CRISPR 核酸检测技术的研究进展

王紫怡1,黄 迪1,徐颖华2*,黄 磊1,连佳长1,徐志南1*

(1. 浙江大学化学工程与生物工程学院, 杭州 310027; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100820)

摘 要: 作为一种新兴的基因组编辑和调控工具, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术的诞生和发展极大地改变了生物学领域的前进方向。近几年来, CRISPR 系统及其相关蛋白(Cas 效应蛋白)的工作原理被逐渐揭示,由于其优越的灵敏度和特异性,该技术在多个领域开始发挥至关重要的作用。借助其新颖的核酸酶活性,人们打开了研发核酸检测新方法的大门。本文总结了多种 CRISPR/Cas 系统及 其在核酸检测领域的应用和局限性,并对其后续发展方向进行了展望。随着该技术的不断成熟, CRISPR/Cas 系统将进一步推动基础生物学和应用生物学的研究,并有潜力成为下一代诊断生物传感平台的候选者。 关键词: CRISPR/Cas 技术; Cas 蛋白; 核酸检测

Research progress of nucleic acid detection technology based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats

WANG Zi-Yi¹, HUANG Di¹, XU Ying-Hua^{2*}, HUANG Lei¹, LIAN Jia-Zhang¹, XU Zhi-Nan^{1*}

College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;
National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100820, China)

ABSTRACT: As an emerging genome editing and regulation tool, the discovery and development of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) technology have greatly changed the direction of the biological field. In recent years, the working principle of the CRISPR system and its related proteins (Cas effector proteins) have been revealed. Due to its outstanding sensitivity and specificity, this technology has also begun to play a vital role in several research fields. With its novel nuclease activity, the door was opened to develop new methods for nucleic acid detection. This article summarized the CRISPR/Cas systems and their applications and limitations in the nucleic acid detection field, and prospected for their subsequent development. With the technology maturing gradually, the CRISPR/Cas systems were expected to promote the research of basic biology and applied biology and had the potential to become a candidate for the next generation of diagnostic biosensing platforms.

KEY WORDS: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas technology; Cas protein; nucleic acid detection

*通信作者: 徐颖华, 博士, 研究员, 主要研究方向为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准化研究。E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

徐志南,博士,教授,主要研究方向为合成生物学与生物化工。E-mail: znxu@zju.edu.cn

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1603902)、杭州市科技发展计划项目(20202013A02)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603902), and the Science and Technology Development Project of Hangzhou (20202013A02)

^{*}Corresponding author: XU Ying-Hua, Ph.D, Professor, National Institutes for Food and Drug Control, No.8, Sanlihe East Road, Xicheng District, Beijing 100820, China. E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

XU Zhi-Nan, Ph.D, Professor, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, No.38, Yugu Road, Xihu District, Hangzhou 310027, China. E-mail: znxu@zju.edu.cn

0 引 言

分子诊断是一种基于核酸识别和扩增,对遗传物质的变 化做出诊断的技术,其在生命科学、生物安全、食品安全、 环境监测等领域具有至关重要的作用^[1-2]。相比于其他分子诊 断方法,核酸检测技术能够更快速、准确地得到检测结果^[3]。 但现有的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技 术、等温扩增技术等大多数核酸检测技术,在灵敏度、特异 性等性能指标上仍具有一定的局限性^[4-5]。它们通常需要复杂 的基础设备和烦琐的实验步骤,且对实验环境、操作人员等 都有较高的要求。面对目前全球新出现或重新出现的传染病、 食品污染及环境污染等问题,开发具有更高灵敏度和特异性 的新型核酸检测技术,尤其是适用于现场快速即时诊断 (point-of-care testing, POCT)的核酸检测技术迫在眉睫^[6-7]。

在许多细菌和大多数古生菌中,存在规则成簇间隔的 短回文重复序列,即CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)序列。在 Cas (CRISPR-associated) 效应蛋白的协助下, CRISPR/Cas 系统特异性结合靶标核酸, 并作为获得性免疫系统,防御病毒和其他外来 DNA 的侵 入^[8-10]。早在 1987 年, CRISPR 系统就已经被发现,如今它 也已成为基因编辑的首选工具^[11-12]。CRISPR/Cas 系统具有 较高特异性和灵敏度,可作为核酸检测的新型生物传感平 台,并在多个检测领域发挥重要作用。其中,Cas 蛋白作为高 特异性的序列识别元件,可以与许多不同的信号读出方法 相结合,进行核酸检测。本文对近 5 年来基于 CRISPR/Cas 系统开发的核酸检测方法进行综述,并讨论了 CRISPR/Cas 系统在核酸检测领域的优势和局限性,为 CRISPR 核酸检测 技术的进一步发展提供了参考。

1 常见的 CRISPR/Cas 核酸检测系统

根据 Cas 蛋白的序列、结构、功能及其参与的反应,可 将 CRISPR/Cas 系统分为 2 大类, 6 小类。其中,一类 CRISPR/Cas 系统使用多亚基效应器复合物,包含I类、III 类、IV类 Cas 蛋白;另一类 CRISPR/Cas 系统效应器复合 物的功能由单个蛋白完成,包含II类、V类、VI 类 Cas 蛋 白^[13-14]。不同的 Cas 蛋白具有不同的分子结构和催化活性, 其中II类 Cas9 系统、V类 Cas12 系统和 Cas14 系统及 VI 类 Cas13 系统已被广泛应用于核酸检测领域^[15-16]。如表 1 所示,目前已有多种基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测方 法被开发,并在多个领域引领核酸检测技术的革新。

