUNG J, van der OOST J, REGEV A, KOONIN EV, ZHANG F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [6] LI SY, CHENG QX, LIU JK, NIE XQ, ZHAO GP, WANG J. CRISPR-Cas12a has both *cis*- and *trans*-cleavage activities on single-stranded DNA[J]. *Cell Research*, 2018, 28(4): 491-493.
- [7] YAN WX, HUNNEWELL P, ALFONSE LE, CARTE JM, KESTON-SMITH E, SOTHISELVAM S, GARRITY AJ, CHONG SR, MAKAROVA KS, KOONIN EV, CHENG DR, SCOTT DA. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2019, 363(6422): 88-91.
- [8] LIU L, CHEN P, WANG M, LIXY, WANG JY, YIN ML, WANG YL. C2c1-sgRNA complex structure reveals RNA-guided DNA cleavage mechanism[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(2): 310-322.
- [9] 陈敏洁, 唐桂月, 洪香娜, 郝沛, 江静, 李轩. 基于 CRISPR-Cas13 家族的 RNA 编辑系统及其最新进展[J]. *生物技术通报*, 2020(3): 1-8.
- [10] CHEN MJ, TANG GY, HONG XN, HAO P, JIANG J, LI X. Research progress on CRISPR-Cas13-mediated RNA editing system[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020(3): 1-8 (in Chinese).
- [11] HADIDI A. Next-generation sequencing and CRISPR/Cas13 editing in viroid research and molecular diagnostics[J]. *Viruses*, 2019, 11(2): 120.
- [12] KELLNER MJ, KOOB JG, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, ZHANG F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(10): 2986-3012.
- [13] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, KELLNER MJ, JOUNG J, COLLINS JJ, ZHANG F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [14] SAVAGE DF. Cas14: big advances from small CRISPR proteins[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(8): 1024-1025.
- [15] HUANG MQ, ZHOU XM, WANG HY, XING D. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(3): 2193-2200.
- [16] HAJIAN R, BALDERSTON S, TRAN T, DEBOER T, ETIENNE J, SANDHU M, WAUFORD NA, CHUNG JY, NOKES J, ATHAIYA M, PAREDES J, PEYTAVI R, GOLDSMITH B, MURTHY N, CONBOY IM, ARAN K. Detection of unamplified target genes *via* CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2019, 3(6): 427-437.
- [17] CHEN JS, MA EB, HARRINGTON LB, da COSTA M, TIAN XR, PALEFSKY JM, DOUDNA JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [18] LI LX, LI SY, WU N, WU JC, WANG G, ZHAO GP, WANG J. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2228-2237.
- [19] TENG F, GUO L, CUI TT, WANG XG, XU K, GAO QQ, ZHOU Q, LI W. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 132.
- [20] FREIJE CA, MYHRVOLD C, BOEHM CK, LIN AE, WELCH NL, CARTER A, METSKY HC, LUO CY,

- ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, YOZWIAK NL, ZHANG F, SABETI PC. Programmable Inhibition and detection of RNA viruses using Cas13[J]. *Mol Cell*, 2019,76(5): 826-837.
- [20] MYHRVOLD C, FREIJE CA, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, METSKY HC, DURBIN AF, KELLNER MJ, TAN AL, PAUL LM, PARHAM LA, GARCIA KF, BARNES KG, CHAK B, MONDINI A, NOGUEIRA ML, ISERN S, MICHAEL SF, LORENZANA I, YOZWIAK NL, MacINNIS BL, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448.
- [21] HARRINGTON LB, BURSTEIN D, CHEN JS, PAEZ-ESPINO D, MA EB, WITTE IP, COFSKY JC, KYRPIDES NC, BANFIELD JF, DOUDNA JA. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [22] AQUINO-JARQUIN G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2019, 18: 428-431.
- [23] QIU XY, ZHU LY, ZHU CS, MA JX, HOU T, WU XM, XIE SS, MIN L, TAN DA, ZHANG DY, ZHU LY. Highly effective and low-cost microRNA detection with CRISPR-Cas9[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(3): 807.
- [24] SHAN YY, ZHOU XM, HUANG R, XING D. High-fidelity and rapid quantification of miRNA combining crRNA programmability and CRISPR/Cas13a *trans*-cleavage activity[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(8): 5278-5285.