Cas 类型	检测方法	效应蛋白	扩增方法	信号输出方法	灵敏度	特异性	检测时间	靶标类型	参考文献
Cas9	NASBACC	SpCas9	NASBA	比色法	f mol/L	1 nt	~3 h	RNA	[17]
	CAS-EXPAR	SpCas9	EXPAR	荧光法	a mol/L	1 nt	< 1 h	DNA/ RNA	[18]
	FLASH	SpCas9	PCR	高通量测序法	a mol/L	-	-	DNA/ RNA	[19]
	ctPCR ctPCR2.0 ctPCR3.0	SpCas9	PCR	荧光法	-	-	-	DNA	[20] [21] [22]
	PC	Sp-dCas9	PCR	生物发光法	1 copy	-	-	DNA	[23]
	RCH	Sp-dCas9	RCA	比色法	f mol/L	1 nt	< 4 h	RNA	[24]
Cas12	HOLMES	LbCas12a	PCR RT-PCR	荧光法	a mol/L	1 nt	$\sim 1 h$	DNA/ RNA	[25]
	HOLMESv2	AacCas12b	LAMP RT-LAMP	荧光法	a mol/L	1 nt	$\sim 1 h$	DNA/ RNA	[26]
	DETECTR	LbCas12a	RPA	荧光法 比色法	a mol/L	6 nt	~2 h	DNA	[27]
	SCAN	AsCas12a	-	纳米孔传感器	n mol/L	-	< 1 h	DNA	[28]
	AIOD-CRISPR	LbCas12a	RPA	荧光法 比色法	1 copy	-	< 40 min	DNA/ RNA	[29]
	STOPCovid.v2	AapCas12b	RT-LAMP	荧光法 比色法	100 copies	-	< 45 min	DNA/ RNA	[30]
Cas13	SHERLOCK	LwCas13a	RPA	荧光法	a mol/L	1 nt	3~5 h	DNA/ RNA	[31]
	SHERLOCKv2	CcaCas13b PsmCas13b LwaCas13a	RPA	荧光法 比色法	z mol/L	1 nt	1~3 h	DNA/ RNA	[32]
	HUDSON	LwCas13a	RPA	荧光法 比色法	a mol/L	1 nt	< 2 h	DNA/ RNA	[33]
	PECL-CRISPR	LbuCas13a	EXPAR	电化学发光法	f mol/L	1 nt	< 2 h	RNA	[34]
Cas14	Cas14-DETECTR	Cas14a	PT	荧光法	-	1 nt	-	DNA	[35]

表 1 基于 CRISPR/Cas 系统的主要核酸检测系统 Table 1 Main nucleic acid detection system based on the CRISPR/Cas system

注: "-"表示未知;灵敏度中 f: 10⁻¹⁵; a: 10⁻¹⁸; n: 10⁻⁹; z: 10⁻²¹。

1.1 CRISPR/Cas9 系统

在 CRISPR/Cas 系统中, Cas9 被广泛应用于基因编辑 领域^[36]。Cas9 蛋白(Cas9 核酸酶)有 2 个结构域来发挥作用, 分别为 HNH 核酸酶结构域和 RuvC 核酸酶结构域^[37]。在 PAM 位点(如 *Streptococcus pyogenes* Cas9 的 NGG)介导的 gRNA (guide-RNA)指导下, Cas9 的 HNH 结构域和 RuvC 结 构域分别来切割靶标链和非靶标链,从而对基因组进行编 辑^[38-39]。如图 1a 所示, Cas9 与靶核酸的结合能够激活相应 的信号分子,从而产生便于识别的信号,用于病原体的基 因分型和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点的区分等^[40]。

基于 CRISPR/Cas9 裂解和切口内切核酸酶(NEase)活 性,研究者开发了许多 CRISPR/Cas9 检测平台。PARDEE 等^[17]开发了一种名为 NASBACC (NASBA-CRISPR cleavage)的便携式低成本诊断平台,并用于寨卡(Zika)病 毒的检测。他们将 NASBA 扩增技术与 Cas9 效应子相结合, 通过反式作用触发 RNA 结合来控制基因的翻译, 随后通 过纸基传感器进行检测结果的输出。该方法能够检测到猕 猴血浆中的 Zika 病毒, 且整个样品处理流程简单, 适用于 现场使用。HUANG 等^[18]开发了由 Cas9 触发的等温指数扩 增反应即 CAS-EXPAR (CRISPR/Cas9-isothermal expon ential amplification reaction)核酸扩增技术。通过设计 PAMmer 来激活 Cas9 的位点特异性切割活性, 随后 EXPAR 系统能够利用切割产物作为自身引物并触发等温 扩增反应, 扩增所得 dsDNA 产物可与 SYBR Green I 结合, 产生可读取的荧光信号。该方法可用于甲基化 DNA 和单 核细胞增生李斯特氏菌 RNA 的识别,并可实现核酸特定 位点的检测。

Cas9 检测还可以与其他信号读出方式相结合,例如 QUAN 等^[19]开发了 FLASH (finding low abundance sequences by hybridization)检测平台。该方法使用了一组经 过改造的 gRNA,用于指导 Cas9 将经磷酸酶处理过的靶标 序列切割成大小合适的片段,并进行特异性扩增。随后, 与传统的高通量测序技术(next-generation sequencing, NGS) 相结合,进一步提高了检测精度,适用于依赖多重 PCR 检 测的领域。Cas9 也可用于植物病原体的检测,例如 CHANG 等^[41]开发了基于 Cas9 系统触发信号放大的核酸 检测方法。通过 Cas9/gRNA 对靶标序列进行特异性识别和 切割,并对切口酶和 DNA 聚合酶处理得到的 ssDNA 采用 滚环扩增法(rolling circle amplification, RCA)进行扩增。 RCA 扩增产物可与 AuNP 探针结合并诱导 AuNP 聚集,从 而产生可通过裸眼或紫外分光光度计检测到的颜色变化。 该方法可应用于核酸可视化的病原体监测和即时诊断。