- [25] ZHOU T, HUANG R, HUANG MQ, SHEN JJ, SHAN YY, XING D. CRISPR/Cas13a powered portable electrochemiluminescence chip for ultrasensitive and specific MiRNA detection[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(13): 1903661.
- [26] AZHAR M, PHUTELA R, KUMAR M, ANSARI AH, RAUTHAN R, GULATI S, SHARMA N, SINHA D, SHARMA S, SINGH S, ACHARYA S, SARKAR S, PAUL D, KATHPALIA P, AICH M, SEHGAL P, RANJAN G, BHOYAR RC, GENETIC EPIDEMIOLOGY (INDICOVGEN) CONSORTIUM ICG&, SINGHAL K, et al. Rapid and accurate nucleobase detection using FnCas9 and its application in COVID-19 diagnosis[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 183: 113207.
- [27] WANG XS, XIONG EH, TIAN T, CHENG M, LIN W, WANG H, ZHANG GH, SUN J, ZHOU XM. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2497-2508.
- [28] LI SY, CHENG QX, WANG JM, LI XY, ZHANG ZL, GAO S, CAO RB, ZHAO GP, WANG J. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection[J]. *Cell Discovery*, 2018, 4: 20.
- [29] WANG XJ, ZHONG MT, LIU Y, MA PX, DANG L, MENG QZ, WAN WW, MA XD, LIU J, YANG G, YANG ZF, HUANG XX, LIU M. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER[J]. *Science Bulletin*, 2020, 65(17): 1436-1439.
- [30] TAO DG, LIU JJ, NIE XW, XU BR, TRAN-THI TN, NIU LL, LIU XD, RUAN JX, LAN XC, PENG GQ, SUN LM, MA YL, LI XY, LI CC, ZHAO SH, XIE SS. Application of CRISPR-Cas12a enhanced fluorescence assay coupled with nucleic acid amplification for the sensitive detection of African swine fever virus[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(9): 2339-2350.
- [31] HE Q, YU DM, BAO MD, KORENSKY G, CHEN JH, SHIN M, KIM J, PARK M, QIN PW, DU K. High-throughput and all-solution phase African swine fever virus (ASFV) detection using CRISPR-Cas12a and fluorescence based point-of-care system[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 154: 112068.
- [32] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, KIM NG, WOOLLEY AE, SEGEL M, BARRETTO RPJ, RANU A, MACRAE RK, FAURE G, IOANNIDI EI, KRAJESKI RN, BRUNEAU R, HUANG ML W, YU XG, LI JZ, WALKER BD, HUNG DT, GRENINGER AL, JEROME KR, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(15): 1492-1494.
- [33] GUO L, SUN XH, WANG XG, LIANG C, JIANG HP, GAO QQ, DAI MY, QU B, FANG S, MAO YH, CHEN YC, FENG GH, GU Q, WANG RR, ZHOU Q, LI W. SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6: 34.
- [34] ZHANG T, LI HT, XIA XH, LIU J, LU YH, KHAN MR, DENG S, BUSQUETS R, HE GP, HE Q, ZHANG JQ, DENG RJ. Direct detection of foodborne pathogens *via* a proximal DNA probe-based CRISPR-Cas12 assay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(43): 12828-12836.
- [35] QIN PW, PARK M, ALFSON KJ, TAMHANKAR M, CARRION R, PATTERSON JL, GRIFFITHS A, HE Q, YILDIZ A, MATHIES R, DU K. Rapid and fully

- microfluidic Ebola virus detection with CRISPR-Cas13a[J]. ACS Sensors, 2019, 4(4): 1048-1054.
- [36] KE YQ, HUANG SY, GHALANDARI B, LI SJ, WARDEN AR, DANG JQ, KANG L, ZHANG Y, WANG YQ, SUN YQ, WANG JL, CUI DX, ZHI X, DING XT. Hairpin-spacer crRNA-enhanced CRISPR/Cas13a system promotes the specificity of single nucleotide polymorphism (SNP) identification[J]. Advanced Science, 2021, 8(6): 2003611.
- [37] van DONGEN JE, BERENDSEN JTW, EIJKEL JCT, SEGERINK LI. A CRISPR/Cas12a-assisted *in vitro* diagnostic tool for identification and quantification of single CpG methylation sites[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021, 194: 113624.
- [38] WANG XF, ZHOU SY, CHU CX, YANG M, HUO DQ, HOU CJ. Dual methylation-sensitive restriction endonucleases coupling with an RPA-assisted CRISPR/Cas13a system (DESCS) for highly sensitive analysis of DNA methylation and its application for point-of-care detection[J]. ACS Sensors, 2021, 6(6): 2419-2428.
- [39] LIANG MD, LI ZL, WANG WS, LIU JK, LIU LS, ZHU GL, KARTHIK L, WANG M, WANG KF, WANG Z, YU J, SHUAI YT, YU JM, ZHANG L, YANG ZH, LI C, ZHANG Q, SHI T, ZHOU LM, XIE F, et al. A CRISPR-Cas12a-derived biosensing platform for the highly sensitive detection of diverse small molecules[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3672.
- [40] MAHAS A, WANG QC, MARSIC T, MAHFOUZ MM. Development of Cas12a-based cell-free small-molecule biosensors *via* allosteric regulation of CRISPR array expression[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(11): 4617-4626.
- [41] XIONG Y, ZHANG JJ, YANG ZL, MOU QB, MA Y, XIONG YH, LU Y. Functional DNA regulated CRISPR-Cas12a sensors for point-of-care diagnostics of non-nucleic-acid targets[J]. Journal of the American Chemical Society, 2020, 142(1): 207-213.
- [42] ZHAO XX, LI SS, LIU G, WANG Z, YANG ZH, ZHANG QW, LIANG MD, LIU JK, LI ZL, TONG YJ, ZHU GL, WANG XY, JIANG L, WANG WS, TAN GY, ZHANG LX. A versatile biosensing platform coupling CRISPR-Cas12a and aptamers for detection of diverse analytes[J]. Science Bulletin, 2021, 66(1): 69-77.
- [43] IWASAKI RS, BATEY RT. SPRINT: a Cas13a-based platform for detection of small molecules[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(17): e101.
- [44] HUJY, ZHOU J, LIU R, LV Y. Element probe based CRISPR/Cas14 bioassay for non-nucleic-acid targets[J]. Chemical Communications, 2021, 57(80): 10423-10426.
- [45] DU YC, WANG SY, WANG YX, MA JY, WANG DX, TANG AN, KONG DM. Terminal deoxynucleotidyl transferase combined CRISPR-Cas12a amplification strategy for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase with zero background[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 171: 112734.
- [46] LI CY, ZHENG B, LI JT, GAO JL, LIU YH, PANG DW, TANG HW. Holographic optical tweezers and boosting upconversion luminescent resonance energy transfer combined clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas12a biosensors[J]. ACS Nano, 2021, 15(5): 8142-8154.
- [47] QING M, SUN Z, WANG L, DU SZ, ZHOU J, TANG Q, LUO HQ, LI NB. CRISPR/Cas12a-regulated homogeneous electrochemical aptasensor for amplified detection of protein[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 348: 130713.
- [48] ZHAO XX, WANG ZD, YANG BW, LI ZL, TONG YJ, BI YH, LI ZH, XIA XK, CHEN XY, ZHANG LX, WANG WS, TAN GY. Integrating PCR-free amplification and synergistic sensing for ultrasensitive and rapid CRISPR/Cas12a-based SARS-CoV-2 antigen detection[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(4): 283-291.
- [49] ZHAO XX, ZHANG WQ, QIU XP, MEI Q, LUO Y, FU WL. Rapid and sensitive exosome detection with CRISPR/Cas12a[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(3): 601-609.
- [50] SHEN JJ, ZHOU XM, SHAN YY, YUE HH, HUANG R, HU JM, XING D. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction[J]. Nature Communications, 2020, 11: 267.
- [51] LV ZX, WANG QQ, YANG MH. Multivalent duplexed-aptamer networks regulated a CRISPR-Cas12a system for circulating tumor cell detection[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(38): 12921-12929.

(本文责编 郝丽芳)