此外,先后有文献报道了 3 个版本的 CRISPR-PCR (ctPCR)方法,用于人乳头瘤病毒(human papillomavirus,

HPV)的准确检测和基因分型^[20-22]。1.0 和 2.0 版本中的 etPCR 方法,需要对 DNA 进行先后 2 次不同的 PCR 扩增 反应。这 2 个版本的 ctPCR 方法都可用于区分 HPV16 和 HPV18,但检测步骤比较复杂。随后,为了进一步简化步 骤,3.0 版 ctPCR 方法被开发,仅需一个均质步骤,即可检 测到目标 DNA。该方法将 Cas9 和 gRNA 添加到实时荧光 定量核酸扩增检测系统(quantitative real-time PCR, qPCR) 反应体系中,并在 qPCR 扩增之前进行额外的等温孵育, 因此在不打开反应管的情况下就可以对靶标 DNA 进行检 测。通过检测 qPCR 的循环阈值(cycle threshold, Ct)变化情 况,可以得到目标 DNA 的含量。该方法可检测临床样品中 的 HPV 病毒,并有望广泛应用于多项临床诊断中。

除了具有酶促裂解活性的 Cas9 外, 工程化核酸酶缺 陷型 Cas9 (dead Cas9, dCas9)也被应用于核酸检测领域。虽 然 dCas9 缺失了核酸酶活性, 但保留了结合靶 dsDNA 的能 力,也能够用于开发新的核酸生物传感系统,且新系统的 原理与常规原位杂交方法相似^[42]。ZHANG等^[23]基于配对 的 dCas9. 开发了 PC (paired dCas9)报告系统。这对 dCas9 蛋白分别与靶 DNA 序列的上游和下游区段互补, 又分别 与荧光素酶的 N 端和 C 端相偶联。靶 DNA 通过 PCR 扩增 后,可与 dCas9 结合产生带有荧光信号的重组荧光素酶。 该系统适用于结核分枝杆菌 DNA 的检测。与多种疾病相 关的 miRNAs (microRNAs)在疾病诊断中具有潜在的应用, QIU 等^[24]开发了 RCH (rolling circle amplification- CRISPR -split-horseradish peroxidase)系统,用于检测 miRNAs。首 先通过 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,最后通过加入显色底物四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB)即可产生相应的比色信号。该 方法能够保持较高灵敏度,提供更广的动态范围,适用于 检测临床血清样品中的 miRNAs。

1.2 CRISPR/Cas12 系统

Cas12 和 Cas9 具有相似的结构和功能,前者包含 RuvC 核酸酶结构域和 Nuc 核酸酶结构域,通过 RuvC 结构 域与靶 DNA 进行特异性结合,而 Nuc 结构域起到辅助 RuvC 结构域的作用^[43-45]。如图 1b 所示,在 gRNA 的介导 下,Cas12 可特异性地识别靶 DNA 序列,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^[46]。Cas9 和 Cas12b 的 gRNA 包括 crRNA 和 tracrRNA,而 Cas12a 的 gRNA 只包括 crRNA,所以 Cas12a 反应体系的设计更为 简单^[47]。且 Cas12a 的顺式切割依赖于 PAM 序列,反式切 割则不依赖于 PAM 序列。Cas12 虽然没有 Cas9 应用广泛, 但其对 dsDNA、ssDNA 和 RNA 的调节在基因工程领域也 有很大的影响^[48]。

早在 2017 年, Cas12a 的反式切割活性及其在核酸检 测中的应用便被报道,并被授予了中国专利^[49]。随后,LI 等^[25]利用了 Cas12a 的顺式切割和反式切割活性,以自淬 灭的荧光 ssDNA 分子作为探针,开发了特异性核酸检测方 法即 HOLMES (one-hour low-cost multipurpose highly efficient system)方法。该方法可用于检测与人相关的多个 SNP 位点及某些 DNA 病毒和 RNA 病毒, 且成本低廉, 有 望应用于核酸快速检测领域。后续研究表明, Cas12b 具有 与 Cas12a 相似的切割活性, 目 Cas12b 的核酸检测可达单 碱基分辨率^[50]。随后, LI等^[26]利用 Cas12b 的反式切割活性, 建立了 HOLMESv2 核酸检测平台。该方法可用于特异性 区分 SNP 位点, 检测病毒 RNA、人细胞 mRNA 和环状 RNA 等多种靶标,展现了其在分子诊断和表观遗传学领域的应 用前景。HE 等^[51]运用了与 HOLMES 机制相似的检测方法, 用于检测非洲猪瘟病毒。通过 POCT 系统检测体系中的荧 光,能够快速、准确地判断出样品中是否含有病毒。该方 法具有较高的灵敏度和特异性,可用于区分具有紧密匹配 序列的核酸靶标。

CHEN 等^[27]将 Cas12a 反式切割活性与等温扩增方法 相结合,开发了 DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter)检测方法。他们发现 LbCas12a 具有 特异性顺式切割靶标 dsDNA 的活性和由 dsDNA 激活的非 特异性反式切割 ssDNA 的活性。将 LbCas12a 与等温扩增 结合所开发的 DETECTR 方法, 可用于鉴定培养细胞中的 HPV16 和 HPV18, 适用于检测患者样品。随后, LI 等^[52]受 到 DETECTR 方法的启发,将 Cas12a 切割活性和 DNA 功 能化金纳米粒子相结合,通过表面等离子共振效应,可产 生快速且具有特异性的比色信号。该方法具有较高的灵敏 性和便携性,可接受现场样品预处理过程中经常发生的 DNA 损失等情况,适用于检测葡萄样品中的红斑病毒感 染。NOURI 等^[28]将 Cas12a 切割活性和固体纳米孔传感器 相结合, 开发了 SCAN (solid-state CRISPR-Cas12a-assisted nanopores)检测方法。通过玻璃纳米孔传感器,可定量分析 体系中由 Cas12a 降解的单链环状 DNA。该方法适用于检 测 HIV-1 DNA, 具有扩展到其他类型的纳米孔和 DNA 靶 标检测中的应用前景。

在传染病 COVID-19 爆发的当下,迫切地需要开发出 一些快速、准确的检测方法。最近,研究开发了多种 CRISPR/Cas12 一锅法检测方法,用于检测 SARS-CoV-2。 这些方法将核酸扩增与 Cas12 检测结合在同一个体系中, 不需要额外的开盖步骤,减少了样品污染的可能性,提高 了反应结果的准确性。例如,DING 等^[29]将重组酶聚合酶扩 增(recombinase polymerase amplification, RPA)和 Cas12a 检 测 相 结 合 ,开发了 AIOD-CRISPR (all-in-one dual CRISPR-Cas12a)一锅法检测平台。反应体系中, RPA 的扩 增和 Cas12a 的特异性结合同时进行, 通过 Cas12a 的非特 异性切割,可产生便于检测的荧光信号。该方法可用于检 测 SARS-CoV-2, 通过进一步研究还开发了 RT-AIOD-CRISPR 用于检测 RNA。JOUNG 等^[30]将逆转录环介导等 温扩增 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)和 Cas12b 检测相结合, 开发了 STOPCovid.v2 (SHERLOCK testing in one pot-Covid, version 2)一锅法检测平台。该方法将病毒 RNA 的简化提 取和扩增与耐热的 Cas12b 检测结合在同一反应体系中, 适用于检测临床样品中的 SARS-CoV-2。CHEN 等^[53]将 RT-LAMP 扩增和 Cas12a 检测结合在一起, 开发了无污染 目视检测平台。由于 Cas12a 的耐热性不如 Cas12b, 所以 Cas12a 被提前添加在反应管的管盖上,待扩增结束之后将 Cas12a 离心至管内, 使其在 37 ℃下进行切割反应。在智能 手机和 3D 打印仪器的帮助下,可通过肉眼观察到 SARS-CoV-2 的检测结果。

1.3 CRISPR/Cas13 系统

Cas13 含有 2 个不同的 HEPN 核酸酶结构域, 对靶标 RNA 表现出混杂核糖核酸酶活性^[54]。与 Cas12 的切割活性 相似, Cas13 具有 gRNA 指导的 RNase 活性, 以保护细菌免 受遗传因素的侵害^[55]。2016 年文献报道, 发现 Cas13 具有 "间接裂解"活性, 如图 1c 所示, Cas13 可特异性地识别靶 RNA 序列, 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^[56-57]。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^[58-59]。

为了进一步研究 Cas13 的"间接裂解"活性, GOOT ENBERG 等^[31]将 Cas13a 的核糖核酸酶活性与等温扩增相 结合,建立了特异性检测核酸方法即 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking)平台。该方法 适用于检测 Zika 病毒和登革热病毒的特定菌株, 能够区分 致病细菌和人类 DNA 基因型, 还可用于识别肿瘤细胞中 的突变 DNA。随后, Cas13b 也被发现具有核糖核酸酶活性, GOOTENBERG 等^[32]又建立了 SHERLOCKv2 平台。该平 台可通过侧向流系统对实验结果进行读取,适用于检测登 革热病毒或 Zika 病毒的单链 RNA 及患者活检液体样品中 的突变,具有便携、快速等优点。MYHRVOLD 等^[33]为了 提高 SHERLOCK 方法的实用性和病毒检测能力, 开发了 一种通过加热和化学还原裂解病毒颗粒并使体液中核糖核 酸酶失活的方法,即 HUDSON (heating unextracted diagn ostic samples to obliterate nucleases)平台。将 HUDSON 方 法引入到样品处理步骤中,简化了 DNA/RNA 提取和纯化 等操作,因此 SHERLOCK 方法可用于直接检测临床样品 中的病毒核酸。HUDSON 方法和 SHERLOCK 方法相结合, 适用于检测尿液、全血、血浆、血清及唾液等临床样品中 游离的 ZIKV 核酸。

除了上述应用外, SHERLOCK 平台还有许多其他 用途。WU 等^[60]建立了检测人类疱疹病毒(epstein-barr virus, EBV) DNA 的 SHERLOCK 平台。通过 RPA 引物 的优化, SHERLOCK 检测方法在室温下就可以进行工作, 简便了整个检测分析的过程。Cas13 也可应用于检测传 染病 COVID-19, PATCHSUNG 等^[61]建立了检测 SARS-CoV-2 的 SHERLOCK 平台。RNA 病毒通过 RT-RPA 技术进行扩增,再通过 T7 RNA 聚合酶进行转录, 最后应用 SHERLOCK 方法进行检测。相比于 RT-qPCR 检测方法,该方法具有更高的灵敏度和特异性,适用于 现场快速即时诊断。

Cas13a 也适用于检测与癌症早期临床诊断相关的生物标记物 miRNAs。SHAN 等^[62]基于 Cas13a, 建立了一种 miRNAs 核酸检测方法。Cas13a/crRNA 复合体通过对靶标 miRNAs 进行特异性识别,激活了 Cas13a 的核糖核酸酶活性,从而产生了便于读取的荧光信号。该方法简化了操作步骤,可快速得到检测结果,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^[34]将 Cas13a 切割活性与电化学发光技术相结合,构建了可用于检测 miRNAs 的新方法即 PECL (portable-electroche milumi nescence)-CRISPR 平台。通过靶标 miRNAs 激活 Cas13a 的核糖核酸酶活性,对设计好的预引物进行裂解,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。

1.4 CRISPR/Cas14 系统

此外,一种新型的二类 V 型 CRISPR/Cas 系统也被发 现并应用于核酸检测领域,即由 Cas14a、Cas14b 和 Cas14c 组成的 Cas14系统^[35]。Cas14包含1个与 Cas12类似的 RuvC 核酸酶结构域,这是 V 型 Cas 酶的特征^[63]。但 Cas14 的活 性与 Cas12 有所不同,如图 1d 所示,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,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。相比于其他典型的二类蛋白,Cas14 蛋白比较 小,只有大约 400~700 个氨基酸^[64]。且研究证实,Cas14 作 为一种可编程的核酸酶,有引入到类似于 SHERLOCK 核 酸检测等平台的可能性^[65]。

HARRINGTON 等^[35]将新发现的 Cas14a 与含硫代磷 酸酯的引物扩增、T7 核酸外切酶处理相结合,开发了 Cas14-DETECTR 方法,用于检测人的 SNP 位点。相比于 Cas12a-DETECTR 检测,Cas14a 在检测人HERC2 基因中可 达到单碱基分辨率。Cas14-DETECTR 还可以与 HUDSON 中所述的样品处理方法相结合,用于检测 ssDNA 病毒^[66]。 该方法可用于检测医学和生态领域中重要的 ssDNA 病原 体,能够在不限制 PAM 序列的条件下对 SNP 位点进行高 保真检测。然而,CRISPR-Cas14 技术是否可用于分类学、 与病原体关联的流行病学等其他领域,还有待研究探索。



图 1 多种 CRISPR/Cas 的切割活性 Fig.1 Cleavage activity of various CRISPR/Cas

2 CRISPR/Cas 核酸检测体系的应用领域

CRISPR/Cas 核酸检测具有非常广泛的应用,见图 2。除了上文提到的与传染病相关(细菌、病毒等),以及与遗传病和肿瘤相关(SNP、miRNAs 等)这些领域,CRISPR/Cas 核酸检测还能够被应用于耐药性微生物、寄生虫感染诊断、农业和转基因作物等领域。

WANG 等^[67] 基于 CRISPR/Cas13 系统开发了 PCR-CRISPR 平台,用于检测乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和耐药性乙型肝炎病毒。PCR-CRISPR 方法可 以高灵敏度和特异性地检测 HBV DNA 和耐药性突变,可 用于早期 HBV 感染的发现、耐药性监测和治疗指导等方 面。MOON 等^[68]基于 CRISPR/Cas9 系统开发了比色检测 方法,用于检测甲型流感病毒(swine influenza, pH1N1)和 耐药性甲型流感病毒(pH1N1/H275Y)。在生物素-PAMmer 引导下,dCas9/gRNA 复合物能够识别病毒裂解物中的 RNA。随后,链霉亲和素-HRP 和生物素-PAMmer 会发生 反应,产生可被肉眼观察到的颜色变化。该方法还可用于 检测 SARS-CoV-2,且在耐药性病毒检测领域具有广泛的 应用前景。

CUNNINGHAM 等^[69]利用 SHERLOCK 原理, 创建了 新的疟疾检测方法。该方法将 RPA 扩增技术、CRISPR-RNA 碱基配对和 Cas13a 切割活性相结合,可用于检测所有已知 的会导致人类疟疾的疟原虫物种。该检测方法不仅可以快 速、灵敏地对恶性疟原虫感染进行诊断,还能够应用于蚊 子中寄生虫的检测和耐药基因的分型。LEE 等^[70]也利用了 SHERLOCK 平台,对恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原 虫等多种疟原虫进行了较高灵敏度的检测和区分。他们对 诊断过程进行了简化,并使用便携式荧光检测器或侧向流 检测试纸对输出信号进行读取,使得整个检测方法更适用 于即时临床诊断。

ABUDAYYEH 等^[71]利用 SHERLOCK 方法, 对大豆 基因组进行核酸检测。通过简便地提取步骤和快速地等温 扩增, SHERLOCK 方法能够准确量化大豆中的特定 DNA 靶点。通过该研究证实了 SHERLOCK 平台在育种过程中 适用于植物性状的检测, 且相同的原理也可应用于农业中 的许多其他情况。ZHANG 等^[72]基于 CRISPR/Cas12 系统 开发出了可用于检测农作物的 RPA-Cas12a-LFA 方法。他 们将 RPA 扩增和 Cas12a 切割与侧向流动测定相结合, 适 用于水稻病原体和转基因水稻的检测。

本课题组 HUANG 等^[73]基于 CRISPR/Cas12 系统开发 出了可见的便携式转基因生物核酸检测平台。以胭脂碱合 酶(nopaline synthase, NOS)终止子作为靶标,通过重组酶 介导等温核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)进行等温扩增,再通过 Cas12a 切割、转化酶-葡萄糖

氧化酶级联反应和 Fenton 反应进行信号的放大和转导,最 后根据颜色变化进行信号读取。该方法在真实样品(包含转 基因大豆和转基因玉米)检测中,具有灵敏度高和选择性 好等优点, 目无需大型或专业仪器, 有望为转基因生物安 全监管提供合理的技术支持。随后, HUANG 等^[74]基于 CRISPR/Cas12 系统还开发出了快速灵敏的便携式 SARS-CoV-2 核酸检测平台。在温和条件下,样品通过逆转 录重组酶介导等温核酸扩增技术(reverse transcription -recombinase aided amplification, RT-RAA)进行预处理和扩 增。然后, 通过结合 Cas12a 切割活性和转化酶生成葡萄糖 的反应,将病毒信号转化为葡萄糖信号,可以使用家用血 糖仪在几秒内进行定量读取。该方法具有成本低、检测时 间短、无需专业仪器等优势, 有望为疫情防控期间的早期 诊断和干预提供有力的技术支持。本课题组还将继续研究 CRISPR 系统与其他信号输出方式相结合,以及建立 CRISPR 一体化检测技术。



图 2 CRISPR/Cas 核酸检测体系的应用领域 Fig.2 Application fields of CRISPR/Cas nucleic acid detection system

3 CRISPR/Cas 核酸检测体系的优势与挑战

3.1 CRISPR/Cas 核酸检测体系的优势

CRISPR/Cas 核酸检测体系相比于传统的分子诊断 方法,具有更高的灵敏度、特异性和分辨率,如 DETECTR方法采用 RPA 技术扩增可将灵敏度提高到 aM (attomolar)级^[27]。并且, CRISPR/Cas 核酸检测体系在生物 核酸检测上具有一定的通用性,如在检测 Zika 病毒和登 革热病毒的 SHERLOCK 平台基础上,研究人员开发了 SARS-CoV-2 SHERLOCK 方法,用于快速、准确地检测患 者样品中 SARS-CoV-2^[61]。此外, CRISPR 核酸检测方法 的成本正在不断地降低,例如应用 RCH 和 SHERLOCK 方法进行核酸检测,成本约为 1.727 美元/每次和 0.61 美元/每次^[24,31]。已报道的许多新型核酸检测系统已用于生产可用于现场使用的核酸检测试剂盒,具有操作简单、便携、低成本的优点。

3.2 CRISPR/Cas 核酸检测体系的挑战

CRISPR/Cas 核酸检测体系在常规应用和进一步开发 上仍面临着许多挑战。如 Cas9 和 Cas12 系统对于靶标的识 别和切割, 受到 PAM 位点的限制。在检测短序列时, PAM 位点的选择可能较少, 难以满足效应子的要求^[75]。其中, Cas9 蛋白受到自身特性的限制, 缺乏切割单链的核酸酶活 性, 其读出信号的高低完全取决于靶标 dsDNA 的浓度, 难 以进一步提高检测灵敏度。而 Cas13 系统的核酸检测一般 需要使用 RNA 作为荧光报告探针, 但 RNA 容易降解, 从 而出现假阳性的检测结果。基于基因组序列的 CRISPR/Cas 技术用于核酸检测时还存在不能完全避免的脱靶效应, 可 能得到假阳性或假阴性的实验结果, 影响检测的准确性。 此外, 许多 CRISPR/Cas 核酸检测体系的检测时间仍较长, 且较难实现定量检测及多通路检测。

因此,研究者们可以通过寻找新的 Cas 蛋白或对现有的 Cas 蛋白进行合理的工程化改造,从而解决 PAM 位点的限制和脱靶效应等问题,并提高 Cas 蛋白的切割效率。同时,研究者们可以尝试将 CRISPR/Cas 系统与其他更加快速灵敏的信号输出方式相结合,并对反应体系进行优化,从而实现多通路的快速定量核酸检测。

4 总结与展望

CRISPR/Cas 系统在基因编辑领域中的应用已经得到 了很好的探索。近年来,基于 CRISPR 技术开发了许多用 于检测特定核酸序列的新方法,可广泛应用于生物学研究 和生物技术领域。以上示例概述了利用 CRISPR 技术检测 多种不同类型核酸的巨大潜力。随着研究发现,一些 Cas 蛋白在识别靶标后,会参与附近非靶向 DNA/RNA 的"附 带"裂解。应用 Cas 蛋白这一独特的核酸酶活性,开发出了 更多快速有效的检测方法。然而,现有的大多数检测方法 还受到 PAM 位点及检测时间的限制,且对病原微生物存 在高度依赖性。但我们相信,随着 CRISPR 技术的进一步 发展,一定能开发出灵敏度、特异性、准确性等各方面均 有所提高的新型核酸检测方法。

虽然上述大多数核酸检测方法的原始目的仅出于检测1个或2个场景,但许多方法都具有扩展领域使用的可能性。基于当前技术的应用发展及即将到来的新型 Cas 直系同源物,我们相信 CRISPR/Cas 系统有望成为未来核酸检测技术的支柱。CRISPR/Cas 系统有潜力成为下一代诊断生物传感平台的候选者,促进其在疾病诊断、病原体分析、环境评估等领域的快速发展。

参考文献

- MUMFORD RA, MACARTHUR R, BOONHAM N. The role and challenges of new diagnostic technology in plant biosecurity [J]. Food Sec, 2016, 8: 103–109.
- [2] CHOI JR, HU J, TANG R, et al. An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care [J]. Lab Chip, 2016, 16: 611–621.
- [3] LAURI A, MARIANI PO. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety [J]. Genes Nutr, 2009, 4: 1–12.
- [4] SCHELER O, GLYNN B, KURG A. Nucleic acid detection technologies and marker molecules in bacterial diagnostics [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2014, 14(4): 489–500.
- [5] BLAUWKAMP TA, THAIR S, ROSEN MJ, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(4): 663–674.
- [6] VIGNESHVAR S, SUDHAKUMARI CC, SENTHILKUMARAN B, et al. Recent advances in biosensor technology for potential applications-an overview [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2016, 4: 11.
- [7] SAMUEL L. Point-of-care testing in microbiology [J]. Clin Lab Med, 2020, 40(4): 483–494.
- [8] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea [J]. Science, 2010, 327(5962): 167–170.
- [9] BHAYA D, DAVISON M, BARRANGOU R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation [J]. Annu Rev Genet, 2011, 45(1): 273–297.
- [10] GARNEAU JE, DUPUIS MÈ, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. Nature, 2010, 468(7320): 67–71.
- [11] 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]. J Bacteriol, 1987, 169(12): 5429–5433.
- [12] HSU PD, LANDER ES, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. Cell, 2014, 157(6): 1262–1278.
- [13] MAKAROVA KS, HAFT DH, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9: 467–477.
- [14] MAKAROVA KS, WOLF YI, ALKHNBASHI OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13: 722–736.
- [15] AMAN R, MAHAS A, MAHFOUZ M. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies [J]. ACS Synth Biol, 2020, 9(6): 1226–1233.
- [16] SHMAKOV S, ABUDAYYEH OO, MAKAROVA KS, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems [J]. Mol Cell, 2015, 60(3): 385–397.
- [17] 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.
- [18] HUANG MQ, ZHOU XM, WANG HY, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection [J]. Anal Chem, 2018, 90(3): 2193–2200.

第 12 卷

- [19] QUAN JN, LANGELIER C, KUCHTA A, et al. FLASH: A next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(14): 83.
- [20] WANG Q, ZHANG BB, XU XH, et al. CRISPR-typing PCR (ctPCR), a new Cas9-based DNA detection method [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14126.
- [21] ZHANG BB, WANG Q, XU XH, et al. Detection of target DNA with a novel Cas9/sgRNAs-associated reverse PCR (CARP) technique [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(12): 2889–2900.
- [22] ZHANG BB, XIA Q, WANG Q, et al. Detecting and typing target DNA with a novel CRISPR-typing PCR (ctPCR) technique [J]. Anal Biochem, 2018, 561-562: 37–46.
- [23] ZHANG YH, QIAN L, WEI WJ, et al. Paired design of dCas9 as a systematic platform for the detection of featured nucleic acid sequences in pathogenic strains [J]. ACS Synth Biol, 2016, 6(2): 211–216.
- [24] 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.
- [25] LI SY, CHENG QX, WANG JM, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. Cell Discov, 2018, 4: 20.
- [26] LI LX, LI SY, WU N, et al. HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(10): 2228–2237.
- [27] CHEN JS, MA E, HARRINGTON LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. Science, 2018, 360: 436–439.
- [28] NOURI R, JIANG Y, LIAN XL, et al. Sequence-specific recognition of HIV-1 DNA with solid-state CRISPR-Cas12a-assisted nanopores (SCAN) [J]. ACS Sens, 2020, 5: 1273–1280.
- [29] DING X, YIN K, LI ZY, et al. All-in-one dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) assay: A case for rapid, ultrasensitive and visual detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus [J]. Bio Rxiv, 2020. DOI: 10.21203/rs.3.rs-25826/v1
- [30] JOUNG J, LADHA A, SAITO M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing [J]. N Eng J Med, 2020, 383: 1492–1494.
- [31] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, LEE JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. Science, 2017, 356(6336): 438–442.
- [32] 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.
- [33] MYHRVOLD C, FREIJE CA, GOOTENBERG JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 [J]. Science, 2018, 360(6387): 444–448.
- [34] ZHOU T, HUANG R, HUANG MQ, et al. CRISPR/Cas13a powered portable electrochemiluminescence chip for ultrasensitive and specific miRNA detection [J]. Adv Sci, 2020, 7(13): 1903661.
- [35] HARRINGTON LB, BURSTEIN D, CHEN JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes [J]. Science, 2018, 362(6416): 839–842.
- [36] DOUDNA JA, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096.
- [37] JIANG FG, DOUDNA JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms [J].

Annu Rev Biophys, 2017, 46: 505–529.

- [38] 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.
- [39] STERNBERG SH, LAFRANCE B, KAPLAN M, et al. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9 [J]. Nature, 2015, 527: 110–113.
- [40] ZHU QM, KO KA, TURE S, et al. Novel thrombotic function of a human SNP in STXBP5 revealed by CRISPR/Cas9 gene editing in mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37: 264–270.
- [41] CHANG WD, LIU WP, LIU Y, et al. Colorimetric detection of nucleic acid sequences in plant pathogens based on CRISPR/Cas9 triggered signal amplification [J]. Microchim Acta, 2019, 186: 243.
- [42] BATISTA AC, PACHECO LGC. Detecting pathogens with Zinc-Finger, TALE and CRISPR-based programmable nucleic acid binding proteins [J]. J Microbiol Methods, 2018, 152: 98–104.
- [43] YAN FC, WANG W, ZHANG JQ. CRISPR-Cas12 and Cas13: The lesser known siblings of CRISPR-Cas9 [J]. Cell Biol Toxicol, 2019, 35: 489–492.
- [44] YAN WX, HUNNEWELL P, ALFONSE LE, et al. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems [J]. Science, 2019, 363(6422): 88–91.
- [45] GARCIA-DOVAL C, JINEK M. Molecular architectures and mechanisms of Class 2 CRISPR-associated nucleases [J]. Curr Opin Struct Biol, 2017, 47: 157–166.
- [46] SWARTS DC, JINEK M. Mechanistic insights into the cis- and trans-acting DNase activities of Cas12a [J]. Mol Cell, 2019, 73: 1–12.
- [47] STRECKER J, JONES S, KOOPAL B, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 212.
- [48] YAO RL, LIU D, JIA X, et al. CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria [J]. Synth Syst Biotechnol, 2019, 3(3): 135–149.
- [49] CHENG QX. An application of a Cas protein, and a method and kit for detecting a target nucleic acid molecule, China: CN107488710A [P]. 2017-12-19.
- [50] TENG F, GUO L, CUI TT, et al. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity [J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 132.
- [51] HE Q, YU DM, BAO MD, et al. High-throughput and all-solution phase African swine fever virus (ASFV) detection using CRISPR-Cas12a and fluorescence based point-of-care system [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 154: 112068.
- [52] LI YY, MANSOUR H, WANG T, et al. Naked-eye detection of grapevine red-bloth viral infection using a plasmonic CRISPR Cas12a assay [J]. Anal Chem, 2019, 91(18): 11510–11513.
- [53] CHEN YJ, SHI Y, CHEN Y, et al. Contamination-free visual detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: A promising method in the point-of-care detection [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 169: 112642.
- [54] ANANTHARAMAN V, MAKAROVA KS, BURROUGHS AM, et al. Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: Identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing [J]. Biol Direct, 2013, 8(1): 15.
- [55] MAHAS A, STEWART JRCN, MAHFOUZ MM. Harnessing CRISPR/Cas systems for programmable transcriptional and post-

transcriptional regulation [J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(1): 295-310.

- [56] O'CONNELL MR. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13containing type VI CRISPR-Cas systems [J]. J Mol Biol, 2019, 431(1): 66–87.
- [57] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL MR, KNIGHT SC, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. Nature, 2016, 538: 270–273.
- [58] COX DBT, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13 [J]. Science, 2017, 358(6366): 1019–1027.
- [59] ALI Z, MAHAS A, MAHFOUZ M. CRISPR/Cas13 as a tool for RNA interference [J]. Science, 2018, 23(5): 374–378.
- [60] WU YT, LIU SX, WANG F, et al. Room temperature detection of plasma epstein-barr virus DNA with CRISPR-Cas13 [J]. Clin Chem, 2019, 65(4): 591–592.
- [61] PATCHSUNG M, JANTARUG K, PATTAMA A, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA [J]. Nat Biomed Eng, 2020, 4: 1140–1149.
- [62] SHAN YY, ZHOU XM, HUANG R, et al. High-fidelity and rapid quantification of miRNA combining crRNA programmability and CRISPR/Cas13a trans-cleavage activity [J]. Anal Chem, 2019, 91(8): 5278–5285.
- [63] SHMAKOV S, SMARGON A, SCOTT D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15: 169–182.
- [64] SAVAGE DF. Cas14: Big advances from small CRISPR proteins [J]. Biochemistry, 2019, 58(8): 1024–1025.
- [65] KARVELIS T, BIGELYTE G, YOUNG JK, et al. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas14 triggers programmable double-stranded DNA cleavage [J]. Bio Rxiv, 2019. DOI: 10.1101/654897
- [66] AQUINO-JARQUIN G CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic [J]. Nanomedicine, 2019, 18: 428–431.
- [67] 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, 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.04.018
- [68] 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.
- [69] CUNNINGHAM CH, HENNELLY CM, LIN JT, et al. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of plasmodium detection, speciation, and drug-resistance genotyping [J]. Bio Rxiv, 2020, 68:

103415.

- [70] LEE RA, PUIG HD, 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, 2020, 117(41): 25722–25731.
- [71] ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, KELLNER MJ, et al. Nucleic acid detection of plant genes using CRISPR-Cas13 [J]. CRISPR J, 2019, 2(3): 165–171.
- [72] ZHANG YM, ZHANG Y, XIE KB. Evaluation of CRISPR/Cas12a-based DNA detection for fast pathogen diagnosis and GMO test in rice [J]. Mol Breed, 2020, 40(1): 11.
- [73] HUANG D, QIAN JJ, SHI ZW, et al. CRISPR-Cas12a-assisted multicolor biosensor for semiquantitative point-of-use testing of the nopaline synthase terminator in genetically modified crops by unaided eyes [J]. ACS Synth Biol, 2020, 9(11): 3114–3123.
- [74] HUANG D, SHI ZW, QIAN JJ, et al. A CRISPR-Cas12a-derived biosensor enabling portable personal glucose meter readout for quantitative detection of SARS-CoV-2 [J]. Biotechnol Bioeng, 2021, 118(4): 1–10.
- [75] LI Y, LI S, WANG J, et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing [J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(7): 730–743.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



王紫怡,硕士研究生,主要研究方向 为生物工程。 E-mail: 22028177@zju.edu.cn

徐颖华,博士,研究员,主要研究方向 为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准 化研究。

E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

徐志南,博士,教授,主要研究方向为 合成生物学和生物化工。 E-mail: znxu@zju.edu.cn